La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California).

La investigación fue financiada por el CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología).

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México). El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo o titular de los Derechos Autor.

CICESE@ 2023. Todos los derechos reservados

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

Actividad inmunomoduladora de toxinas del veneno de *Conasprella ximenes,* en un modelo murino

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

Presenta:

Octavio Rentería Pacheco

Ensenada, Baja California, México 2023

Tesis defendida por Octavio Rentería Pacheco

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Alexei Fedorovish Licea Navarro Director de tesis

Dr. Carlos Alberto Brizuela Rodríguez

Dra. Johanna Bernáldez Sarabia

Dr. Marco Antonio De León Nava



Dra. Ana Denise Re Araujo Coordinadora del Posgrado en Ciencias de la Vida

> **Dr. Pedro Negrete Regagnon** Director de Estudios de Posgrado

Copyright © 2023, Todos los Derechos Reservados, CICESE Prohibida su reproducción parcial o total sin la autorización por escrito del CICESE Resumen de la tesis que presenta **Octavio Rentería Pacheco** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Biomedicina y Bionanotecnología

Actividad inmunomoduladora de toxinas del veneno de *Conasprella ximenes,* en un modelo murino

Resumen aprobado por:

Dr. Alexei Fedorovish Licea Navarro Director de tesis

El sistema inmunológico comprende una serie de mecanismos y componentes enfocados a defender al organismo contra distintos agentes patógenos. Se divide a su vez en dos sistemas: innato y adaptativo, y ambos actúan de manera coordinada. La inmunomodulación es un tipo de terapia que permite regular o alterar componentes del sistema inmunológico en cuanto a intensidad, duración o tipo de respuesta producida y permite modificar la actividad de las células inmunitarias mediante su estimulación, supresión o regulación. Las células inmunitarias poseen distintos canales iónicos capaces de regular funciones como su activación, proliferación, migración y diferenciación. Asimismo, las conotoxinas de los caracoles cono tienen capacidad de actuar en distintos canales iónicos y se caracterizan por su alta afinidad y selectividad por sus sitios diana. Debido a lo anterior, se sugiere que estos péptidos tienen la capacidad de modular la actividad de las células inmunitarias. En el presente trabajo, se evaluó el efecto in vivo del veneno total de C. ximenes en el balance de células inmunitarias en ganglios poplíteos e inguinales de ratones BALB/c. La detección de estas células se realizó mediante citometría de flujo, y posteriormente se evaluó el efecto inmunomodulador de las fracciones colectadas por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC), mediante ensayos en la línea celular de monocitos THP-1. Los resultados mostraron que el veneno total a una concentración de 200 μ g/mL, disminuyó significativamente (P= <0.0001) la población de macrófagos. Para los ensayos de diferenciación de monocitos a macrófagos, no se observó ningún cambio significativo en ninguna de las fracciones probadas. Sin embargo, dos subfracciones; FVIII.2 y FVIII.3, mostraron un aumento en la proliferación de monocitos humanos THP-1. En conjunto, estos resultados sugieren que ciertas toxinas poseen actividad inmunomoduladora, por lo que se requiere seguir la investigación de estos péptidos, con el fin de utilizarlos en un futuro como agentes terapéuticos y/o auxiliares en el tratamiento de diversas patologías.

Palabras clave: veneno, conotoxinas, *Conasprella ximenes*, inmunomodulación, monocitos, macrófagos.

Abstract of the thesis presented **by Octavio Rentería Pacheco** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Science with orientation in Biomedicine and Bionanotechnology

Immunomodulatory activity of toxins from Conasprella ximenes venom, in a murine model

Abstract approved by:

Dr. Alexei Fedorovish Licea Navarro Thesis Director

The immune system comprises a series of mechanisms and components focused on defending the body against different pathogens. It is divided into 2 systems: innate and adaptive, and both act in a coordinated manner. Immunomodulation is a type of therapy that allows regulating or altering components of the immune system in terms of intensity, duration or type of response produced and allows modifying the activity of immune cells by stimulating, suppressing or regulating them. Immune cells possess different ion channels capable of regulating functions such as their activation, proliferation, migration and differentiation. Likewise, cone snail conotoxins have the ability to act on different ion channels and are characterized by their high affinity and selectivity for their target sites. Due to this, it is suggested that these peptides have the ability to modulate the activity of immune cells. In the present work, the in vivo effect of total C. ximenes venom on the balance of immune cells in popliteal and inguinal ganglia of BALB/c mice was evaluated. The detection of these cells was performed by flow cytometry, and the immunomodulatory effect of the collected fractions was subsequently evaluated by reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC), through assays on the THP-1 monocyte cell line. The results showed that the total venom at a concentration of 200 μ g/mL significantly decreased (P= <0.0001) the macrophage population. For monocyte to macrophage differentiation assays, no significant change was observed in any of the fractions tested. However, two subfractions; FVIII.2 and FVIII.3, showed an increase in the proliferation of THP-1 human monocytes. Taken together, these results suggest that certain toxins have immunomodulatory activity, which is why it is necessary to continue the investigation of these peptides, in order to use them in the future as therapeutic agents and/or auxiliaries in the treatment of various pathologies.

Keywords: venom, conotoxins, Conasprella ximenes, immunomodulation, monocytes, macrophages.

Dedicatoria

A mis abuelos; Antonia y Anselmo, les dedico este trabajo.

Partieron antes de verme concluir este nuevo logro, pero su amor y su apoyo a través de los años, me permitieron llegar hasta donde estoy.

Muchas gracias.

Agradecimientos

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE), por darme la oportunidad de estudiar el posgrado en Ciencias de la Vida.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)**, por el apoyo económico brindado durante la maestría, con número de becario 1063960.

A mi director de tesis, el **Dr. Alexei Licea**, por todo el apoyo brindado para lograr la culminación de este proyecto, por su tiempo y sus enseñanzas, por el apoyo económico y en general, por haberme permitido formar parte de su equipo de trabajo.

A los miembros de mi comité:

El Dr. Carlos Brizuela, por sus comentarios y aportaciones brindados para la realización de este trabajo.

La **Dra. Johanna Bernáldez**, por la capacitación en cultivo celular, por el veneno proporcionado para continuar con los experimentos, y por sus observaciones y recomendaciones a lo largo de la tesis.

El **Dr. Marco De León**, por la capacitación en el manejo y disección de ratones, por brindarme los reactivos necesarios para citometría de flujo, por su apoyo en el laboratorio, así como sus consejos y observaciones en el desarrollo de este proyecto.

Especial agradecimiento:

A la **M.C. Samantha Jiménez**, por el veneno proporcionado para iniciar con el proyecto, por todo su apoyo y enseñanzas en el manejo del HPLC y en el manejo de ratones, por sus conocimientos relacionados a los *Conus* y por todas las dudas resueltas.

A la **Dra. Angélica Álvarez**, por la capacitación y apoyo en citometría de flujo, por su apoyo en los diseños experimentales y sobre todo, por su amistad, gracias por todos los buenos momentos a lo largo de esta maestría.

Al **Dr. Fournier Pierrick**, por los reactivos brindados para citometría de flujo y por su apoyo en el diseño experimental.

A mis padres, **Patricia** y **Humberto**, gracias por todo su apoyo incondicional, por motivarme a seguir aprendiendo, por ser una fuente de inspiración y por todo su esfuerzo invertido en mí, el cual me permitió llegar hasta donde estoy, los quiero mucho.

A mis amigos, en orden alfabético:

A **Adolfo**, mi primer amigo y roomie en Ensenada, gracias por adoptarme como uno de tus introvertidos, por preguntar todo aquello que yo no me atrevía, por escucharme cuando más lo necesitaba, por aceptarme por quien soy, por cocinar y alimentarme cuando éramos roomies, por motivarme a seguir adelante y no rendirme, y por todos los buenos momentos en Ensenada! どうもありがとう.

A **Alejandra**, mi racoon, gracias por tu amistad genuina y sincera, por ser mi confidente y mi compañera en tragedias y alegrías, por apoyarme siempre, por tu honestidad y consejos tanto de la maestría como de la vida, por escucharme y alentarme a seguir adelante, por inspirarme, por brindarme asilo en tu hogar en Puebla, por los atardeceres y las salidas a la Playa y por todos los grandiosos momentos y aventuras en Ensenada.

A **Andrea**, mi mejor amiga, gracias por todo tu apoyo a pesar de la distancia, por tu amistad a través de los años, por estar siempre para mí, por escucharme por teléfono en cada crisis (y vaya que fueron muchas), por ser un modelo de inspiración, por motivarme y no dejar que me rindiera, por preocuparte por mí, gracias por todos tus consejos y palabras, por visitarme en Ensenada y por salvarme, te quiero mucho.

A **Dave**, mon frère, gracias por absolutamente todo, por tu amistad honesta y leal, por cuidarme en muchos sentidos, por soportar todos mis ataques de locura y drama, por estar conmigo en los momentos más oscuros, pero también por compartir aquellos grandes y buenos momentos de risa y felicidad, gracias por escucharme, por tus consejos y por tu apoyo incondicional, pero sobre todo, gracias por no rendirte conmigo.

A **Geovanni**, gracias por tu amistad, por siempre hacerme reír (haya sido tu intención o no), por escucharme, por los buenos momentos y por todos los chismecitos.

A **Isaí**, por las dudas resueltas en relación con cultivo celular, por los buenos momentos de risa, diversión e incluso tragedia, por tu amistad y por supuesto, por los desayunos y comidas con chismecito.

A **Iván**, mi otro racoon, gracias por ser un pilar durante esta travesía, por todos tus consejos, por tu apoyo incondicional, por escucharme y acompañarme en los momentos en los que todo parecía perdido, por tu honestidad, tus recomendaciones musicales, por las pláticas profundas y atardeceres, por las fotos tomadas, por tu amistad y por todos los momentos de risa y felicidad a lo largo de la maestría.

A **Jorge** y **Dafne**, mis amigos más antiguos, gracias por todo su apoyo desde la distancia, por siempre estar al pendiente de mi progreso y bienestar, por escucharme y siempre considerarme en sus planes, y en general, por todos los años de amistad.

A **Kevin**, mi roomie, gracias por escuchar todas mis quejas, por brindarme un abrazo cada que lo necesitaba, gracias por tu compañía, por todos los buenos momentos y por todos los excesos, pero sobre todo, gracias por tu amistad.

Y a todos mis compañeros de generación, que hicieron de la maestría y de mi estancia en Ensenada, una experiencia memorable, muchas gracias.

Tabla de contenido

Página

Resumen en español	ii
Resumen en inglés	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Lista de figuras	x
Lista de tablas	xii

(Capítulo	1. Introducción	1
	1.1	Antecedentes	2
	1.1.1	Sistema inmunológico	2
	1.1.1.1	Inmunidad innata	2
	1.1.1.2	Inmunidad adaptativa	4
	1.1.2	Canales iónicos	4
	1.1.3	Inmunomodulación	5
	1.1.4	Caracoles cono	5
	1.1.4.1	Generalidades del veneno	ô
	1.1.4.2	Conotoxinas	ô
	1.1.4.3	Conasprella ximenes	3
	1.2	Justificación	Э
	1.3	Hipótesis10	C
	1.4	Objetivos10	C
	1.4.1	Objetivo general	C
	1.4.2	Objetivos específicos	C

Capitulo 2. Metodología11				
2.1	Veneno			
2.1.1	Extracción del veneno y procesamiento del veneno11			
2.2	Fraccionamiento del veneno por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP- HPLC)11			
2.2.1	Repurificación de las fracciones cromatográficas con actividad inmunomoduladora12			
2.3	Modelo animal12			
2.4	Inoculación y sacrificio del ratón12			
2.5	Obtención de sangre total y suero13			
2.6	Extracción y disgregación de ganglios linfáticos14			
2.7	Evaluación del balance de células inmunitarias por citometría de flujo15			
2.8	Cultivo celular15			
2.8.1	Línea celular THP-116			
2.8.2	Ensayo de citotoxicidad (MTS)16			
2.8.3	Evaluación de las fracciones (FII – FXIII) de <i>C. ximenes</i> (febrero 2018)17			
2.8.4	Evaluación de las subfracciones de <i>C. ximenes</i> (febrero 2018)18			
2.8.5	Evaluación de las fracciones (FII – FXIII) de <i>C. ximenes</i> (febrero 2015)19			
2.8.6	Evaluación de las subfracciones de <i>C. ximenes</i> (febrero 2015)20			
2.9	Análisis estadístico			
Capítulo	3. Resultados22			
3.1	Fraccionamiento del veneno22			
3.2	Efecto del veneno total de <i>C. ximenes</i> en el balance de células inmunitarias24			
3.3	Ensayo de citotoxicidad del veneno total de <i>C. ximenes</i> 24			
3.4	Evaluación de las fracciones de <i>C. ximenes</i> (febrero 2018) en la línea THP-126			
3.5	Repurificación de las fracciones IV, VI y X (febrero 2018)29			

3.6	Evaluación de las subfracciones de FIV, FVI y FX (febrero 2018)	29

	3.7	Evaluación de las fracciones de <i>C. ximenes</i> (febrero 2015) en la línea THP-1	.29
	3.7.1	Ensayo de diferenciación de monocitos a macrófagos	.29
	3.8	Repurificación de las fracciones VIII y XII (febrero 2015)	.30
	3.9	Evaluación de las subfracciones de FVIII y FXII (febrero 2015)	.30
	3.10	Evaluación de las subfracciones de FVIII.2 y FVIII.3 (febrero 2015)	.34
ſ	Capitulo	4. Discusión	.45
(Capitulo	5. Conclusiones	.50
I	Literatur	a citada	.51
	Anexos .		.56

Lista de figuras

Figura	Página
1.	Componentes del sistema inmunológico
2.	Clasificación de conotoxinas7
3.	Características de Conasprella ximenes9
4.	Órganos linfáticos de ratón14
5.	Diseño experimental del ensayo de citotoxicidad (MTS)16
6.	Diseño experimental del ensayo de diferenciación a macrófagos con fracciones de <i>C. ximenes</i> (febrero 2018)
7.	Diseño experimental del ensayo de diferenciación a macrófagos con subfracciones de la fracción IV de <i>C. ximenes</i>
8.	Diseño experimental del ensayo de diferenciación a macrófagos con subfracciones de las fracciones VI y X de <i>C. ximenes</i>
9.	Diseño experimental del ensayo de diferenciación a macrófagos y proliferación de monocitos con fracciones de <i>C. ximenes</i> (febrero 2015)20
10.	Diseño experimental del ensayo de proliferación de monocitos con subfracciones del veneno de <i>C. ximenes</i>
11.	Perfil cromatográfico del veneno total de Conasprella ximenes (febrero 2018)22
12.	Perfil cromatográfico del veneno total de Conasprella ximenes (febrero 2015)23
13.	Comparación de perfiles cromatográficos de veneno total de C. ximenes
14.	Efecto <i>in vivo</i> del veneno total de <i>Conasprella ximenes</i> , en el balance de macrófagos y células dendríticas25
15.	Efecto in vivo del veneno total de C. ximenes, en el balance y migración de linfocitos T26
16.	Efecto in vivo del veneno total de C. ximenes, en el balance y migración de linfocitos B27
17.	Efecto del veneno total de C.ximenes en el balance de células inmunitarias adaptativas27
18.	Efecto del veneno total de C. ximenes en la migración de células inmunitarias adaptativas 28
19.	Ensayo de citotoxicidad del veneno total de <i>C. ximenes</i> en monocitos THP-1
20.	Evaluación de las fracciones del veneno de <i>C. ximenes</i> (febrero 2018), en la diferenciación de monocitos de la línea THP-131

21.	Perfil cromatográfico de la fracción IV del veneno de <i>C. ximenes</i> (febrero 2018)32
22.	Perfil cromatográfico de la fracción VI del veneno de <i>C. ximenes</i> (febrero 2018)32
23.	Perfil cromatográfico de la fracción X del veneno de <i>C. ximenes</i> (febrero 2018)
24.	Evaluación de las subfracciones de FIV del veneno de <i>C. ximenes</i> , en la diferenciación de monocitos de la línea THP-1
25.	Evaluación de las subfracciones de FVI del veneno de <i>C. ximenes</i> , en la diferenciación de monocitos de la línea THP-135
26.	Evaluación de las subfracciones de FX del veneno de <i>C. ximenes</i> , en la diferenciación de monocitos de la línea THP-1
27.	Evaluación de las fracciones del veneno de <i>C. ximenes</i> (febrero 2015), en la diferenciación de monocitos de la línea THP-137
28.	Evaluación de las fracciones del veneno de <i>C. ximenes</i> (febrero 2015), en la proliferación de monocitos de la línea THP-1
29.	Perfil cromatográfico de la fracción VIII del veneno de <i>C. ximenes</i> (febrero 2015)
30.	Perfil cromatográfico de la fracción XII del veneno de <i>C. ximenes</i> (febrero 2015)39
31.	Evaluación de las subfracciones de FVIII y FXII del veneno de <i>C. ximenes,</i> en la proliferación de monocitos40
32.	Perfil cromatográfico de la primera repurificación de fracción VIII de <i>C. ximenes</i> (febrero 2015) 40
33.	Evaluación de las subfracciones FVIII.2.1, FVIII.2.2, FVIII.3.1 y FVIII.3.2, en la proliferación de monocitos
34.	Perfiles cromatográficos de la repurificación de las subfracciones FVIII.2 y FVIII.3 de <i>C. ximenes</i> , por método isocrático42
35.	Perfil cromatográfico de la segunda repurificación de fracción VIII de <i>C. ximenes</i> (febrero 2015) 43
36.	Evaluación de las subfracciones FVIII.1, FVIII.2.1 y FVIII.2.2, en la proliferación de monocitos
37.	Evaluación de la subfracción FVIII.2, en la proliferación de monocitos44
38.	Citogramas de puntos del análisis de linfocitos56
39.	Citograma de puntos del análisis de linfocitos T y linfocitos B56
40.	Diferenciación morfológica de monocitos THP-1 tratados con PMA y fracciones del veneno de <i>C. ximenes</i>

Lista de tablas

Tabla	Página
1.	Diseño experimental para la inmunización de ratones con veneno total de <i>Conasprella ximenes</i> 13
2.	Marcadores para citometría de flujo de las poblaciones inmunológicas en ganglio de ratón. 15
3.	Conteo celular de ganglios poplíteos e inguinales de los grupos control y experimental24
4.	Gradiente de elución empleado para repurificación de las fracciones IV, VI y X31
5.	Gradiente de elución empleado para repurificación de las fracciones VIII y XII
6.	Porcentaje de elución en solución B de las subfracciones de C. ximenes

El sistema inmunológico emplea distintos mecanismos y componentes encaminados a defender al huésped contra agentes extraños o potencialmente dañinos. En respuesta a una infección, el sistema inmunológico actúa de manera coordinada empleando los componentes humorales (citocinas, péptidos antimicrobianos, anticuerpos, entre otros) y celulares (granulocitos, macrófagos, células dendríticas y linfocitos) de la inmunidad innata y adaptativa (Marshall et al., 2018). La inmunomodulación implica la modificación de uno o más componentes del sistema inmunitario para amplificar o disminuir la respuesta inmune, empleando compuestos que pueden tener actividad estimulante, supresora o reguladora (Minutti-Zanella et al., 2021). Debido a esta variedad de acciones, la inmunomodulación abarca un conjunto de terapias que permiten tratar una amplia variedad de padecimientos entre los que se incluyen infecciones, trastornos autoinmunes y cáncer, entre otros (Jimenez et al., 2018; Minutti-Zanella et al., 2021).

Diversos animales marinos (anémonas, caracoles cono, erizos, estrellas de mar, hidras y pulpos, entre otros) emplean veneno como un mecanismo de defensa o depredación. Estos venenos se componen de una mezcla variada de proteínas, péptidos, enzimas, entre otras moléculas (King, 2011; Pennington et al., 2018). Se han descrito distintos efectos biológicos relacionados con estos venenos, entre los que destacan su actividad analgésica, antimicrobiana, hemolítica, enzimática, inmunomoduladora, antitumoral y antiviral, por mencionar algunas (Martins et al., 2014; R.A. Mans, 2016).

Las conotoxinas son péptidos presentes en el veneno de los caracoles cono. Estos péptidos se caracterizan por ser pequeños (12-30 aminoácidos), altamente selectivos por su receptor, estructuralmente estables (formación de estructuras secundarias estabilizadas por enlaces disulfuro) y capaces de resistir degradación por proteasas (Jin et al., 2019). Las conotoxinas ejercen su actividad a través de distintos canales iónicos, receptores acoplados a proteína G y transportadores de neurotransmisores (Inserra y Lewis, 2011).

Gracias a su alta afinidad por sus blancos moleculares, a sus características bioquímicas y a su capacidad de actuar en diversos canales iónicos presentes en las células inmunitarias, las conotoxinas son moléculas con un gran potencial para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos. En el presente trabajo se evaluó el efecto inmunomodulador de toxinas aisladas del veneno de *Conasprella ximenes*, en un modelo murino y en una línea celular de monocitos humanos (THP-1), mediante ensayos en cultivo celular.

1.1 Antecedentes

1.1.1 Sistema inmunológico

El sistema inmunológico de los organismos vertebrados comprende un conjunto de células, compuestos químicos y procesos encaminados a proteger al organismo contra agentes extraños como: virus, bacterias, hongos, parásitos y toxinas (Marshall et al., 2018). El sistema inmunológico se divide en dos sub-sistemas: el innato y el adaptativo. La inmunidad innata es el primer mecanismo de defensa contra patógenos y se caracteriza por una rápida respuesta, pero parcialmente inespecífica y con poca capacidad de reconocer un amplio número de moléculas (Vivier y Malissen, 2005). Por otra parte, la inmunidad adaptativa se caracteriza por ser más específica en el reconocimiento de los antígenos, por emplear anticuerpos y tener la capacidad de generar memoria, lo que permite una respuesta rápida y efectiva en caso de una exposición posterior al mismo antígeno (Lanier y Sun, 2009). A pesar de esta separación, el sistema inmunológico innato y adaptativo no son mutuamente excluyentes, ya que ambos se complementan y son necesarios para mantener la homeostasis y evitar el desarrollo de enfermedades (Marshall et al., 2018).

1.1.1.1 Inmunidad innata

La inmunidad hace referencia a la capacidad de tener suficientes defensas específicas para evitar una infección o, en su defecto, una invasión biológica (Zerón, 2021). Los principales elementos de la inmunidad innata incluyen barreras físicas y químicas (piel, mucosas, pH y secreciones), así como componentes humorales (citocinas, péptidos y proteínas del complemento) y celulares (granulocitos, monocitos, macrófagos, mastocitos y linfocitos NK) (Turvey y Broide, 2010) (Figura 1). Aunque su repertorio es limitado, la inmunidad innata es capaz de producir una respuesta rápida durante la primera fase de infección, mediante el reclutamiento de células al sitio de infección, generando condiciones de inflamación. Asimismo, la inmunidad innata incluye al sistema del complemento, lo que permite la identificación y opsonización de distintos patógenos, facilitando así su fagocitosis (Marshall et al., 2018).

Otra característica importante de este sistema es el uso de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), los cuales son capaces de reconocer estructuras conservadas de los patógenos denominadas patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), como: lipopolisacáridos, glicolípidos, lipoproteínas, ácidos nucleicos, entre otros (Turvey y Broide, 2010; Riera Romo et al., 2016). De igual forma, la inmunidad

innata juega un papel importante en la activación y regulación de la inmunidad adaptativa, a través de la liberación de compuestos químicos o interacciones célula-célula mediante la ayuda de las células presentadoras de antígeno profesionales (APC) (Riera Romo et al., 2016).



Figura 1. Componentes del sistema inmunológico. *APC*, células presentadoras de antígeno. Modificado de Yamauchi y Moroishi, 2019.

Entre los elementos clave de la inmunidad innata se encuentran los monocitos, células capaces de regular la homeostasis en ambientes relacionados con infecciones e inflamación. En respuesta a determinados estímulos, los monocitos pueden diferenciarse en células dendríticas o macrófagos, dos tipos de células reconocidas por su capacidad de presentar antígenos (Espinoza y Emmady, 2020). Los macrófagos se encuentran ampliamente distribuidos en todos los tejidos, y ejercen distintas funciones relacionadas con la defensa del organismo. Entre sus funciones destacan la fagocitosis de agentes extraños, expresión de citocinas, homeostasis, procesos metabólicos, modulación de la inflamación, presentación de antígenos y reparación de tejidos (Mosser y Edwards, 2008). Además, los macrófagos son células con una alta plasticidad, con capacidad de activarse y expresar distintos fenotipos en respuesta a diversos estímulos en el microambiente (Cohn, 1978). De acuerdo con su mecanismo de activación y la función que ejercen, los

macrófagos se clasifican en dos tipos: activados por la vía clásica (M1), con un perfil pro-inflamatorio y los activados por la vía alternativa (M2), con un fenotipo anti-inflamatorio (Sudan et al., 2015)

1.1.1.2 Inmunidad adaptativa

La inmunidad adaptativa, en contraste con la inmunidad innata, ofrece una respuesta más específica y diversa, lo que permite el reconocimiento de antígenos extraños y la distinción de los propios, así como la capacidad de generar memoria inmunológica en caso de una infección posterior. Las dos células efectoras de la inmunidad adaptativa son los linfocitos T y B (Luckheeram et al., 2012). Tras su maduración en los órganos linfáticos primarios (médula ósea y timo), los linfocitos migran a los órganos linfáticos secundarios (ganglios y bazo), lo que les permite entrar en contacto con antígenos en circulación o con células presentadoras de antígeno (APC) presentes en el sitio (Bonilla y Oettgen, 2010; Marshall et al., 2018). Los linfocitos T requieren de la actividad de las APC para su activación y proliferación. La activación ocurre tras la interacción entre el antígeno unido al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC); presente en las APC, y el receptor de células T (TCR) (Marshall et al., 2018). Esta interacción les permite a los linfocitos efectuar distintas funciones como la eliminación de células infectadas (linfocitos citotóxicos CD8⁺) o la estimulación de otras células inmunitarias (linfocitos cooperadores CD4⁺). Por otra parte, los linfocitos B son capaces de reconocer antígenos mediante su receptor de células B (BCR), y madurar en células plasmáticas con capacidad de producir anticuerpos (Bonilla y Oettgen, 2010).

1.1.2 Canales iónicos

Las células del sistema inmunitario innato y adaptativo expresan distintos canales iónicos y transportadores que permiten el flujo de iones, tanto de la membrana plasmática, como de los distintos organelos intracelulares (mitocondria, retículo endoplasmático o lisosomas)(Feske et al., 2015). Estos canales regulan la concentración intracelular de varios cationes divalentes como: calcio (Ca²⁺), magnesio (Mg²⁺) y zinc (Zn²⁺), los cuales son importantes segundos mensajeros y modulan distintas vías de señalización. Asimismo, el movimiento de estos cationes depende del potencial eléctrico de membrana generado por los canales de sodio (Na⁺), potasio (K⁺) y cloro (Cl⁻)(Feske et al., 2015). Muchas de las funciones inmunológicas son activadas en respuesta al aumento en la concentración de Ca²⁺ citosólico y de los otros iones divalentes. Entre estas funciones se incluyen la activación, proliferación, desarrollo,

diferenciación, apoptosis y migración de las células inmunitarias, así como la activación de factores de transcripción, expresión génica e inflamación (De Jonge y Ulloa, 2007; Feske et al., 2015).

Algunos de los receptores inmunitarios capaces de modular la concentración de estos iones son el receptor de células T (TCR), receptor de células B (BCR), receptores tipo Toll (TLR) y varios receptores a quimiocinas, por mencionar algunos (Chaigne-Delalande y Lenardo, 2014).

1.1.3 Inmunomodulación

La inmunomodulación es una estrategia que permite alterar uno o varios componentes del sistema inmunitario para amplificar, disminuir o regular el tipo, duración y/o competencia de una respuesta inmunológica (Lebish y Moraski, 1987). Distintos compuestos de origen natural y sintético poseen propiedades químicas y biológicas que les permite fungir como inmunoestimulantes, inmunosupresores e inmunoadyuvantes en distintas terapias y vacunas (Minutti-Zanella et al., 2021).

Distintos organismos productores de veneno sintetizan moléculas con capacidad de activar o inhibir una respuesta inmunitaria. Las toxinas producidas por animales venenosos, incluidas serpientes, escorpiones, arañas, anémonas de mar y caracoles cono, por mencionar algunos, son capaces de interactuar con canales iónicos y otros componentes del sistema inmunológico. En este sentido, es posible emplear estas toxinas para el desarrollo de diversos tratamientos contra distintas patologías infecciosas, desordenes autoinmunes y cáncer, promoviendo así, las bases de la inmunomodulación (Jimenez et al., 2018; Minutti-Zanella et al., 2021).

1.1.4 Caracoles cono

Los caracoles cono son un grupo de moluscos gasterópodos que pertenecen a la superfamilia *Conoidea*. Los conos son predadores que emplean distintas estrategias de caza, sin embargo, todos comparten las características de poseer una glándula venenosa y una rádula en forma de arpón, las cuales emplean para administrar veneno e inmovilizar a sus presas (gusanos de mar, peces, moluscos y crustáceos) (Terlau y Olivera, 2004; Biggs et al., 2010). Distintas clasificaciones taxonómicas se han empleado para agrupar a los conos, no obstante, se ha propuesto clasificar a los conos con base en un análisis filogenético en seis géneros: *Conus, Conasprella, Lilliconus, Profundiconus, Pygmaeconus* y *Californiconus,* abarcando *Conus* el 85% de las especies conocidas (Puillandre et al., 2015; Fedosov et al., 2021).

1.1.4.1 Generalidades del veneno

El veneno de los caracoles cono está conformado por una extensa variedad de compuestos bioactivos que actúan en distintos sitios diana, incluyendo canales iónicos, receptores acoplados a proteína G y transportadores (Inserra y Lewis, 2011). Aproximadamente 70,000 péptidos distintos son producidos por el género *Conus* (50-200 péptidos por cono), cuya variedad depende de su dieta y de las condiciones ambientales en las que se encuentran (Olivera et al., 1999; Akondi et al., 2014).

Los compuestos peptídicos presentes en el veneno de los conos se suelen clasificar en 2 categorías: conopéptidos y conotoxinas. El primer grupo está compuesto por péptidos con baja o nula presencia de enlaces disulfuro, mientras que el segundo grupo conforma la mayoría de los péptidos presentes en el veneno de los conos, y se caracterizan por la presencia de múltiples enlaces disulfuro y aminoácidos con modificaciones post-traduccionales (Kaas et al., 2010; Akondi et al., 2014).

1.1.4.2 Conotoxinas

Las conotoxinas son péptidos cortos de 10 a 30 aminoácidos presentes en el veneno de los caracoles cono. Se caracterizan por su elevado contenido de residuos alternados de cisteína, lo que permite la formación de enlaces disulfuro que le confieren rigidez y estabilidad a través de distintos arreglos y estructuras secundarias (Kaas et al., 2010). Las conotoxinas poseen una alta selectividad y especificidad por su receptor, incluyendo: canales iónicos dependientes de voltaje y ligando, receptores acoplados a proteína G y transportadores de neurotransmisores (Inserra y Lewis, 2011).

Las conotoxinas se clasifican de acuerdo con distintos parámetros moleculares (Figura 2). Estas toxinas se agrupan en 28 superfamilias descritas actualmente, tomando en cuenta su secuencia señal (secuencia consenso), presente en la porción amino terminal del marco abierto de lectura (Dao et al., 2017). Asimismo, cada superfamilia se puede subclasificar en familias tomando en cuenta el arreglo de cisteínas (patrón de cisteínas) presente en su estructura. Además, existe una tercera clasificación que agrupa a las conotoxinas en familias farmacológicas con base en la actividad que desempeñan y el sitio diana en el actúan (Kaas et al., 2010; Akondi et al., 2014). Algunas dianas moleculares de estas toxinas incluyen canales iónicos dependientes de voltaje para Na⁺, K⁺ y Ca²⁺, receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR), receptores adrenérgicos, de somatostatina y transportadores de noradrenalina, por mencionar algunos (Kaas et al., 2010).



Figura 2. Clasificación de conotoxinas. Las conotoxinas se clasifican en 3 categorías. De acuerdo con la similitud en la secuencia señal presente en los precursores se clasifican en "superfamilias". Durante el proceso de maduración, existen modificaciones post-traduccionales, lo que incluye la formación de enlaces disulfuro. Las toxinas se clasifican de acuerdo con el número y la disposición de las cisteínas en varios "patrones de cisteína". Finalmente, estas toxinas actúan en distintos receptores, en donde la clase de receptor y efecto que ejercen define a las "familias farmacológicas". Modificado de Kaas et al., 2010.

Distintas conotoxinas han sido caracterizadas con efectos inmunomoduladores. Entre estas se encuentran las κ -conotoxinas PVIIA y RIIIK, aisladas del veneno de *Conus purpurascens* y *Conus radiatus* respectivamente, las cuales actúan en distintos canales de potasio dependientes de voltaje (Shon et al., 1998; Ferber et al., 2004). Estos canales de potasio se encuentran en distintas células inmunitarias, y se encuentran implicados en diversos procesos inmunológicos como la activación y proliferación de macrófagos y linfocitos T (Inserra y Lewis, 2011). Otro ejemplo es GVIIIA, una σ -conotoxina aislada del veneno de *Conus geographus* y con capacidad de inhibir el receptor de serotonina tipo 3 (5-HT₃). Este receptor se encuentra involucrado en el flujo de iones divalentes; los cuales fungen como segundos mensajes en distintas vías de señalización, al interior de las células inmunitarias como monocitos, macrófagos, neutrófilos y mastocitos (England et al., 1998; Inserra y Lewis, 2011).

Otras toxinas con actividad inmunomoduladora son las α -conotoxinas, las cuales tienen como blanco los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) (Hopkins et al., 1995). El nAChR se encuentra involucrado en distintos procesos como proliferación de linfocitos T, activación de linfocitos B y producción de anticuerpos, así como regulación de distintas citocinas proinflamatorias en neutrófilos y macrófagos, por mencionar algunos (De Jonge y Ulloa, 2007; Inserra y Lewis, 2011). Ejemplo de estas toxinas son ImI y PnIA, aisladas de los venenos de *Conus imperialis* y *Conus pennaceus* respectivamente, y con actividad antagonista del nAChR α 7 (McIntosh et al., 1994; Luo et al., 1999).

Asimismo, se han evaluado distintas conotoxinas sintéticas con actividad en células inmunitarias. Ejemplo de esto son cal14.1b y cal14.2c, conotoxinas sintéticas derivadas del veneno de *Californiconus californicus*, las cuales mostraron un incremento intracelular en la producción de la interleucina 10 (IL-10), en linfocitos T reguladores (Zazueta-Favela et al., 2019).

1.1.4.3 Conasprella ximenes

Conasprella ximenes es un cono con un tamaño aproximado de 20-60 mm, de color blanco con hileras de espirales rectas punteadas de color marrón (Paredes et al., 2010) (Figura 3). Su distribución abarca desde el Golfo de California y la costa oeste de México hasta Perú.

En 2013, Cervantes-Luévano analizó dos péptidos sintéticos; Xm1a y Xm1b, aislados del veneno de *Conasprella ximenes*, en la actividad inmunomoduladora de macrófagos de ratón. Los resultados mostraron un aumento significativo en la producción de IL-1 β y TNF- α ; las cuales son dos citocinas proinflamatorias de gran importancia para la eliminación de distintos patógenos. Asimismo, se determinó que estas toxinas actúan en los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR), lo que las clasifica como α conotoxinas. En 2018 se reportó I1_xm11, una conotoxina de *C. ximenes* la cual mostró actividad antimicobacteriana (Figueroa-Montiel et al., 2018). A pesar de lo anterior, la actividad de las conotoxinas presentes en el veneno de *Conasprella ximenes*, no han sido ampliamente estudiadas, lo que supone una fuente potencial favorable para la exploración de nuevos agentes terapéuticos.



Figura 3. Características de *Conasprella ximenes***.** Esta especie se caracteriza por ser relativamente pequeña (20-60 mm) y por tener una concha de color blanco violáceo con algunas bandas irregulares de color pardo oscuro. En toda la vuelta corporal se distinguen hileras espirales de manchas pequeñas cuadradas y rectangulares con espirales marrones punteadas en el exterior y un color lavanda pálido en el interior. Imagen obtenida del Registro Mundial de Especies Marinas (WoRMS).

1.2 Justificación

El veneno de los caracoles cono contiene una gran variedad de compuestos con potencial terapéutico, los cuales no han sido ampliamente estudiados. Entre estos, se encuentran las conotoxinas; pequeñas proteínas con capacidad de actuar en distintos canales iónicos presentes en las células inmunitarias (linfocitos T y B, macrófagos, monocitos, células dendríticas, entre otras), y que regulan distintas actividades como la activación, proliferación, desarrollo, diferenciación y migración de estas células. Asimismo, estas toxinas se caracterizan por poseer una alta estabilidad y especificidad por sus dianas moleculares. Debido a lo anterior, las conotoxinas son moléculas candidatas ideales para modular la respuesta inmunitaria, con la finalidad de desarrollar potenciales terapias contra infecciones, trastornos autoinmunes y/o cáncer. En este trabajo, se evaluó el efecto inmunomodulador del veneno total de *C. ximenes* en un modelo murino, y posteriormente, el efecto de las fracciones cromatográficas aisladas a partir del veneno, mediante ensayos en cultivo celular.

1.3 Hipótesis

Al menos una de las toxinas extraídas del veneno de *Conasprella ximenes*, afecta la regulación o proliferación de células inmunitarias.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Dilucidar la actividad inmunomoduladora de los compuestos extraídos del veneno de Conasprella ximenes.

1.4.2 Objetivos específicos

- 1. Evaluar el efecto *in vivo* del veneno total de *Conasprella ximenes*, en el balance de células del sistema inmunitario innato y adaptativo.
- 2. Evaluar el efecto de las fracciones cromatográficas del veneno de *Conasprella ximenes*, en la activación o proliferación de células inmunitarias.
- 3. Caracterizar el efecto biológico de los péptidos aislados de las fracciones cromatográficas.

2.1 Veneno

Para este proyecto, se utilizaron 2 muestras de veneno total de *Conasprella ximenes* previamente liofilizadas y almacenadas a -80°C. Los especímenes fueron colectados en Bahía de los Ángeles, Baja California, en febrero 2015 (266 mg) y febrero 2018 (75.6 mg).

2.1.1 Extracción del veneno y procesamiento del veneno

La obtención del veneno se realizó por medio de la extracción de los ductos venenosos de cada caracol. Para extraer al animal de su concha, se centrifugó a 4,500 *g* por 7 minutos a 4°C. Posteriormente, se procedió a aislar el ducto venenoso y macerarlo con un homogenizador manual de vidrio, la muestra se mantuvo en hielo y se adicionó una solución de 1 mL de acetonitrilo (ACN) al 40% en agua por cada 20 ductos. Finalmente, la muestra se centrifugó a 10,000 *g* por 5 minutos a 4°C por duplicado para eliminar residuos de tejido. El sobrenadante resultante se congeló a -80°C para su posterior liofilización (Martínez, 2010; Bernáldez, 2013). Las muestras de veneno total previamente liofilizadas fueron hidratadas con solución A (H₂0 grado HPLC al 99.9%, TFA al 0.1%) hasta alcanzar una concentración aproximada de 25 mg/mL. Las muestras se centrifugaron a 14,000 rpm por 5 min a 4°C y el sobrenadante se colocó en alícuotas de 1mL en tubos de 1.5 mL. Los tubos se almacenaron a -80°C para su posterior fraccionamiento por HPLC.

2.2 Fraccionamiento del veneno por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC)

El extracto de veneno total se fraccionó de acuerdo con el tiempo de retención de sus componentes por medio de cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC), en un cromatógrafo Agilent 1220. Para este procedimiento se utilizó una columna analítica Zorbax 300SB-C18 (4.6 x 250 mm, 300 Å), con una pre-columna Zorbax C18 (4.6 x 12.5mm, 5µm) ambas equilibradas en solución A (H₂0 grado HPLC al 99.9%, TFA al 0.1%) por 20 minutos (Martínez, 2010; Bernáldez, 2013).

La muestra [5 mg / 200 μ L] se eluyó a temperatura ambiente por 65 minutos y se utilizó un gradiente lineal de 0 al 60% de solución B (ACN al 99.9% y TFA al 0.1%), y se colectaron las fracciones cada 5 minutos. La detección de los péptidos se realizó por la absorbancia de la luz UV, a una longitud de onda de 230 nm. Por último, las fracciones fueron liofilizadas y almacenadas a -80°C para su posterior utilización en los ensayos celulares.

2.2.1 Repurificación de las fracciones cromatográficas con actividad inmunomoduladora

La repurificación de las fracciones con actividad inmunomoduladora se realizó por medio de RP-HPLC, en un cromatógrafo Agilent 1220 con una columna analítica Zorbax 300SB-C18 (4.6 x 250 mm, 300 Å), y una pre-columna Zorbax C18 (4.6 x 12.5 mm, 5µm), ambas equilibradas en solución A. Se empleó una estrategia de trabajo de acuerdo con el tiempo de retención de cada componente, y se eluyó la fracción de interés en un gradiente de solución B (Martínez, 2010; Bernáldez, 2013).

2.3 Modelo animal

Se utilizaron ratones hembra de la cepa BALB/c, de entre 6-8 semanas de edad, con un peso aproximado de 18-20 gramos. Se mantuvieron en jaulas en una habitación especializada (Sistema Optimice), con periodos de luz/oscuridad alternados de 12 horas, a una temperatura de 24°C, proporcionándoles alimento y agua *ad libitum*.

2.4 Inoculación y sacrificio del ratón

Para evaluar el efecto del veneno de *Conasprella ximenes* en la respuesta inmunitaria, así como para determinar qué poblaciones celulares del sistema inmunitario innato y adaptativo se ven afectadas, se realizó un primer ensayo con veneno total en donde se administraron 20 µL de Adyuvante Completo de Freund (ACF) a 8 ratones (n=4), mediante inoculación en la almohadilla plantar en el día 1 (NIH, 2019).

Posteriormente, en el día 7 se administró un refuerzo del ACF; se separaron 4 ratones como grupo control y 4 ratones para el grupo experimental.

Al grupo control se le administró una dosis de 10 μ L de ACF y 10 μ L de solución salina, y al grupo experimental se le inoculó una mezcla de 10 μ L de ACF con 10 μ L de veneno de *C. ximenes*, a una concentración de 200 μ g/mL, en la almohadilla plantar (Tabla 1).

Grupo	Sustancia	Dosis	No. De animales
	Emulsión de Adyuvante	20 μL (1mg/ml)	
	Completo de Freund		
Control	+	Dosis 7 días después:	4
	Emulsión de ACF /	10 μL (1mg/ml) /	
	Solución salina	10 μL solución salina	
	Emulsión de Adyuvante	20 μL (1mg/ml)	
	Completo de Freund		
Experimental	+	Dosis 7 días después:	4
	Emulsión de ACF /	10 μL (1mg/ml) /	
	Veneno total de C. ximenes	10 μL (200 μg/mL)	

Tabla 1. Diseño experimental para la inmunización de ratones con veneno total de Conasprella ximenes.

2.5 Obtención de sangre total y suero

Para la obtención de la sangre total, los ratones se anestesiaron con una combinación de ketamina (100 mg/kg) y xilacina (10 mg/kg) en una dosis de 200 μ L (100 mg/mL), por vía intraperitoneal (i.p.) y se colocaron sobre su espalda en una tabla de disección. Se rociaron con etanol al 70% para esterilizar el área y disminuir la probabilidad de contaminación. La obtención de la sangre total se realizó mediante colección cardiaca, se utilizó una jeringa de 3 mL con un calibre de 22 Gauche. La aguja se inserta perpendicular al plano de la mesa a la altura del codo; en donde se localiza el corazón aproximadamente, y se aplica ligera presión con la jeringa. Una vez que la aguja llega al corazón, la sangre fluye en la jeringa (Parasuraman et al., 2010).

Después, la sangre se centrifugó a 2500 rpm por 15 minutos para separar el suero, el cual se colectó y se almacenó a -80°C para su uso en experimentos posteriores. Una vez obtenido el suero, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical de acuerdo con el procedimiento establecido en la NOM-062-ZOO-1999.

2.6 Extracción y disgregación de ganglios linfáticos

Para la detección de las poblaciones de células inmunológicas, se utilizaron los ganglios linfáticos poplíteos e inguinales de ratón. Para esto, los ratones fueron colocados en una tabla y rociados con etanol al 70% para evitar contaminación. Después, se realizó una incisión vertical en la parte ventral del ratón y la piel fue removida para exponer los ganglios (Figura 4).



Figura 4. Órganos linfáticos de ratón. Disección del ratón que muestra los ganglios linfáticos y su localización anatómica. Modificado de Reeves & Reeves, 2001.

Posteriormente, los ganglios se colocaron en una placa y se disgregaron de forma mecánica mediante maceración del tejido con ayuda de un émbolo, seguido de una filtración de la muestra con ayuda de una jeringa de 3 mL y un filtro para células (Corning [™], poro de 70 µm). Los filtrados se colocaron en tubos de 15 mL, y el filtro y la jeringa se lavaron con 2 mL de solución de Hank (HBSS). Finalmente, el tubo con células se resuspendió en 1 mL de HBSS, el cual se centrifugó a 800 g (Heraeus) durante 10 minutos a 4°C.

Después, el sobrenadante se decantó, y el sedimento se resuspendió con 1 mL de HBSS para realizar una tinción con azul de tripano (0.4%) a una dilución 1:10 (Zazueta, 2017; Cota, 2018). Finalmente, se realizó un conteo celular con un hematocitómetro y un microscopio óptico compuesto (EVOS, LifeTechnologies) para determinar el número de células por mL.

2.7 Evaluación del balance de células inmunitarias por citometría de flujo

En este ensayo, se evaluó el efecto del veneno total en el cambio del número de células inmunológicas del grupo experimental con respecto al grupo control, por medio de citometría de flujo (Attune, Applied Biosystems). Para la identificación de las células, se utilizaron kits fenotípicos de ratón con anticuerpos específicos acoplados a fluorocromos (BioLegend y eBioscience), contra los marcadores de las células inmunitarias del sistema innato y adaptativo a analizar (Tabla 2). Los anticuerpos utilizados corresponden a las células presentes en ganglios linfáticos. Para el caso de la inmunidad adaptativa, se incluyen los linfocitos B y T, y para la inmunidad innata se incluyen las células presentadoras de antígeno; células

Tabla 2. Marcadores para citometría de flujo de las poblaciones inmunológicas en ganglio de ratón. Se muestran los anticuerpos para citometría de flujo de macrófagos, células dendríticas convencionales, linfocitos T (cooperadores y citotóxicos) y linfocitos B. Obtenido de (Carlson et al., 2021). APC; aloficocianina, FITC; isotiocianato de fluoresceína, PE; ficoeritrina, PE Cy5; ficoeritrina-cianina 5, PE Cy7; ficoeritrina-cianina 7.

Células inmunológicas	Marcadores celulares	Fluorocromos		
Macrófagos	CD11b ⁺ , CD11c ⁺ , F4/80 ⁺	CD11b-PE, CD11c-FITC, F4/80-PE Cy7		
Células dendríticas convencionales	CD11b ⁻ , CD11c ⁺ , MHCII ⁺	CD11b-PE, CD11c-FITC, MHCII-PE Cy7		
Linfocitos T	CD3⁺	CD3-PE Cy5		
-Linfocitos cooperadores	CD4⁺	CD4-FITC		
-Linfocitos citotóxicos	CD8⁺	CD8-APC		
Linfocitos B	CD19⁺	CD19-PE Cy7		
Células inmunológicas	Marcadores de activación			
Células dendríticas	CD86⁺	CD86-APC		
Células inmunológicas	Marcadores de migración			
Linfocitos	CD62L⁺	CD62L-PE		

2.8 Cultivo celular

Una vez determinado el efecto *in vivo* del veneno total, se procedió a realizar ensayos en cultivo celular en líneas celulares específicas de las poblaciones de células inmunitarias que se vieron moduladas. Se realizaron ensayos de diferenciación y proliferación, y se utilizó la línea celular THP-1 de monocitos humanos en ambos casos.

2.8.1 Línea celular THP-1

Para los ensayos de diferenciación y proliferación, se sembraron 1×10^4 células por pozo en una placa de 96 pozos. Se empleó medio completo RPMI-1640 (SFB al 10% y antibiótico / antimicótico al 1%) en un volumen de 100 µL, y se incubaron por 24 horas a 37º C a una atmósfera de CO₂ al 5%. Transcurrido este tiempo, y debido a que las células de esta línea celular se encuentran en suspensión, se centrifugó la placa a 300 *g* por 10 minutos a temperatura ambiente, para concentrar las células en el centro de los pozos y poder realizar un cambio de medio.

2.8.2 Ensayo de citotoxicidad (MTS)

Se evaluó el posible efecto citotóxico del veneno total de *C. ximenes* en la línea celular THP-1. Para esto, se siguieron las condiciones descritas en el apartado 2.8.1. Posteriormente, se retiró el medio y se adicionó nuevo medio junto con el veneno total a una concentración de 200 µg/mL en el pozo correspondiente (Figura 5). La placa se incubó por 24 horas y se procedió a realizar un ensayo de viabilidad celular con 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio (MTS).



Figura 5. Diseño experimental del ensayo de citotoxicidad (MTS). Las células con veneno total, así como los controles utilizados fueron evaluados por triplicado. PBS; Solución salina amortiguadora de fosfatos 1X estéril, pH 7.4, DMSO; Dimetilsulfóxido al 10%.

Este ensayo se basa en la reducción del compuesto MTS a formazán, mediante enzimas deshidrogenasas dependientes de NADPH, en células metabólicamente activas (Kuete et al., 2017). La densidad óptica fue

leída a 492 nm en el lector de placas (Epoch, BioTech), y la viabilidad celular se expresó como porcentaje de células vivas comparadas con el control sin tratamiento.

2.8.3 Evaluación de las fracciones (FII – FXIII) de C. ximenes (febrero 2018)

Se evaluó el efecto de las fracciones obtenidas por RP-HPLC del veneno de C. *ximenes* en la diferenciación de monocitos a macrófagos (febrero 2018). Para esto, se siguieron las condiciones establecidas en el apartado 2.8.1. Después se retiró el medio y se adicionó medio suplementado con forbol 12-miristato 13acetato (PMA), a una concentración de 50 nM, junto con las fracciones a una concentración entre 36-50 µg/mL y el veneno total a una concentración de 200 µg/mL (Figura 6).



Figura 6. Diseño experimental del ensayo de diferenciación a macrófagos con fracciones de *C. ximenes* (febrero **2018).** Las fracciones II-XIII, el veneno total y los controles fueron evaluados por triplicado. Las concentraciones empleadas para cada fracción se describen en la parte derecha. Se adicionó PBS en la periferia de la placa para evitar evaporación. PBS; Solución salina amortiguadora de fosfatos 1X estéril, pH 7.4, PMA; forbol 12-miristato 13-acetato.

La placa se incubó por 48 horas para lograr la diferenciación de monocitos a macrófagos. Una vez diferenciados los monocitos a macrófagos, estos cambian su morfología y se vuelven células adherentes (Anexo A2). Transcurrido este tiempo, se retiró el medio y se lavó la placa con PBS para eliminar todas las células no adherentes (monocitos sin diferenciar). Posteriormente, se adicionó medio completo (RPMI-1640) y se realizó un ensayo con MTS. La densidad óptica fue leída a 492 nm en el lector de placas (Epoch, BioTech), y la diferenciación a macrófagos se expresó en términos de viabilidad celular como el porcentaje de células vivas comparadas con el control positivo.

2.8.4 Evaluación de las subfracciones de C. ximenes (febrero 2018)

Se evaluó el efecto de las subfracciones repurificadas por RP-HPLC de las fracciones FIV, FVI y FX, en la diferenciación de monocitos a macrófagos. Para esto, se siguieron las condiciones establecidas en el apartado 2.8.1. Después, se retiró el medio y se adicionó medio suplementado con forbol 12-miristato 13acetato (PMA), a una concentración de 50 nM, junto con las subfracciones a una concentración entre 19.5-50 μg/mL (Figuras 7 y 8).



Figura 7. Diseño experimental del ensayo de diferenciación a macrófagos con subfracciones de la fracción IV de *C. ximenes.* Las subfracciones y los controles fueron evaluados por triplicado. Las concentraciones empleadas para cada subfracción se describen en la parte derecha. Se adicionó PBS en la periferia de la placa para evitar evaporación. PBS; Solución salina amortiguadora de fosfatos 1X estéril, pH 7.4, PMA; forbol 12-miristato 13-acetato.

La placa se incubó por 48 horas para lograr la diferenciación de monocitos a macrófagos. Una vez diferenciados los monocitos a macrófagos, estos cambian su morfología y se vuelven células adherentes. Transcurrido este tiempo, se retiró el medio y se lavó la placa con PBS para eliminar todas las células no adherentes (monocitos sin diferenciar). Se adicionó medio completo y realizó un ensayo con MTS.

La densidad óptica fue leída a 492 nm en el lector de placas (Epoch, BioTech), y la diferenciación a macrófagos se expresó en términos de la viabilidad celular como el porcentaje de células vivas comparadas con el control positivo.



Figura 8. Diseño experimental del ensayo de diferenciación a macrófagos con subfracciones de las fracciones VI y X de *C. ximenes.* Las subfracciones y los controles fueron evaluados por triplicado. Las concentraciones empleadas para cada subfracción se describen en la parte derecha. Se adicionó PBS en la periferia de la placa para evitar evaporación. PBS; Solución salina amortiguadora de fosfatos 1X estéril, pH 7.4, PMA; forbol 12-miristato 13-acetato.

2.8.5 Evaluación de las fracciones (FII – FXIII) de C. ximenes (febrero 2015)

Inicialmente se evaluó el efecto de las fracciones obtenidas por RP-HPLC del veneno de *C. ximenes* en la diferenciación de monocitos a macrófagos, de acuerdo con las condiciones descritas en los apartados 2.8.1 y 2.8.3. (Figura 9). Posteriormente, se evaluó el efecto de las fracciones en la proliferación de los monocitos THP-1. Para esto, se siguieron las condiciones establecidas en el apartado 2.8.1.Después, se retiró el medio y se adicionó medio completo RPMI-1640, junto con las fracciones a una concentración entre 15-60 µg/mL (Figura 9).

La placa se incubó por 48 horas y se realizó una centrifugación a 300 *g* por 10 minutos a temperatura ambiente, para realizar un cambio de medio. Finalmente se adicionó medio completo y se realizó un ensayo con MTS. La densidad óptica fue leída a 492 nm en el lector de placas (Epoch, BioTech), y la proliferación de monocitos se expresó en términos de la viabilidad celular como el porcentaje de células vivas comparadas con el control (células sin tratamiento).

2.8.6 Evaluación de las subfracciones de *C. ximenes* (febrero 2015)

Se evaluó el efecto de las subfracciones repurificadas por RP-HPLC de las fracciones VIII y XII en la proliferación de monocitos. Para esto, se siguieron las condiciones establecidas en el apartado 2.8.1. Después, se retiró el medio y se adicionó medio completo RPMI-1640, junto con las subfracciones a una concentración entre 2-57 µg/mL (Figura 10). La placa se incubó por 48 horas y se realizó una centrifugación a 300 *g* por 10 minutos a temperatura ambiente, para realizar un cambio de medio. Finalmente se adicionó medio completo y se realizó un ensayo con MTS. La densidad óptica fue leída a 492 nm en el lector de placas (Epoch, BioTech), y la proliferación de monocitos se expresó en términos de la viabilidad celular como el porcentaje de células vivas comparadas con el control (células sin tratamiento).

2.9 Análisis estadístico

Todos los datos generados en los ensayos por citometría y de cultivo celular fueron analizados mediante una ANOVA de 1 o 2 vías, y se consideró un valor de P menor a 0.05 como significativo. Este análisis, así como los gráficos, fueron generados mediante el software GraphPad Prism 9.0.1.



Figura 9. Diseño experimental del ensayo de diferenciación a macrófagos y proliferación de monocitos con fracciones de *C. ximenes* (febrero 2015). Las fracciones y los controles fueron evaluados por triplicado. Se utilizó el mismo diseño experimental para los ensayos de diferenciación y de proliferación. Las concentraciones empleadas para cada fracción se describen en la parte derecha. Se adicionó PBS en la periferia de la placa para evitar evaporación. PBS; Solución salina amortiguadora de fosfatos 1X estéril, pH 7.4, PMA; forbol 12-miristato 13-acetato.



Figura 10. Diseño experimental del ensayo de proliferación de monocitos con subfracciones del veneno de *C. ximenes.* Las subfracciones y los controles fueron evaluados por triplicado. Las concentraciones empleadas para cada subfracción se describen en la parte derecha. Se adicionó PBS en la periferia de la placa para evitar evaporación. PBS; Solución salina amortiguadora de fosfatos 1X estéril, pH 7.4.

3.1 Fraccionamiento del veneno

Las fracciones del veneno de *Conasprella ximenes* fueron obtenidas mediante cromatografía de líquidos de alta resolución en fase reversa. Para la primera fase del fraccionamiento, se utilizó una muestra de veneno total (75.6 mg) colectada en febrero de 2018, previamente hidratada con solución A. Se realizaron 14 corridas con una duración de 70 minutos, se inyectaron 200 µL de muestra (25 mg/mL), y se recuperaron las fracciones cada 5 minutos.

En la Figura 11 se muestra el cromatograma representativo de este lote, en donde se obtuvieron 13 fracciones (I-XIII) del veneno total por corrida. Posteriormente, se utilizó un segundo lote de veneno total (266 mg) colectado en febrero de 2015, de acuerdo con los parámetros de colecta anteriormente mencionados. En la Figura 12 se observa el cromatograma representativo para este segundo lote.



Figura 11. Perfil cromatográfico del veneno total de *Conasprella ximenes* (febrero 2018). Cromatograma representativo de 14 corridas obtenidas de 75.6 mg de veneno total. Se colectaron 13 fracciones cada 5 minutos en una corrida de 70 minutos.



Figura 12. Perfil cromatográfico del veneno total de *Conasprella ximenes* (febrero 2015). Cromatograma representativo de 32 corridas obtenidas de 266 mg de veneno total. Se colectaron 13 fracciones cada 5 minutos en una corrida de 70 minutos.



Figura 13. Comparación de perfiles cromatográficos de veneno total de *C. ximenes.* Cromatogramas superpuestos representativos de 2 muestras de veneno total de *C. ximenes.* El veneno colectado en febrero 2018 se muestra de color azul y el veneno colectado en febrero 2015 se observa de color verde.

3.2 Efecto del veneno total de C. ximenes en el balance de células inmunitarias

Para obtener un panorama general del efecto del veneno total de *C. ximenes* en el sistema inmunitario, así como para cumplir con el primer objetivo, se realizó un ensayo *in vivo* en ratones (BALB/c), para medir el cambio de células inmunitarias con respecto a dos grupos (control y experimental), por medio de citometría de flujo. Para esto, se utilizaron los ganglios poplíteos e inguinales, y las células obtenidas fueron contadas con ayuda de un hematocitómetro (Tabla 3). Posteriormente, se realizó la tinción con anticuerpos contra dichas células y se observó el cambio mediante citometría de flujo.

De acuerdo con los resultados, para el caso de la inmunidad innata, el veneno total no mostró ningún cambio en la población de células dendríticas del grupo experimental con respecto al grupo control, sin embargo, se observó una disminución en la población de macrófagos del grupo experimental comparado contra el grupo control (Figura 14). En el caso de la inmunidad adaptativa, las células fueron separadas como linfocitos T (CD3⁺) y linfocitos B (CD3⁻, CD19⁺). De acuerdo con los resultados, no se observó ningún cambio en el balance de linfocitos T; tanto cooperativos (CD4⁺) como citotóxicos (CD8⁺) (Figuras 15 y 17), ni de linfocitos B (Figuras 16 y 17), con respecto al grupo control. Sin embargo, hubo una disminución en la migración de linfocitos B por parte del grupo experimental; representado como una disminución de CD62L, en comparación con el grupo control (Figura 18).

Grupo control	No. de células	Grupo experimental	No. de células
C1	17,000,000	VT1	12,500,000
C2	16,500,000	VT2	10,500,000
C3	14,250,000	VT3	10,500,000
C4	10,000,000	VT4	19,250,000

Tabla 3. Conteo celular de ganglios poplíteos e inguinales de los grupos control y experimental

3.3 Ensayo de citotoxicidad del veneno total de C. ximenes

Para descartar que la disminución de macrófagos en el ensayo por citometría se debiera a un posible efecto citotóxico del veneno total, se realizó un ensayo de viabilidad celular con MTS. Para esto, se utilizaron monocitos humanos de la línea celular THP. Los resultados de este experimento no mostraron un efecto citotóxico del veneno total a una concentración de 200 µg/mL (Figura 19).



CD11c+



B) Porcentaje de células dendríticas y macrófagos

Marcadores de inmunidad innata

Figura 14. Efecto *in vivo* del veneno total de *Conasprella ximenes*, en el balance de macrófagos y células dendríticas. A) Cambio en la población de macrófagos y células dendríticas del grupo experimental con respecto al grupo control, mediante la expresión CD11b y CD11c. Macrófagos; CD11b⁺, CD11c⁺, Células dendríticas; CD11b⁻, CD11c⁺. Citogramas de las 4 réplicas del grupo control (C1-C4) y del grupo experimental (VT1-VT4); correspondiente a ratones tratados con veneno total [200 µg/mL]. B) Cambio en la población de macrófagos (CD11b⁺, CD11c⁺, F4/80⁺), células dendríticas convencionales (CD11b⁻, CD11c⁺, MHC-II⁺), y células dendríticas activadas (CD86⁺), del grupo experimental con respecto al grupo control. Gráficas de barra representativas de 4 réplicas por grupo. DC; células dendríticas, Mo; macrófagos. Prueba estadística ANOVA de 2 vías. Los resultados estadísticamente significativos se muestran con asteriscos (**** P < 0.0001).

3.4 Evaluación de las fracciones de C. ximenes (febrero 2018) en la línea THP-1

Para cumplir con el segundo objetivo, se probó el efecto de 12 fracciones cromatográficas del veneno de *C. ximenes* (lote de febrero de 2018), en la capacidad de estimular o suprimir la diferenciación de monocitos a macrófagos, expuestos a PMA (50 nM).

De acuerdo con los resultados, las fracciones de *C. ximenes*, así como el veneno total, no ejercen ningún efecto significativo en la diferenciación de monocitos humanos a las concentraciones probadas. Sin embargo, se observó una tendencia en algunas fracciones; FIV, FVIII y FX mostraron un aumento en la diferenciación a macrófagos con respecto al control positivo, mientras que FVI mostró una disminución (Figura 20).



Figura 15. Efecto *in vivo* del veneno total de *C. ximenes*, en el balance y migración de linfocitos **T**. Cambio en la población de linfocitos T (cooperadores y citotóxicos), del grupo experimental; correspondiente a ratones tratados con veneno total [200 μg/mL], con respecto al grupo control. Cambio evaluado mediante la expresión CD4 y CD8, así como migración de linfocitos T mediante expresión de CD62L (observado mediante un cambio de color, en escala de azul a rojo). Linfocitos cooperadores; CD4⁺, Linfocitos citotóxicos; CD8⁺, Marcador de migración; CD62L⁺. Citogramas de las 4 réplicas del grupo control (C1-C4) y del grupo experimental (VT1-VT4).



Figura 16. Efecto *in vivo* del veneno total de *C. ximenes*, en el balance y migración de linfocitos B. Cambio en la población de linfocitos B del grupo experimental; correspondiente a ratones tratados con veneno total [200 µg/mL], con respecto al grupo control. Cambio evaluado mediante la expresión de CD19, así como su activación mediante la expresión de CD62L. Citogramas de las 4 réplicas del grupo control (C1-C4) y del grupo experimental (VT1-VT4).



Marcadores de inmunidad adaptativa

Figura 17. Efecto del veneno total de *C.ximenes* **en el balance de células inmunitarias adaptativas.** Cambio en la población de linfocitos T (CD3⁺); tanto cooperadores (CD4⁺), como citotóxicos (CD8⁺), así como de linfocitos B (CD19⁺), del grupo experimental; correspondiente a ratones tratados con veneno total [200 µg/mL], con respecto al grupo control. Gráficas de barra representativas de 4 réplicas por grupo. Prueba estadística ANOVA de 2 vías.





Figura 18. Efecto del veneno total de *C. ximenes* **en la migración de células inmunitarias adaptativas.** Porcentaje de migración de linfocitos T cooperadores (CD4⁺, CD62L⁺), citotóxicos (CD4⁺, CD62L⁺) y linfocitos B (CD4⁺, CD62L⁺). Gráficas de barra representativas de 4 réplicas del grupo control y del grupo experimental; correspondiente a ratones tratados con veneno total [200 µg/mL]. Prueba estadística ANOVA de 2 vías. Los resultados estadísticamente significativos se muestran con asterisco (*P < 0.05).



Figura 19. Ensayo de citotoxicidad del veneno total de *C. ximenes* en monocitos THP-1. Se sembraron en placa de 96 pozos, 1x10⁴ células por pozo en un volumen de 100 μL. Gráficas de barras representativas de 3 réplicas por grupo. Control positivo: DMSO, Blanco: medio RPMI-1640, Control: células sin tratamiento, Experimental: células tratadas con veneno total [200 μg/mL]. Prueba estadística ANOVA de 1 vía. No se muestra ninguna diferencia significativa (ns) con respecto al grupo experimental tratado con veneno total y al grupo control sin tratamiento.

3.5 Repurificación de las fracciones IV, VI y X (febrero 2018)

Para continuar con el análisis, se probó el efecto de las subfracciones cromatográficas de las fracciones IV, VI y X, previamente analizadas en ensayos de cultivo celular. Las fracciones fueron repurificadas por RP-HPLC de acuerdo con lo establecido en el apartado 2.2.1. El gradiente de elución utilizado para cada fracción se muestra en la Tabla 4, y los perfiles cromatográficos de las 3 fracciones utilizadas se muestran en las figuras 21, 22 y 23 respectivamente.

3.6 Evaluación de las subfracciones de FIV, FVI y FX (febrero 2018)

De acuerdo con los resultados en los ensayos de cultivo celular, para la fracción IV, no se observa ningún cambio significativo en la diferenciación de monocitos entre las subfracciones probadas, al compararlas contra el control positivo. Sin embargo, se observa una tendencia al alza en la subfracción FIV.2 (P=0.4436) (Figura 24). Para la fracción VI, tampoco se observó cambio significativo alguno, no obstante, las subfracciones FVI.2 y FVI.4 mostraron una tendencia al aumento (P=0.2385 y P=0.2286, respectivamente), mientras que FVI.6 mostró una tendencia a disminuir (P=0.3472) (Figura 25). De igual forma, para la fracción X, no se observó cambio significativo alguno en comparación con el control positivo, sin embargo, se observó una tendencia a disminuir al utilizar las subfracciones FX.7 y FX.11/12/13 (P=0.0532 y P=0.1389, respectivamente) (Figura 26).

3.7 Evaluación de las fracciones de *C. ximenes* (febrero 2015) en la línea THP-1

3.7.1 Ensayo de diferenciación de monocitos a macrófagos

Debido a que el veneno total del primer lote (febrero 2018) se terminó en los ensayos de cultivo celular, se procedió a repurificar un segundo lote (febrero 2015) de veneno total de *C. ximenes*. De forma similar a lo descrito en el apartado 2.4, se probó el efecto de 12 fracciones cromatográficas en la capacidad de estimular o suprimir la diferenciación de monocitos a macrófagos, expuestos a PMA (50 nM). Inicialmente se analizó el efecto de la fracción X, al ser la que tuvo una tendencia al alza (P= 0.0629), en los experimentos de cultivo celular con el lote anterior. Sin embargo, no hubo diferencia significativa al compararla con el control positivo (Figura 27).

Posteriormente, se probó el efecto de las fracciones restantes, y se observó una tendencia al alza en la fracción XII (P= 0.0648). No obstante, ninguna fracción mostró una diferencia significativa con respecto al control positivo (Figura 27).

3.7.2 Ensayo de proliferación de monocitos a macrófagos

Debido a que los ensayos previos en cultivo celular no mostraban un efecto en diferenciar los monocitos a macrófagos, se decidió probar el efecto de las fracciones en la proliferación de los monocitos, de acuerdo con la metodología descrita en el apartado 2.8.5. De acuerdo con los resultados, la fracción VIII del segundo lote de veneno total de *C. ximenes*, mostró un aumento significativo (P= 0.0464), con respecto al control negativo (Figura 28).

3.8 Repurificación de las fracciones VIII y XII (febrero 2015)

Tomando en cuenta que la fracción XII tuvo una tendencia al alza en el ensayo de diferenciación (Figura 27), se optó por repurificarla junto con la fracción VIII; la cual mostró un aumento significativo (P= 0.046), con la finalidad de probar las subfracciones en un ensayo de proliferación de monocitos. Las fracciones fueron repurificadas por RP-HPLC de acuerdo a lo establecido en el apartado 2.2.1.

El gradiente de elución utilizado para repurificar cada fracción se muestra en la Tabla 5, y los perfiles cromatográficos obtenidos de las dos fracciones utilizadas se muestran en las figuras 28 y 29 respectivamente.

3.9 Evaluación de las subfracciones de FVIII y FXII (febrero 2015)

De acuerdo con los resultados, las subfracciones FVIII.2 y FVIII.3 mostraron un aumento significativo (P=0.0151 y 0.0160, respectivamente), en la proliferación de monocitos con respecto al control (Figura 31). No obstante, ninguna subfracción de la fracción XII mostró un efecto.



Figura 20. Evaluación de las fracciones del veneno de *C. ximenes* (febrero 2018), en la diferenciación de monocitos de la línea THP-1. Se sembraron en placa de 96 pozos, $1x10^4$ células por pozo en un volumen de 100 µL y se incubaron con PMA [50 nM] por 48h. Ensayo de diferenciación por MTS (λ =492 nm). Gráficas de barra representativas de 3 réplicas por fracción. Prueba estadística ANOVA de 1 vía. No se muestra ninguna diferencia significativa (ns) entre las células tratadas con fracciones y veneno total con respecto al control positivo.

FIV			FVI			FX		
Tiempo (min)	% Sol. A	% Sol. B	Tiempo (min)	% Sol. A	% Sol. B	Tiempo (min)	% Sol. A	% Sol. B
0-5	100	0	0-5	100	0	0-5	100	0
5-35	70	30	5-35	70	30	5-65	40	60
35-40	0	100	35-40	0	100	65-70	0	100

Tabla 4. Gradiente de elución empleado para repurificación de las fracciones IV, VI y X. Solución A: H₂O/ TFA 0.1 %, Solución B: ACN/ TFA 0.1%.



Figura 21. Perfil cromatográfico de la fracción IV del veneno de *C. ximenes* **(febrero 2018).** Se inyectaron 114.2 µg y se obtuvieron 14 subfracciones (FIV.1-FIV.14).



Figura 22. Perfil cromatográfico de la fracción VI del veneno de *C. ximenes* (febrero 2018). Se inyectaron 104.4 µg en 2 corridas (52.2 µg por corrida) y se obtuvieron 7 subfracciones (FVI.1-FVI.7).



Figura 23. Perfil cromatográfico de la fracción X del veneno de *C. ximenes* (febrero 2018). Se inyectaron 78.6 µg y se obtuvieron 13 subfracciones (FX.1-FX.13). A) Cromatograma de los primeros 30 minutos de elución. B) Cromatograma de elución del minuto 30 al 70.



Figura 24. Evaluación de las subfracciones de FIV del veneno de *C. ximenes*, en la diferenciación de monocitos de la línea THP-1. Se sembraron en placa de 96 pozos, $1x10^4$ células por pozo en un volumen de 100 µL y se incubaron con PMA [50 nM] por 48h. Ensayo de diferenciación por MTS (λ =492 nm). Gráficas de barra representativas de 3 réplicas por subfracción. Prueba estadística ANOVA de 1 vía. No se observa diferencia significativa (ns) entre las células tratadas con subfracciones con respecto al control positivo.

3.10 Evaluación de las subfracciones de FVIII.2 y FVIII.3 (febrero 2015)

Para continuar con los ensayos en cultivo celular, se repurificó la fracción VIII por RP-HPLC. Las subfracciones FVIII.2 y FVIII.3 se separaron parcialmente, y se colectaron individualmente en 4 subfracciones; FVIII.2.1, FVIII.2.2, FVIII.3.1 y FVIII.3.2 (Figura 32). Posteriormente, se evaluó el efecto de estas subfracciones en la proliferación de monocitos.

De acuerdo con los resultados del ensayo de cultivo celular, las 4 subfracciones mostraron un aumento significativo en la proliferación de monocitos en comparación con el control, en donde FVIII.2.2 y FVIII.3.1 mostraron un mayor efecto (Figura 33). Posteriormente, se determinó el porcentaje de solución B al cual eluyeron las subfracciones (Tabla 6), a manera de repurificar y aislar las subfracciones de forma individual por medio de RP-HPLC empleando una nueva estrategia de trabajo.

Para esto, se utilizó el método isocrático, el cual mantiene constante el porcentaje del solvente (fase móvil), en un tiempo determinado. Sin embargo, no se lograron separar las subfracciones al utilizar un porcentaje de solución B del 26% en 30 minutos, de acuerdo con lo observado en la Figura 34. Para continuar con el análisis de las subfracciones, se concentró y repurificó más fracción VIII y se obtuvo el cromatograma correspondiente a la Figura 35. Las subfracciones FVIII.1, FVIII.2.1 y FVIII.2.2 fueron analizadas en cultivo celular y de acuerdo con los resultados, no se observó diferencia significativa alguna en comparación con el control (Figura 36).



Tratamientos

Figura 25. Evaluación de las subfracciones de FVI del veneno de *C. ximenes*, en la diferenciación de monocitos de la línea THP-1. Se sembraron en placa de 96 pozos, 1x10⁴ células por pozo en un volumen de 100 μL y se incubaron con PMA [50 nM] por 48h. Gráficas de barra representativas de 3 réplicas por subfracción. Prueba estadística ANOVA de 1 vía. No se muestra ninguna diferencia significativa (ns) entre las células tratadas con subfracciones con respecto al control positivo.

Finalmente, se optó por volver a mezclar las subfracciones FVIII.2.1 y FVIII.2.2, y probarlas de nuevo, esto con la finalidad de determinar si en conjunto recuperaban el efecto de aumentar la proliferación de monocitos, anteriormente evaluado. De acuerdo con los resultados, al analizar la mezcla de subfracciones (FVIII.2), se observó un aumento significativo en comparación con el control, correspondiente a células sin tratamiento (Figura 37).



Tratamientos

Figura 26. Evaluación de las subfracciones de FX del veneno de *C. ximenes***, en la diferenciación de monocitos de la línea THP-1.** Se sembraron en placa de 96 pozos, 1x10⁴ células por pozo en un volumen de 100 μL y se incubaron con PMA [50 nM] por 48h. Gráficas de barra representativas de 3 réplicas por subfracción. Prueba estadística ANOVA de 1 vía. No se muestra ninguna diferencia significativa (ns) entre las células tratadas con subfracciones con respecto al control positivo.



Figura 27. Evaluación de las fracciones del veneno de *C. ximenes* (febrero 2015), en la diferenciación de monocitos de la línea THP-1. Se sembraron en placa de 96 pozos, 1x10⁴ células por pozo en un volumen de 100 μL y se incubaron con PMA [50 nM] por 48h. Gráficas de barra representativas de 3 réplicas por fracción. A) Ensayo con fracciones X y XI. B) Ensayo con fracciones II-IX, XII y XIII. Prueba estadística ANOVA de 1 vía. No se muestra ninguna diferencia significativa (ns) entre las células tratadas con fracciones y veneno total con respecto al control positivo.



Figura 28. Evaluación de las fracciones del veneno de *C. ximenes* (febrero 2015), en la proliferación de monocitos de la línea THP-1. Se sembraron en placa de 96 pozos, $1x10^4$ células por pozo en un volumen de 100 µL y se incubaron por 48h. Ensayo de proliferación por MTS (λ =492 nm). Gráficas de barra representativas de 3 réplicas por fracción. Prueba estadística ANOVA de 1 vía. La FVIII mostró un aumento significativo (P= <0.05) con respecto al grupo control, correspondiente a células sin ningún tratamiento.

FVII			FXII		
Tiempo (min)	% Sol. A	% Sol. B	Tiempo (min)	% Sol. A	% Sol. B
0-5	100	0	0-5	100	0
5-40	80-55	20-45	5-40	60-40	40-60
40-45	0	100	40-45	0	100

Tabla 5. Gradiente de elución empleado para repurificación de las fracciones VIII y XII. Solución A: H₂O/ TFA 0.1%, Solución B: ACN/ TFA 0.1%



Figura 29. Perfil cromatográfico de la fracción VIII del veneno de *C. ximenes* (febrero 2015). Se inyectaron 43.6 µg y se obtuvieron 8 subfracciones (P1-P8).



Figura 30. Perfil cromatográfico de la fracción XII del veneno de *C. ximenes* **(febrero 2015).** Se inyectaron 30.8 µg y se obtuvieron 5 subfracciones (P1-P5).



Figura 31. Evaluación de las subfracciones de FVIII y FXII del veneno de *C. ximenes*, en la proliferación de monocitos. Se sembraron en placa de 96 pozos, $1x10^4$ células por pozo en un volumen de 100 µL y se incubaron por 48h. Ensayo de proliferación por MTS (λ =492 nm). Gráficas de barra representativas de 3 réplicas por subfracción. Prueba estadística ANOVA de 1 vía. Las subfracciones FVIII.2 y FVIII.3 mostraron un aumento significativo (P= <0.05) con respecto al grupo control, correspondiente a células sin ningún tratamiento.



Figura 32. Perfil cromatográfico de la primera repurificación de fracción VIII de *C. ximenes* (febrero 2015). Se inyectaron 43.6 µg y las subfracciones FVIII.2 y FVIII.3 se separaron parcialmente en 4 subfracciones; FVIII.2.1, FVIII.2.2, FVIII.3.1 y FVIII.3.2.



Figura 33. Evaluación de las subfracciones FVIII.2.1, FVIII.2.2, FVIII.3.1 y FVIII.3.2, en la proliferación de monocitos. Se sembraron en placa de 96 pozos, $1x10^4$ células por pozo en un volumen de 100 µL y se incubaron por 48h. Ensayo de proliferación por MTS (λ =492 nm). Gráficas de barra representativas de 3 réplicas por subfracción. Prueba estadística ANOVA de 1 vía. Las 4 subfracciones analizadas mostraron un aumento significativo (P= <0.05) con respecto al grupo control, correspondiente a células sin ningún tratamiento.

Subfracción	Inicio de elución en solución B		
FVIII.2.1	28.03 %		
FVIII.2.2	29.06 %		
FVIII.3.1	29.58 %		
FVIII.3.2	29.84 %		

Tabla 6. Porcentaj	je de elución en	solución B de la	as subfracciones	de C. ximenes.
--------------------	------------------	------------------	------------------	----------------



Figura 34. Perfiles cromatográficos de la repurificación de las subfracciones FVIII.2 y FVIII.3 de *C. ximenes***, por método isocrático.** Se repurificaron las subfracciones A) FVIII.2 y B) FVIII.3 mediante RP-HPLC, se inyectaron 23 y 28.8 µg en 200 µL respectivamente. Se utilizó un porcentaje constante de solución B al 26% por 30 minutos.



Figura 35. Perfil cromatográfico de la segunda repurificación de fracción VIII de *C. ximenes* (febrero 2015). Se inyectaron 117.6 µg y se obtuvieron la subfracciones FVIII.1 y FVIII.2. Asimismo, la subfracción FVIII.2 se separó parcialmente en 2 subfracciones; FVIII.2.1 y FVIII.2.2.



Figura 36. Evaluación de las subfracciones FVIII.1, FVIII.2.1 y FVIII.2.2, en la proliferación de monocitos. Se sembraron en placa de 96 pozos, 1×10^4 células por pozo en un volumen de 100 µL y se incubaron por 48h. Ensayo de proliferación por MTS (λ =492 nm). Gráficas de barra representativas de 3 réplicas por subfracción. Prueba estadística ANOVA de 1 vía. Las 3 subfracciones analizadas no mostraron una diferencia significativa (P= <0.05) con respecto al grupo control, correspondiente a células sin ningún tratamiento.



Figura 37. Evaluación de la subfracción FVIII.2, en la proliferación de monocitos. Se sembraron en placa de 96 pozos, 1x10⁴ células por pozo en un volumen de 100 μ L y se incubaron por 48h. Ensayo de proliferación por MTS (λ =492 nm). Gráficas de barra representativas de 3 réplicas por subfracción. Prueba estadística ANOVA de 1 vía. La mezcla de la subfracción FVIII.2 analizada mostró un aumento significativo (P= <0.05) con respecto al grupo control, correspondiente a células sin ningún tratamiento.

Capítulo 4. Discusión

El veneno de los caracoles cono posee una amplia variedad de moléculas con potencial terapéutico. Dependiendo del género, estos caracoles se alimentan de distintas presas y utilizan diferentes estrategias de caza, lo que explica la gran diversidad de potenciales compuestos farmacológicos presentes en su veneno (Terlau, 2004). Asimismo, estos compuestos presentan distintas dianas moleculares; siendo los canales iónicos las principales, lo que permite utilizar las toxinas presentes en el veneno como potenciales moléculas inmunomoduladoras, para el desarrollo de terapias contra diversas patologías. En el presente trabajo se evaluó el efecto *in vivo* del veneno total de *Conasprella ximenes* en el balance de células inmunitarias, así como el efecto de las fracciones cromatográficas en la diferenciación y proliferación de monocitos de la línea THP-1.

Para cumplir con el primer objetivo, se evaluó el efecto *in vivo* del veneno total en el balance de distintas células inmunitarias innatas y adaptativas. Inicialmente se inoculó adyuvante completo de Freund (ACF) a los ratones, el cual funciona como un inmunoactivador y favorece la inmunidad celular (Batista-Duharte et al., 2014). Posteriormente, se inyectó un refuerzo del adyuvante junto con el veneno total a una concentración de 200 µg/mL, mediante administración en la almohadilla plantar. Este tipo de administración afecta principalmente a los ganglios poplíteos e inguinales, lo que permite estudiar una respuesta inmunológica celular localizada (Kamala, 2007). Debido a lo anterior, se optó por seleccionar aquellas células que migran a ganglios linfáticos durante un proceso infeccioso; macrófagos y células dendríticas (APC) para la inmunidad innata, y linfocitos T y B para la inmunidad adaptativa. De acuerdo con los resultados, para la inmunidad innata, se observó una disminución significativa en la población de linfocitos B (Figuras 17 y 18).

En un trabajo presentado por Fiahlo et al (2011), se realizó un experimento *in vivo* para observar el balance y activación de células inmunitarias, con veneno de escorpión (*Tityus serrulatus*), a una concentración similar (200 µg/mL). De acuerdo con sus resultados, se observó una disminución general de las células analizadas; especialmente macrófagos, en tejido peritoneal y se observó una disminución de las células en ganglios linfáticos inguinales, seguido de una repoblación a los 360 minutos. De igual forma, se encontró una disminución en el total de células en el bazo. Lo anterior sugiere una migración de los macrófagos a los ganglios linfáticos. Sin embargo, de acuerdo con los resultados del ensayo con veneno de *C. ximenes*, se observa un efecto opuesto al presentado en dicho estudio.

Una explicación es que el veneno de *C. ximenes* posea un efecto citotóxico, lo que explicaría la disminución global de las células del grupo experimental con respecto al grupo control (Tabla 3). Los canales iónicos; los principales blancos moleculares de los péptidos presentes en el veneno de los conos, controlan distintas funciones en las células, entre las que se incluyen la proliferación y la apoptosis (De Jonge y Ulloa, 2007; Kondratskyi et al., 2015). En 2011, Oroz-Parra evaluó el efecto citotóxico del veneno de *Conasprella ximenes*, en una línea celular de cáncer de colon. De acuerdo con los resultados, distintas subfracciones lograron disminuir la viabilidad celular hasta un 42%. En este sentido, existe la posibilidad de que algunos péptidos presentes en el veneno promuevan la muerte de las células inmunitarias y/o inhiban la proliferación celular.

Por otra parte, los anticuerpos marcados con fluorocromos empleados para la detección de macrófagos (CD11b⁺, CD11c⁺, F4/80⁺), corresponden a macrófagos con el fenotipo proinflamatorio M1 (Misharin et al., 2013; Yu et al., 2016). Se ha reportado que distintos canales iónicos; entre ellos los de potasio y calcio, así como los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR), se encuentran involucrados en la activación y polarización de los macrófagos (Selezneva et al., 2022). Por lo tanto, es posible que el veneno contenga toxinas capaces de polarizar a los macrófagos, es decir, promover un cambio en el fenotipo proinflamatorio M1 hacia un perfil antiinflamatorio M2, lo que podría explicar la disminución en la población de macrófagos del grupo experimental.

Otra explicación a la disminución de macrófagos en el grupo experimental podría deberse a que estas células se concentren en el sitio de administración del veneno (almohadilla plantar). Si bien los macrófagos son células presentadoras de antígeno, constituyen únicamente del 1-2% de células presentes en ganglios linfáticos de ratón, por lo que es probable que permanezcan en el sitio de inoculación promoviendo la inflamación y fagocitosis de células apoptóticas y/o necróticas (Barker et al., 2002). En otro trabajo realizado *in vivo*, se estudió el patrón de migración de los macrófagos, y se observó que, tras la inducción de peritonitis con tioglicolato en ratones, los macrófagos proinflamatorios alcanzaban niveles basales en ganglios linfáticos a partir del día 5 posterior a la inducción, mientras que estas células permanecieron aumentadas hasta 14 días en el sitio de administración (Gautier et al., 2013).

Asimismo, se observó una disminución en la población de linfocitos B, la cual aparenta ser explicada por una disminución en la migración de estas células. Para realizar este análisis, se utilizó un anticuerpo contra CD62L; un marcador de superficie expresado en los linfocitos, que juega un rol importante en la migración de los mismos hacia los ganglios linfáticos. Sin embargo, este marcador por sí solo no es suficiente para evaluar el proceso de migración de los linfocitos, por lo que se requiere analizar otros marcadores. Por otra parte, similar a lo explicado para los macrófagos, es probable que el veneno posea un efecto citotóxico contra los linfocitos B. En un estudio realizado con veneno total de *Conus textile*, se evaluó el efecto apoptótico del veneno crudo, en células derivadas de pacientes con leucemia linfocítica crónica. Los resultados mostraron una disminución significativa de linfocitos B, en donde se utilizaron concentraciones de 100 y 200 µg/mL (Salimi et at., 2021).

Una vez explorado el efecto *in vivo* del veneno, y dado que el propósito del proyecto es contribuir al desarrollo futuro de terapias en humanos, se optó por continuar los ensayos *in vitro* con una línea celular de monocitos humanos (THP-1). Es importante recalcar que dependiendo del conjunto de señales presentadas, los monocitos poseen la capacidad de diferenciarse en células dendríticas o macrófagos; células presentadoras de antígeno, que resultan clave en el desarrollo de la inmunidad innata y en la activación de la adaptativa (Chomarat et al., 2000; Yang et al., 2014).

Para descartar que el veneno tuviera un efecto citotóxico, se realizó un ensayo de viabilidad celular mediante MTS (Figura 19), y de acuerdo con los resultados, no se observó ninguna diferencia significativa en comparación con el control. Posteriormente, se evaluó el efecto de las fracciones cromatográficas del veneno de *C. ximenes* colectado en febrero 2018, en la diferenciación de monocitos a macrófagos. En este sentido, se buscaba ver si las fracciones lograban potenciar o inhibir el efecto del forbol miristato acetato (PMA); un activador de la proteína cinasa C, el cual es capaz de promover la diferenciación de macrófagos. De acuerdo con los resultados (Figura 20), no hubo diferencias significativas en ninguna fracción con respecto al control positivo correspondiente a células tratadas con PMA. Sin embargo, algunas fracciones mostraron una tendencia al alza; FIV, FVIII y FX, las cuales fueron repurificadas y probadas mediante el mismo ensayo de diferenciación a macrófagos. A pesar de lo anterior, los resultados obtenidos no mostraron una diferencia significativa en ninguna subfracción al compararla con el control positivo (Figuras 24, 25 y 26). Ante esta situación, se decidió analizar las fracciones para determinar si mostraban efecto en la proliferación de monocitos.

No obstante, el material inicial de trabajo; correspondiente a las fracciones cromatográficas del veneno colectado en febrero 2018, se agotó en los ensayos de cultivo celular, por lo que fue necesario probar otra alícuota. De forma similar al veneno de 2018, un nuevo lote de veneno total colectado en febrero 2015 se fraccionó y se probó en la diferenciación de monocitos a macrófagos, en la línea celular THP-1. De acuerdo con los resultados (Figura 20 y 27), existe una diferencia entre las fracciones de los distintos lotes que mostraron una tendencia en la diferenciación de monocitos. En la Figura 13, se realizó una comparación entre dos cromatogramas representativos para los lotes de veneno total de febrero 2018 y 2015, y se

observa un cambio en la proporción de distintos picos cromatográficos, así como un desplazamiento en los tiempos de retención. Estas variaciones podrían explicar la diferencia entre fracciones de distintos lotes. Asimismo, se ha reportado que en distintas especies de caracoles cono, existen variaciones intraespecíficas en los componentes del veneno incluso entre distintos especímenes pertenecientes a la misma especie. Estos cambios a su vez podrían explicarse por la diferencia de edad, sexo, ubicación geográfica y estación del año en que fueron colectados (Dutertre et al., 2010; Dutt et al., 2019). Finalmente, debido a que las alícuotas de veneno fueron proporcionadas ya procesadas y liofilizadas, factores como la manipulación de las muestras y el almacenaje de las mismas, pueden influir en la estabilidad de la muestra, y, por ende, en los resultados.

Posteriormente, se decidió realizar nuevamente el ensayo de diferenciación de macrófagos, pero con la nueva alícuota de veneno total (febrero 2015). De acuerdo con los resultados, ninguna fracción mostró una diferencia significativa, sin embargo, se encontró una tendencia al alza en la fracción XII (Figura 27). Al mismo tiempo, se optó por probar las fracciones en la proliferación de monocitos, y de acuerdo con los resultados, la fracción VIII mostró un aumento significativo al compararla con el control (Figura 28). Con base en lo anterior, las fracciones VIII y XII se repurificaron y evaluaron en la proliferación de monocitos de forma similar. A partir de dicho análisis, las subfracciones FVIII.2 y FVIII.3 mostraron un aumento significativo con respecto al control (Figura 31). Para continuar con el análisis de las subfracciones, se concentró más fracción VIII a partir del veneno total y se repurificó. Sin embargo, no fue posible separar la subfracción FVIII.3 por el mismo método de gradiente. En HPLC, el método de gradiente consiste en la separación de la muestra, en el que la composición de la fase móvil (dos o más solventes que difieren en su hidrofobicidad), cambia durante el análisis. Este método es útil para separar compuestos cuya hidrofobicidad varía ampliamente. Por otra parte, el método isocrático mantiene la fase móvil constante durante el proceso (Skoog et al, 2017). Al encontrarse las subfracciones FVIII.2 y FVIII.3 tan próximas, así como la dificultad presentada para separar la FVIII.3 en FVIII.3.1 y FVIII.3.2 por el método de gradiente, se optó por utilizar el método isocrático, con la finalidad de aislar cada pico cromatográfico. No obstante, a pesar de esta estrategia, no se separaron individualmente.

Es probable que las subfracciones FVIII.3.1 y FVIII.3.2 posean una secuencia aminoacídica y estructura bioquímica muy similares, lo que podría explicar la proximidad de estos péptidos durante la elución, los cuales se ven reflejados como dos picos cromatográficos superpuestos (Figura 35). Asimismo, posterior a la repurificación de la fracción VIII, se evaluaron las subfracciones FVIII.2.1 y FVIII.2.2 en la proliferación de monocitos, en donde no se observó una diferencia significativa en comparación con el control (Figura 36).

Sin embargo, al unir las dos subfracciones y probarlas de nuevo en conjunto, estas recuperaron su efecto (Figura 37). Lo anterior sugiere que estas fracciones tienen un efecto de sinergia en la proliferación de monocitos. De forma similar a los macrófagos, los monocitos expresan distintos canales iónicos que controlan procesos como maduración, proliferación, activación y diferenciación, entre otros. Específicamente para los monocitos THP-1, se ha reportado que estos expresan canales de potasio, calcio, cloro y canales catiónicos no selectivos, por mencionar algunos. Asimismo, se ha reportado que al diferenciarse las células THP-1 en macrófagos, la expresión de estos canales se ve modulada, es decir, algunos pueden dejar de expresarse o nuevos canales pueden manifestarse (DeCoursey et al., 1996).

Por lo anterior, y de acuerdo con los resultados, es probable que algunas de estas toxinas actúen en canales iónicos involucrados en la proliferación celular de monocitos, pero que no promuevan la diferenciación de estos o, en su defecto, que las propias células no expresen los blancos moleculares relacionados con la diferenciación a macrófagos.

El veneno total de *Conasprella ximenes* disminuyó la población de macrófagos (P= <0.0001), en los ensayos *in vivo* realizados en ratones BALB/c. Aunque el veneno total incluye una mezcla de compuestos diversos, está constituido mayoritariamente por péptidos que se encargan de las distintas actividades biológicas. Es probable que ciertas toxinas promovieran la disminución en los macrófagos, sin embargo, se requiere realizar más ensayos *in vivo* para descartar un efecto de citotoxicidad y para aislar e identificar los componentes responsables del efecto.

Las fracciones cromatográficas del veneno de *C. ximenes* (2018), no mostraron un efecto en la diferenciación de monocitos a macrófagos. De igual forma, al emplear una nueva alícuota de veneno total (2015), no se observó un cambio en la diferenciación de los monocitos.

Por otra parte, la fracción VIII mostró un aumento en la proliferación de monocitos (P= <0.05). Asimismo, las subfracciones FVIII.2 y FVIII.3; repurificadas a partir de la fracción VIII, promueven la proliferación de monocitos de la línea celular THP-1. FVIII.2.1 y FVIII.2.2 no mostraron efecto por separado, sin embargo, unidas recuperaron su actividad en la proliferación de monocitos. Lo anterior implica un efecto de sinergia por parte de estos péptidos. FVIII.3.1 y FVIII.3.2 mantienen el efecto en la proliferación, sin embargo, debido a su proximidad y propiedades bioquímicas, no fue posible separarlos. Se requiere emplear otras técnicas para aislarlos e identificar su secuencia peptídica.

En conjunto, los resultados presentados en este proyecto sugieren que algunas toxinas presentes en el veneno de *C. ximenes*, poseen actividad inmunomoduladora. En este sentido, es necesario realizar más experimentos a manera de utilizar estos péptidos como potenciales agentes farmacológicos, para el futuro desarrollo de diversas terapias contra infecciones o padecimientos relacionados al sistema inmunológico.

- Akondi, K. B., Muttenthaler, M., Dutertre, S., Kaas, Q., Craik, D. J., Lewis, R. J. y Alewood, P. F. 2014. Discovery, synthesis, and structure-activity relationships of conotoxins. Chemical Reviews. American Chemical Society, 114(11), 5815–5847. doi:10.1021/cr400401e
- Barker, R. N., Erwig, L. P., Hill, K. S. K., Devine, A., Pearce, W. P. y Rees, A. J. 2002. Antigen presentation by macrophages is enhanced by the uptake of necrotic, but not apoptotic, cells. Clinical and Experimental Immunology, Oxford University Press, 127(2), 220–225. doi:10.1046/j.1365-2249.2002.01774.x
- Batista-Duharte, A., Lastre, M. y Pérez, O. 2014. Adyuvantes inmunológicos. Determinantes en el balance eficacia-toxicidad de las vacunas contemporáneas. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Elsevier, 32(2), 106–114. doi:10.1016/j.eimc.2012.11.012
- Bernáldez Sarabia, J. 2013. Aislamiento y caracterización de toxinas de caracoles marinos del género *Conus* con actividad en *Mycobacterium tuberculosis*. Tesis de Doctorado en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. 113 pp.
- Biggs, J. S., Watkins, M., Puillandre, N., Ownby, J. P., Lopez-Vera, E., Christensen, S., Moreno, K. J., Bernaldez, J., Licea-Navarro, A., Corneli, P. S. y Olivera, B. M. 2010. Evolution of Conus peptide toxins: Analysis of Conus californicus Reeve, 1844. Molecular Phylogenetics and Evolution, Mol Phylogenet Evol, 56(1), 1–12. doi:10.1016/j.ympev.2010.03.029
- Bonilla, F. A. y Oettgen, H. C. 2010. Adaptive immunity. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 125(2 SUPPL. 2). doi:10.1016/j.jaci.2009.09.017
- Carlson, P. M., Mohan, M., Patel, R. B., Birstler, J., Nettenstrom, L., Sheerar, D., Fox, K., Rodriguez, M., Hoefges, A., Hernandez, R., Zahm, C., Kim, K., McNeel, D. G., Weichert, J., Morris, Z. S. y Sondel, P. M. 2021. Optimizing Flow Cytometric Analysis of Immune Cells in Samples Requiring Cryopreservation from Tumor-Bearing Mice. The Journal of Immunology, The American Association of Immunologists, 207(2), 720–734. doi:10.4049/jimmunol.2000656
- Cervantes Luévano, K.E. 2013. Aislamiento y caracterización de péptidos inmunomoduladores presentes en el veneno de caracoles marinos del género *Conus*. Tesis de Doctorado en Ciencias. Universidad Autónoma de Baja California. 67 pp.
- Chaigne-Delalande, B. y Lenardo, M. J. 2014. Divalent cation signaling in immune cells. Trends in Immunology. Trends Immunol, 35(7), 332–344. doi:10.1016/j.it.2014.05.001
- Chomarat, P., Banchereau, J., Davoust, J. y Palucka, A. K. 2000. IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. Nature Immunology, Nature Publishing Group, 1(6), 510–514. doi:10.1038/82763
- Cohn, Z. A. 1978. The Activation of Mononuclear Phagocytes: Fact, Fancy, and Future. The Journal of Immunology, 121(3), 813–816. Consultado en abril de 2021 de: http://www.jimmunol.org/content/121/3/813.abstract

- Dao, F. Y., Yang, H., Su, Z. D., Yang, W., Wu, Y., Ding, H., Chen, W., Tang, H. y Lin, H. 2017. Recent advances in conotoxin classification by using machine learning methods. Molecules, 22(7). doi:10.3390/molecules22071057
- De Jonge, W. J. y Ulloa, L. 2007. The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor as a pharmacological target for inflammation. British Journal of Pharmacology. Br J Pharmacol, 151(7), 915–929. doi:10.1038/sj.bjp.0707264
- DeCoursey, T. E., Kim, S. Y., Silver, M. R. y Quandt, F. N. 1996. III. Ion channel expression in PMAdifferentiated human THP-1 macrophages. Journal of Membrane Biology, J Membr Biol, 152(2), 141– 157. doi:10.1007/s002329900093
- Dutertre, S., Biass, D., Stöcklin, R. y Favreau, P. 2010. Dramatic intraspecimen variations within the injected venom of Conus consors: An unsuspected contribution to venom diversity. Toxicon, Toxicon, 55(8), 1453–1462. doi:10.1016/j.toxicon.2010.02.025
- Dutt, M., Dutertre, S., Jin, A. H., Lavergne, V., Alewood, P. F. y Lewis, R. J. 2019. Venomics Reveals Venom Complexity of the Piscivorous Cone Snail, Conus tulipa. Marine Drugs, 17(1). doi:10.3390/md17010071
- England, L. J., Imperial, J., Jacobsen, R., Craig, A. G., Gulyas, J., Akhtar, M., Rivier, J., Julius, D. y Olivera, B.
 M. 1998. Inactivation of a serotonin-gated ion channel by a polypeptide toxin from marine snails.
 Science, American Association for the Advancement of Science, 281(5376), 575–578.
 doi:10.1126/science.281.5376.575
- Espinoza, V. E. y Emmady, P. D. 2020. Histology, Monocytes. StatPearls. StatPearls Publishing. Consultado el 3 de enero de 2023 de: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557618/
- Fedosov, A., Zaharias, P. y Puillandre, N. 2021. A phylogeny-aware approach reveals unexpected venom components in divergent lineages of cone snails. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, The Royal Society, 288(1954). doi:10.1098/rspb.2021.1017
- Ferber, M., Al-Sabi, A., Stocker, M., Olivera, B. M. y Terlau, H. 2004. Identification of a mammalian target of κM-conotoxin RIIIK. Toxicon, Toxicon, 43(8), 915–921. doi:10.1016/j.toxicon.2003.12.010
- Feske, S., Wulff, H. y Skolnik, E. Y. 2015. Ion channels in innate and adaptive immunity. Annual Review of Immunology. Annu Rev Immunol, 33, 291–353. doi:10.1146/annurev-immunol-032414-112212
- Fialho, E. M. S., Maciel, M. C. G., Silva, A. C. B., Reis, A. S., Assunção, A. K. M., Fortes, T. S., Silva, L. A., Guerra, R. N. M., Kwasniewski, F. H. y Nascimento, F. R. F. 2011. Immune cells recruitment and activation by Tityus serrulatus scorpion venom. Toxicon, Toxicon, 58(6–7), 480–485. doi:10.1016/j.toxicon.2011.08.006
- Figueroa-Montiel, A., Bernáldez, J., Jiménez, S., Ueberhide, B., González, L. J. y Licea-Navarro, A. 2018. Antimycobacterial activity: A new pharmacological target for conotoxins found in the first reported conotoxin from Conasprella ximenes. Toxins, Toxins (Basel), 10(2). doi:10.3390/toxins10020051
- Gautier, E. L., Ivanov, S., Lesnik, P. y Randolph, G. J. 2013. Local apoptosis mediates clearance of macrophages from resolving inflammation in mice. Blood, American Society of Hematology, 122(15), 2714–2722. doi:10.1182/BLOOD-2013-01-478206

- Hopkins, C., Grilley, M., Miller, C., Shon, K. J., Cruz, L. J., Gray, W. R., Dykert, J., Rivier, J., Yoshikami, D. y
 Olivera, B. M. 1995. A new family of Conus peptides targeted to the nicotinic acetylcholine receptor.
 Journal of Biological Chemistry, 270(38), 22361–22367. doi:10.1074/jbc.270.38.22361
- Inserra, M. C. y Lewis, R. J. 2011. Venom peptide modulators of the immune system. Inflammation and Allergy Drug Targets, Bentham Science Publishers, 10(5), 399–410. doi:10.2174/187152811797200687
- Jimenez, R., Ikonomopoulou, M. P., Lopez, J. A. y Miles, J. J. 2018. Immune drug discovery from venoms. Toxicon. Pergamon, 141, 18–24. doi:10.1016/j.toxicon.2017.11.006
- Jin, A. H., Muttenthaler, M., Dutertre, S., Himaya, S. W. A., Kaas, Q., Craik, D. J., Lewis, R. J. y Alewood, P. F. 2019. Conotoxins: Chemistry and Biology. Chemical Reviews. American Chemical Society, 119(21), 11510–11549. doi:10.1021/acs.chemrev.9b00207
- Kaas, Q., Westermann, J. C. y Craik, D. J. 2010. Conopeptide characterization and classifications: An analysis using ConoServer. Toxicon, 55(8), 1491–1509. doi:10.1016/j.toxicon.2010.03.002
- Kamala, T. 2007. Hock immunization: A humane alternative to mouse footpad injections. Journal of Immunological Methods, NIH Public Access, 328(1–2), 204–214. doi:10.1016/j.jim.2007.08.004
- Kim, S. Y., Silver, M. R. y DeCoursey, T. E. 1996. I. Ion channels in human THP-1 monocytes. Journal of Membrane Biology, J Membr Biol, 152(2), 117–130. doi:10.1007/s002329900091
- King, G. F. 2011. Venoms as a platform for human drugs: Translating toxins into therapeutics. Expert Opinion on Biological Therapy, 11(11), 1469–1484. doi:10.1517/14712598.2011.621940
- Kondratskyi, A., Kondratska, K., Skryma, R. y Prevarskaya, N. 2015. Ion channels in the regulation of apoptosis. Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes. Elsevier, 1848(10), 2532–2546. doi:10.1016/j.bbamem.2014.10.030
- Lanier, L. L. y Sun, J. C. 2009. Do the terms innate and adaptive immunity create conceptual barriers? Nature Reviews Immunology. Nat Rev Immunol, 9(5), 302–303. doi:10.1038/nri2547
- Lebish, I. J. y Moraski, R. M. 1987. Mechanisms of Immunomodulation by Drugs. Toxicologic Pathology, Toxicol Pathol, 15(3), 338–345. doi:10.1177/019262338701500312
- Luckheeram, R. V., Zhou, R., Verma, A. D. y Xia, B. 2012. CD4 +T cells: Differentiation and functions. Clinical and Developmental Immunology. Hindawi Limited, 2012, 12. doi:10.1155/2012/925135
- Luo, S., Nguyen, T. A., Cartier, G. E., Olivera, B. M., Yoshikami, D. y McIntosh, J. M. 1999. Single-residue alteration in α-conotoxin PnIA switches its nAChR subtype selectivity. Biochemistry, American Chemical Society, 38(44), 14542–14548. doi:10.1021/bi991252j
- Mans, D.R. 2016. Exploring the global animal biodiversity in the search for new drugs Spiders, scorpions, horseshoe crabs, sea spiders, centipides, and millipides. Journal of Translational Science, 2(3), 170-179. doi:10.15761/jts.1000197
- Marshall, J. S., Warrington, R., Watson, W. y Kim, H. L. 2018. An introduction to immunology and immunopathology. Allergy, Asthma and Clinical Immunology. BioMed Central Ltd., 14(2), 1–10. doi:10.1186/s13223-018-0278-1

- Martins, A., Vieira, H., Gaspar, H. y Santos, S. 2014. Marketed marine natural products in the pharmaceutical and cosmeceutical industries: Tips for success. Marine Drugs. MDPI AG, 12(2), 1066–1101. doi:10.3390/md12021066
- McIntosh, J. M., Yoshikami, D., Mahe, E., Nielsen, D. B., Rivier, J. E., Gray, W. R. y Olivera, B. M. 1994. A nicotinic acetylcholine receptor ligand of unique specificity, α- conotoxin ImI. Journal of Biological Chemistry, Elsevier, 269(24), 16733–16739. doi:10.1016/s0021-9258(19)89452-8
- Minutti-Zanella, C., Gil-Leyva, E. J. y Vergara, I. 2021. Immunomodulatory properties of molecules from animal venoms. Toxicon. Pergamon, 191, 54–68. doi:10.1016/j.toxicon.2020.12.018
- Misharin, A. V, Morales-Nebreda, L., Mutlu, G. M., Budinger, G. R. S. y Perlman, H. 2013. Flow cytometric analysis of macrophages and dendritic cell subsets in the mouse lung. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, 49(4), 503–510. doi:10.1165/rcmb.2013-0086MA
- Mosser, D. M. y Edwards, J. P. 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. Nature Reviews Immunology. Nature Publishing Group, 8(12), 958–969. doi:10.1038/nri2448
- Olivera, B. M., Walker, C., Cartier, G. E., Hooper, D., Santos, A. D., Schoenfeld, R., Shetty, R., Watkins, M., Bandyopadhyay, P. y Hillyard, D. R. 1999. Speciation of cone snails and interspecific hyperdivergence of their venom peptides. Potential evolutionary significance of introns. En: Annals of the New York Academy of Sciences, New York Academy of Sciences, 870, 223–237. doi:10.1111/j.1749-6632.1999.tb08883.x
- Oroz Parra, I. 2011. Aislamiento e identificación de agentes citotóxicos provenientes del caracol marino *Conus ximenes* con actividad contra una línea celular de cáncer de colon (LIM-1215). Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. 72 pp.
- Parasuraman, S., Raveendran, R. y Kesavan, R. 2010. Blood sample collection in small laboratory animals. Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics, Wolters Kluwer - Medknow Publications, 1(2), 87. doi:10.4103/0976-500X.72350
- Paredes, C., Cardoso, F., Altamirano, K., Baltazar, P. y Romero, L. 2010. The family Conidae from Peruvian Sea. Revista Peruana de Biologia, 17(1), 65–73. Consultado en septiembre de 2021 de: http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/biologia/biologiaNEW.htm
- Pennington, M. W., Czerwinski, A. y Norton, R. S. 2018. Peptide therapeutics from venom: Current status and potential. Bioorganic and Medicinal Chemistry, Elsevier Ltd, 26(10), 2738–2758. doi:10.1016/j.bmc.2017.09.029
- Puillandre, N., Duda, T. F., Meyer, C., Olivera, B. M. y Bouchet, P. 2015. One, four or 100 genera? A new classification of the cone snails. Journal of Molluscan Studies, Oxford University Press, 81(1), 1–23. doi:10.1093/mollus/eyu055
- Riera Romo, M., Pérez-Martínez, D. y Castillo Ferrer, C. 2016. Innate immunity in vertebrates: An overview. Immunology, Blackwell Publishing Ltd, 148(2), 125–139. doi:10.1111/imm.12597
- Salimi, A., Salehian, S., Aboutorabi, A., Vazirizadeh, A., Adhami, V., Alehashem, S. H. S., Seydi, E. y Pourahmad, J. 2021. Cytotoxicity Studies of the Crude venom and Fractions of Persian Gulf Snail

(Conus Textile) on Chronic Lymphocytic Leukemia and Normal Lymphocytes. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 22(5), 1523–1529. doi:10.31557/APJCP.2021.22.5.1523

- Selezneva, A., Aj, G. y Willis, D. 2022. The contribution of ion channels to shaping macrophage behaviour. Frontiers in pharmacology, 13, 970234. doi:10.3389/fphar.2022.970234
- Shon, K. J., Stocker, M., Terlau, H., Stühmer, W., Jacobsen, R., Walker, C., Grilley, M., Watkins, M., Hillyard, D. R., Gray, W. R. y Olivera, B. M. 1998. κ-Conotoxin PVIIA is a peptide inhibiting the Shaker K+ channel. Journal of Biological Chemistry, Elsevier, 273(1), 33–38. doi:10.1074/jbc.273.1.33
- Sudan, B., Wacker, M. A., Wilson, M. E. y Graff, J. W. 2015. A systematic approach to identify markers of distinctly activated human macrophages. Frontiers in Immunology, Frontiers Research Foundation, 6, 253. doi:10.3389/fimmu.2015.00253
- Terlau, H. y Olivera, B. M. 2004. Conus Venoms: A Rich Source of Novel Ion Channel-Targeted Peptides. Physiological Reviews, 84(1), 41–68. doi:10.1152/physrev.00020.2003
- Turvey, S. E. y Broide, D. H. 2010. Innate immunity. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 125(2 SUPPL. 2), S24–S32. doi:10.1016/j.jaci.2009.07.016
- Vivier, E. y Malissen, B. 2005. Innate and adaptive immunity: Specificities and signaling hierarchies revisited. Nature Immunology, 6(1), 17–21. doi:10.1038/ni1153
- Yang, J., Zhang, L., Yu, C., Yang, X. F. y Wang, H. 2014. Monocyte and macrophage differentiation: Circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. Biomarker Research. BioMed Central Ltd., 2(1), 1–9. doi:10.1186/2050-7771-2-1
- Yu, Y. R. A., O'Koren, E. G., Hotten, D. F., Kan, M. J., Kopin, D., Nelson, E. R., Que, L. y Gunn, M. D. 2016. A protocol for the comprehensive flow cytometric analysis of immune cells in normal and inflamed murine non-lymphoid tissues. PLoS ONE, 11(3). doi:10.1371/journal.pone.0150606
- Zazueta-Favela, D., Donis-Maturano, L., Licea-Navarro, A. F., Bernáldez-Sarabia, J., Dan, K. W. L., Cota-Arce, J. M., Escobedo, G. y De León-Nava, M. A. 2019. Marine peptides as immunomodulators: Californiconus californicus-derived synthetic conotoxins induce IL-10 production by regulatory T cells (CD4+Foxp3+). Immunopharmacology and Immunotoxicology, Taylor and Francis Ltd, 41(4), 463–468. doi:10.1080/08923973.2019.1641114
- Zerón, A. 2021. Inmunización e inmunidad. Regreso a clases de inmunología. Revista de la Asociación Dental Mexicana, Medigraphic, 78(3), 124–127. doi:10.35366/100068



A.1 Análisis multiparamétrico de linfocitos por citometría de flujo.

Tamaño (Área)

Figura 38. Citogramas de puntos del análisis de linfocitos. Selección de la población de linfocitos; comparación de tamaño (área) contra granularidad (área). Citogramas de las 4 réplicas del grupo control (C1-C4) y del grupo experimental (VT1-VT4).



Figura 39. Citograma de puntos del análisis de linfocitos T y linfocitos B. Selección de la población de linfocitos T (CD3⁺) y de linfocitos B (CD3⁻), mediante la expresión de CD3 contra granularidad (área). Citogramas de las 4 réplicas del grupo control (C1-C4) y del grupo experimental (VT1-VT4).

A.2 Diferenciación de monocitos THP-1 a macrófagos.



Figura 40. Diferenciación morfológica de monocitos THP-1 tratados con PMA y fracciones del veneno de *C. ximenes*. Se sembraron en placa de 96 pozos, 1x10⁴ células por pozo en un volumen de 100 μL. Todas las células tratadas con fracciones y el control positivo fueron tratados con PMA a una concentración de 50 mM, y se incubaron por 72h para su diferenciación de monocitos a macrófagos. **A)** Control negativo: células sin tratamiento. **B)** Control positivo: células tratadas con PMA. **C)** PMA + FII (50 μg/mL). **D)** PMA + FIII (50 μg/mL). **E)** PMA + FIV (50 μg/mL). **F)** PMA + FV (50 μg/mL). **G)** PMA + FVI (50 μg/mL). **H)** PMA + FVII (50 μg/mL). **I)** PMA + FVIII (50 μg/mL). **J)** PMA + FIX (50 μg/mL). **K)** PMA + FX (50 μg/mL). **L)** PMA + FXI (50 μg/mL). **M)** PMA + FXII (36 μg/mL). **N)** PMA + FXIII (44 μg/mL). **O)** PMA + VT (200 μg/mL).