
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE INGENIERÍA ARQUITECTURA Y DISEÑO



**Efecto de las conotoxinas en la polarización de la respuesta
inmune Th1/Th2**

Tesis

Que para obtener el título de

Bioingeniero

Presenta:

Andrea Alejandra Verdugo Meza

Ensenada, Baja California, agosto 2014



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE INGENIERÍA, ARQUITECTURA Y DISEÑO



**Efecto de las conotoxinas en la polarización de la respuesta
inmune Th1/Th2**

T E S I S

Que para obtener el título de

Bioingeniero

Presenta

Andrea Alejandra Verdugo Meza

Aprobada por:

Dr. Marco Antonio de León Nava

Director del Comité

Dra. Graciela Guerra Rivas

Miembro del Comité

**Dra. Tatiana Nenetzen Olivares
Bañuelos**

Miembro del Comité

Resumen

El sistema inmunológico de los mamíferos se encarga de salvaguardar la integridad del organismo al protegerlo contra diversos patógenos; de la variedad de factores humorales y celulares que lo componen, los linfocitos T cooperadores (Th) son las células encargadas de orquestrar la respuesta específica requerida. Dependiendo de la naturaleza del antígeno blanco, los linfocitos Th pueden diferenciarse en al menos dos poblaciones definidas por su producción de citocinas, el subtipo Th1 ante un antígeno intracelular o el subtipo Th2 ante un antígeno extracelular. Durante diversas patologías, como la autoinmunidad, predominan las células efectoras de un subtipo, por lo que resulta de gran interés la búsqueda de inmunomoduladores que logren polarizar la respuesta inmune hacia el subtipo opuesto. A la fecha, se han caracterizado diversas moléculas que tienen como blanco molecular canales iónicos y receptores implicados en la activación de células del sistema inmune. Un objetivo más ambicioso, es encontrar moléculas que tengan como blanco canales iónicos o receptores específicos de un subtipo celular. Las conotoxinas son péptidos ricos en cisteínas capaces de discriminar entre blancos moleculares similares, a las que se les ha descrito como agonistas y antagonistas de receptores nicotínicos y canales de K^+ , ambos blancos implicados en la activación de linfocitos Th. En el presente trabajo, se evaluó el efecto de seis conotoxinas sintéticas de *Conus californicus* sobre linfocitos T murinos; los resultados indican que la proliferación celular es afectada, así como el patrón de expresión de los factores de transcripción distintivos de cada subtipo, Tbet y GATA3, haciendo dominar este último e indicando que las conotoxinas empleadas tienen potencial como agentes inmunomoduladores que polarizan la diferenciación hacia el subtipo Th2.

Palabras clave: Diferenciación de linfocitos Th, linfocitos Th1, linfocitos Th2, conotoxinas.

Agradecimientos

Al Dr. Marco De León, por permitirme participar en este proyecto y mostrarme el fascinante universo de la inmunología.

Al Dr. Alexei Licea, por permitirme formar parte de la UDB, por el equipo y los materiales proporcionados.

A mis sinodales, Dra. Graciela Guerra y Dra. Tatiana Olivares, por sus acertados comentarios y su dedicación en la revisión de este trabajo.

A la Dra. Karla Cervantes, por tu gran apoyo, por tu paciencia para enseñarme y por siempre alentarme a seguir adelante. Estas palabras no alcanzan a demostrar lo agradecida que estoy contigo.

A los académicos e investigadores que sembraron en mí el gusto por la ciencia: Dra. Graciela Guerra, Dra. Claudia Gómez, M.C. Dante Magdaleno, M.C. Leivi Portugal, Dr. Carlos Muñoz, Dr. Andrés Quintanar, M.C. Verónica Viñuela y Dr. José Luis Stephano.

Al personal de CICESE y UABC, en especial a Dra. Sonia Maldonado, M.C. Lina Meza, M.I. Joel Ojeda, Dra. Dora Luz Flores, C.P. Consuelo Armendáriz, Sara, Luisa, Marthita, Eliud y Pedro.

A mis compañeros de laboratorio, gracias por su eterna disposición y alegrar los días de trabajo: Karla, Vanessa, Vivi, Jolian, Salvador, Pavel, Félix, Irasema, Ana Paola, Erika, Andrea, Samantha, Hanna, Tanya y Ricardo.

A mis compañeros de Bioingeniería, Paulina, Valeria, Dayra, Laberto, Duahmet, Ricardo, Rosiñol, Pepe, Gil, Juan Manuel, Issa y mis queridos biofreaks.

A Mónica, Galleta y Paco, por brindarme su amistad.

A mi familia, en especial a mi abuela y mamá, por su compañía, apoyo y amor incondicional.

Finalmente, a todas las personas que de una u otra manera me han apoyado en mi formación académica y personal.

Índice

Resumen.....	iii
Lista de figuras.....	vi
Lista de tablas	vi
INTRODUCCIÓN	1
Activación de Linfocitos T	2
Citocinas	4
Polarización de la respuesta inmune: Paradigma Th1/Th2.....	5
ANTECEDENTES	7
Inmunomoduladores de los linfocitos T	8
Conotoxinas	13
JUSTIFICACIÓN	17
HIPÓTESIS	17
OBJETIVO GENERAL.....	18
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
METODOLOGÍA	19
Obtención de linfocitos.....	19
Cultivo primario de linfocitos.....	20
Evaluación de la proliferación celular	21
Extracción de ARN.....	21
Síntesis de ADNc.....	22
PCR punto final y PCR tiempo real.....	22
Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA)	24
Análisis Estadístico.....	24
RESULTADOS	25
Evaluación de la Proliferación Celular	25
Evaluación de la expresión de los factores de transcripción Tbet y GATA3	27
Evaluación de la expresión de IFN- γ , IL-2, IL-4 e IL-10.....	28
ANÁLISIS Y DISUCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	31
CONCLUSIONES	36
REFERENCIAS.....	38

Lista de figuras

Figura 1. Activación de linfocito T. Vía de señalización tras el reconocimiento del receptor del linfocito T con la célula presentadora de antígeno.	4
Figura 2. Activación de células efectoras debido a la expresión de citocinas.	7
Figura 3. Descubrimiento de bloqueadores de canales K ⁺ en células del sistema inmune.	11
Figura 4. Vías de señalización involucradas en el sistema colinérgico de linfocitos activados en la respuesta inmune.	12
Figura 5. Vista esquemática del aparato venenoso de los caracoles cono.	14
Figura 6. <i>Conus californicus</i>	16
Figura 7. Disección de los nódulos linfáticos en modelo murino.	19
Figura 8. Diseño experimental del cultivo primario de nódulos linfáticos tratados con conotoxinas.	21
Figura 9. Ensayo de reducción de MTS.	26
Figura 10. Índice de proliferación en células tratadas con conotoxinas.	26
Figura 11. Expresión relativa de los factores de transcripción Tbet y GATA3.	27
Figura 12. Cuantificación de IFN- γ e IL-4 en células tratadas con conotoxinas.	29
Figura 13. Cuantificación de IL-2 e IL-10 en células tratadas con conotoxinas.	30

Lista de tablas

Tabla 1. Secuencia y concentración de oligonucleótidos empleados para amplificar los genes de interés.	23
Tabla 2. Expresión relativa de Tbet y GATA3 en células tratadas con conotoxinas.	28

INTRODUCCIÓN

Todo organismo vivo requiere de ciertos mecanismos para sobrevivir al ambiente en el que se desenvuelve. Dentro de los organismos vivos, el ser humano ha desarrollado un complejo sistema inmunológico que lo protege constantemente de las amenazas que representa un agente infeccioso.

Los mecanismos de defensa provistos por el sistema inmunológico se han vuelto más complejos y especializados, a la par de la evolución de las especies. En organismos multicelulares se observan respuestas “naturales” contra microbios, es decir mecanismos de defensa (barreras físicas, químicas y células fagocíticas) que están presentes previo al contacto con algún microbio, pero es en vertebrados superiores como el ser humano, donde se logra desarrollar mecanismos de defensa que se adaptan al antígeno de interés. Así, el ser humano ha desarrollado un sistema inmune con dos tipos de inmunidad: la inmunidad innata que actúa en una etapa temprana y la inmunidad adaptativa que actúa en una etapa tardía. La inmunidad innata provee la primera línea de defensa de manera inespecífica y siempre de la misma forma, mientras que la inmunidad adaptativa (compuesta por linfocitos, anticuerpos, receptores de linfocitos T, entre otros) es específica y de larga duración.

El sistema inmunológico del ser humano está conformado por células mieloides, células linfoides y un vasto repertorio de moléculas de señalización. Son células mieloides los macrófagos, neutrófilos y células dendríticas, todas ellas células fagocíticas, además de

los basófilos, eosinófilos y mastocitos. Son células linfoides los linfocitos B, T y NK. Por su parte, el vasto repertorio de moléculas de comunicación está representado en el inicio y activación de la respuesta inmune por complejos moleculares como los receptores de antígenos (inmunoglobulinas para linfocitos B y receptores de linfocitos T para linfocitos T), dominios citoplasmáticos (CD3, CD4, CD8, CD28), complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) I y MHC II, el sistema del complemento y una amplia gama de citocinas.

La activación del sistema inmune requiere de una sofisticada señalización. La respuesta inmune se desencadena ante la presencia de un antígeno (patógeno o no patógeno) con el potencial de ser nocivo para el organismo. Así, la respuesta inmune adaptativa comienza con el reconocimiento de determinantes proteínicos del antígeno, los cuales son digeridos por las células fagocíticas, para poder ser presentados al receptor del linfocito T (TCR) a través del MHC. Esta interacción de la célula presentadora de antígeno (APC) con el linfocito T se conoce como sinapsis inmunológica, y una vez que se da la sinapsis, el linfocito T orquestará el tipo de respuesta inmune en contra del antígeno presentado.

Activación de Linfocitos T

Los linfocitos T se generan a partir de la médula ósea, maduran en el timo y se encuentran en abundancia en el bazo, los nódulos linfáticos y en la sangre, siendo capaces de reconocer y distinguir diferentes determinantes antigénicos (Abbas et al., 2010). Los linfocitos T son

los encargados de la inmunidad mediada por células y se dividen principalmente en $CD4^+$ T cooperadores y $CD8^+$ T citotóxicos (lisan a células malignas o infectadas por virus) (Abbas et al., 2010). Los linfocitos T cooperadores (Th) llevan a cabo varias funciones, entre las que destacan el estimular la maduración de los linfocitos B y activar a los macrófagos por medio de la secreción de citocinas (Abbas et al., 2010; Zhu & Paul, 2010).

Extracelularmente, la activación de un linfocito T virgen comienza con la sinapsis inmunológica, cuando la APC interactúa con el complejo TCR-CD3 y un conjunto de moléculas adaptadoras en la superficie de la célula. Intracelularmente, la sinapsis desencadena una cascada de señalización donde una serie de fosforilaciones y desfosforilaciones conllevan a la activación de factores de transcripción, al menos a través de tres vías: calcio – calcineurina para el factor nuclear de células T activadas (NFAT), Ras – mitógeno proteína cinasa activada (RAS – MAPK) para el factor de transcripción de proteína activada -1 (AP-1) y/o proteína cinasa C (PKC) para el factor nuclear κB (NF – κB) (Abbas et al., 2010). De estas tres vías el calcio juega un papel preponderante. La activación del linfocito T por el aumento de Ca^{2+} intracelular comienza con la liberación del Ca^{2+} almacenado en el retículo endoplasmático y se mantiene por la apertura (principalmente) de los canales dependientes de depósito activados por liberación de calcio (CRAC), compensando la entrada de Ca^{2+} con la salida de K^+ a través de los canales dependiente de voltaje Kv1.3 y activados por calcio IKCa1 (Chandy et al., 2004). Esta cascada de señalización continúa con la unión del segundo mensajero Ca^{2+} a la calmodulina, para luego activar a la calcineurina y desfosforilar NFAT, culminando con la

transcripción de genes, producción de citocinas (como la interleucina 2) y la proliferación celular (Figura 1).

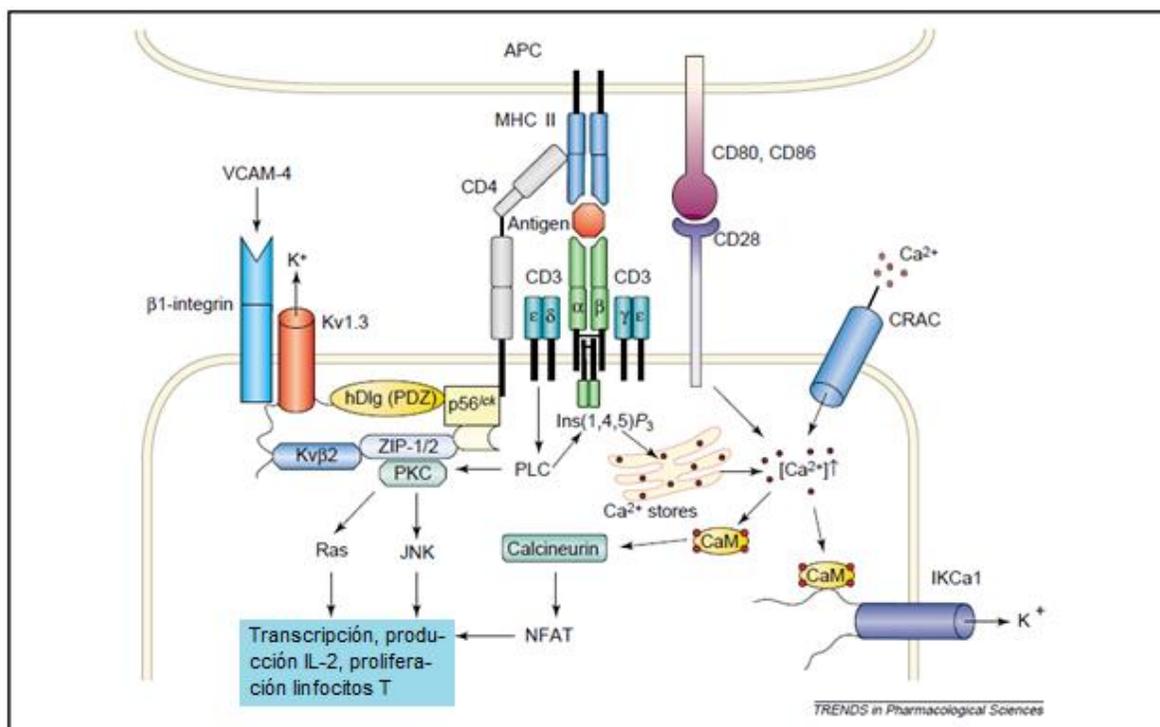


Figura 1. Activación de linfocito T. Vía de señalización tras el reconocimiento del receptor del linfocito T con la célula presentadora de antígeno(Chandy et al., 2004).

Citocinas

Las citocinas son glicoproteínas de bajo peso molecular (15-30 kDa) producidas principalmente por linfocitos T y macrófagos activos, cuya función es orquestar la comunicación celular y desencadenar procesos de activación, proliferación, diferenciación y muerte celular. Así, las citocinas dirigen los mecanismos a activar en respuesta a un determinado patógeno o agente extraño, desde pasar de la respuesta innata a la adaptativa, hasta determinar la diferenciación de las células Th vírgenes.

Las citocinas fueron descritas desde hace más de 50 años como factores que favorecían la proliferación de los linfocitos. Hoy en día se han identificado numerosas citocinas (> 40) agrupadas en superfamilias como las interleucinas, interferones y quimiocinas, entre otras. De la diversa gama de citocinas implicadas en la señalización celular, las citocinas interleucina (IL)-2, IL-4 e interferón (IFN)- γ , son esenciales para la activación y proliferación de los linfocitos Th. En el inicio de la activación de linfocitos T, la citocina más expresada es IL-2, ya que es secretada tanto por macrófagos como por linfocitos Th, su función es estimular el crecimiento y diferenciación de células específicas para el antígeno de interés, además de ser necesaria para la generación de memoria inmunológica.; la IL-4 induce la proliferación de los linfocitos B y la producción de IgE cuando el antígeno presentado al linfocito T proviene de un patógeno extracelular, e IFN- γ cuando el antígeno presentado proviene de patógenos intracelulares, actuando como un potente activador de macrófagos y desencadenando la muerte de parásitos intracelulares (Arai et al., 1990). IL-10 también es de importancia en la respuesta inmune, ya que se le asocia con la inhibición de citocinas implicadas en la respuesta de linfocitos Th a patógenos intracelulares (Saraiva & O'Garra, 2010).

Polarización de la respuesta inmune: Paradigma Th1/Th2

La polarización de la respuesta inmune basada en la flexibilidad de las células T CD4⁺ vírgenes de diferenciarse en subtipos con funciones efectoras específicas, permite al sistema inmune responder apropiadamente a un agente infeccioso (Tangye et al., 2013). La diversificación de las células Th fue descrita por Mosmann y Coffman, quienes nombraron

Th1 y Th2 a los subconjuntos que secretaban principalmente IFN- γ e IL-4, respectivamente (Mosmann & Coffman, 1989). Después, Locksley y colaboradores (1989) añadieron información sobre su función efectora al describir a las células Th1 como responsables de eliminar a patógenos intracelulares y a las células Th2 como responsables de eliminar a patógenos extracelulares, al hacer dominar un tipo de respuesta contra la infección provocada por *Leishmania major* (Wilson et al., 2009). Así, las células Th1 son particularmente efectivas en activar mecanismos microbicidas de macrófagos y células CD8⁺ citotóxicas contra bacterias intracelulares, protozoarios y virus (Lazarevic et al., 2013); en contraste, el subtipo Th2 secreta las citocinas requeridas para eliminar parásitos extracelulares a través de la activación de los linfocitos B (con IgE e IgG).

La diferenciación de un linfocito Th virgen hacia una subtipo en particular (Th1, Th2, Th17 y Tregs) dependerá del microambiente de citocinas presentes (Figura 2), las cuales producirán cambios intrínsecos con efectos en la abundancia, interacción y localización de factores de transcripción, generando cambios a nivel de expresión genética (Tangye et al., 2013; Wilson et al., 2009). Para que los linfocitos T se diferencien a Th1 se necesita la presencia de IL-12 para activar al factor de transcripción T box 21 (Tbet) de la familia T box, mientras que para activar Th2 se requiere de IL-4 que activa al factor de transcripción proteína de unión a GATA 3 de la familia GATA (Jiang & Dong, 2013; Lazarevic et al., 2013; Tangye et al., 2013). Tbet es considerado el factor de transcripción “maestro” en la diferenciación de los linfocitos Th1, ya que su activación por la presencia de IFN- γ monta un sistema de retroalimentación positiva al desencadenar la transcripción de IFN- γ (vía los factores de transcripción STAT1 y STAT4); de manera similar ocurre en la

diferenciación de linfocitos Th2, donde la sobreexpresión de GATA3 se debe a la presencia de IL-4 y la activación del factor de transcripción GATA3, para después retroalimentar positivamente la señalización al desencadenar la expresión de IL-4. Así, las células Th1, productoras de IL-2 e IFN- γ son capaces de coordinar una respuesta para eliminar a un patógeno intracelular como *Mycobacterium*, y las células Th2 productoras de IL-4, IL-5 e IL-10 son capaces de coordinar una respuesta para eliminar a un patógeno extracelular como *Toxocoracannis* (Romagnani, 1991).

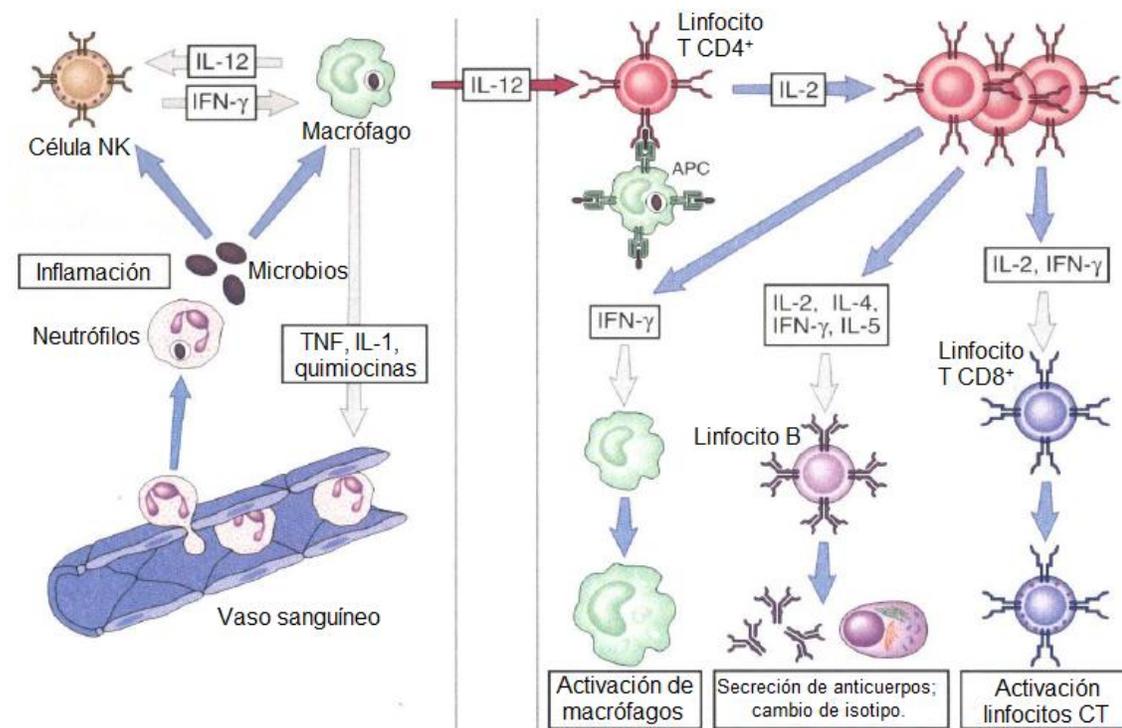


Figura 2. Activación de células efectoras debido a la expresión de citocinas (Abbas et al., 2010).

ANTECEDENTES

En contraste a las funciones protectoras conferidas por las células Th, una activación inapropiada o exagerada puede conducir al desarrollo de alergias y enfermedades

autoinmunes (Lazarevic et al., 2013). Entender las enfermedades autoinmunes humanas es el reto más grande de la inmunología (Abbas et al., 2010). Actualmente se conocen más de 80 enfermedades autoinmunes y 40 posibles padecimientos relacionados con autoinmunidad (AARDA, 2010). Solamente en Estados Unidos, la Asociación Americana de Enfermedades Autoinmunes Relacionadas (AARDA, por sus siglas en inglés) reporta 23.5 millones de personas que padecen algún desorden autoinmune, superando por un millón a las personas que padecen enfermedades cardiovasculares y por 14.5 millones a los enfermos de cáncer, aunado al costo reportado por 57 billones de dólares (AARDA, 2010). Algunas enfermedades autoinmunes mediadas por el subtipo Th1 son la enfermedad celíaca (CD) y la enfermedad de Crohn (Monteleone et al., 2004). Por su parte, las enfermedades causadas por anomalías en el subtipo Th2 son el asma y otras reacciones alérgicas (Zhu & Paul, 2010).

Inmunomoduladores de los linfocitos T

Hasta ahora, se han presentado diversas estrategias para tratar las enfermedades autoinmunes, surgiendo el concepto de inmunomoduladores, los cuales se describen como compuestos que desencadenan o suprimen aspectos de la respuesta inmune (Tzianabos, 2000). Un primer acercamiento sobre inmunomoduladores es aumentar o suprimir las citocinas implicadas, ejemplo de dicha estrategia es el tratamiento para la artritis reumatoide con anticuerpos neutralizantes de la TNF- α (Feldmann et al., 1996), el uso de receptores de IL-4 solubles para el tratamiento del asma (Borish et al., 2001), el desarrollo de fármacos como Briakinumab y Ustekinumab neutralizantes de IL-12/23 para el

tratamiento de psoriasis y la enfermedad de Crohn (Gordon et al., 2012; Sandborn et al., 2008), y Fontolizumab para neutralizar al IFN- γ (Reinisch et al., 2010). Sin embargo, el tratamiento con citocinas recombinantes ha producido efectos adversos: linfopenías por IFN, IL-2 y TNF, monocitopenia por IFN- γ y TNF, neutrofilia por IL-2, IFN- α y TNF, depresión (entre otros síntomas) con el uso de IL-2 e IFN- α (Spelman et al., 2006).

Buscando alternativas para la modulación de expresión de citocinas, se han caracterizado diversas proteínas, glicoproteínas, péptidoglicanos, lipopolisacáridos y toxinas, a partir de árboles, algas, hongos, bacterias y organismos venenosos. *Panax ginseng* afecta la expresión de IL-4 e IFN- γ (Spelman et al., 2006); el perfil de citocinas de células del bazo de animales tratados con polisacárido A de *Bacteroides fragilis* muestra el incremento de IFN- γ , IL-2 e IL-10 (Tzianabos, 2000); β -(1-3)-glucanos insolubles de hongos y levaduras estimulan la producción de IL-1, IL-2 y TNF- α (Tzianabos, 2000); la exotoxina pertussistoxin producida por *Bordetella pertussis* estimula la producción tanto de IFN- γ como de IL-4 (Ryan et al., 1998). Los ejemplos citados tienen en común un aspecto: compuestos con efecto tanto en la expresión de citocinas del subtipo Th1 como del subtipo Th2. Naturalmente, el sistema inmune de vertebrados superiores no posee un regulador maestro del paradigma Th1/Th2 ya que se necesitan numerosos factores de transcripción, por lo cual depende de la respuesta coordinada de moléculas reguladoras que controlan la expresión génica y la función efectora (Tangye et al., 2013), de manera que encontrar como blanco terapéutico uno de los componentes moleculares implicados resultaría excepcional.

Otras estrategias terapéuticas que no implican la neutralización de citocinas inmunomoduladoras o su administración, se ha dirigido a encontrar moléculas agonistas y antagonistas de canales iónicos y receptores colinérgicos, debido a que su presencia varía según el estado de maduración de la célula y su subtipo. Se ha descrito que el bloqueo selectivo de canales Kv en células T suprime su proliferación y la producción de citocinas (Chandy et al., 2004). Desde 1989(Figura 3) se han aislado inhibidores cada vez más potentes y selectivos de canales Kv, procedentes del veneno de alacrán (ChTX, MgTX, Anuroctoxin, Vm23, Vm24, entre otros), extractos de anémona (ShK) y extractos de plantas (correolide) (Bagdány et al., 2005; Chandy et al., 2004; Chi et al., 2012).

El desarrollo de la toxina ShK es un claro ejemplo de un inmunomodulador específico para un subtipo celular y que tiene como blanco un canal dependiente de voltaje. La toxina ShK tiene como blanco al canal Kv1.3, el cual se sobreexpresa en células T efectoras, sin afectar a células T vírgenes o de memoria que en cambio aumentan la expresión de canales IKCa1 (Chandy et al., 2004; Chi et al., 2012). Así, se ha demostrado que la mayoría de las células T patogénicas reactivas a mielina de pacientes con esclerosis múltiple son células T efectoras $Kv1.3^{\text{high}}IKCa1^{\text{low}}$ (Chandy et al., 2004; Panyi et al., 2004).

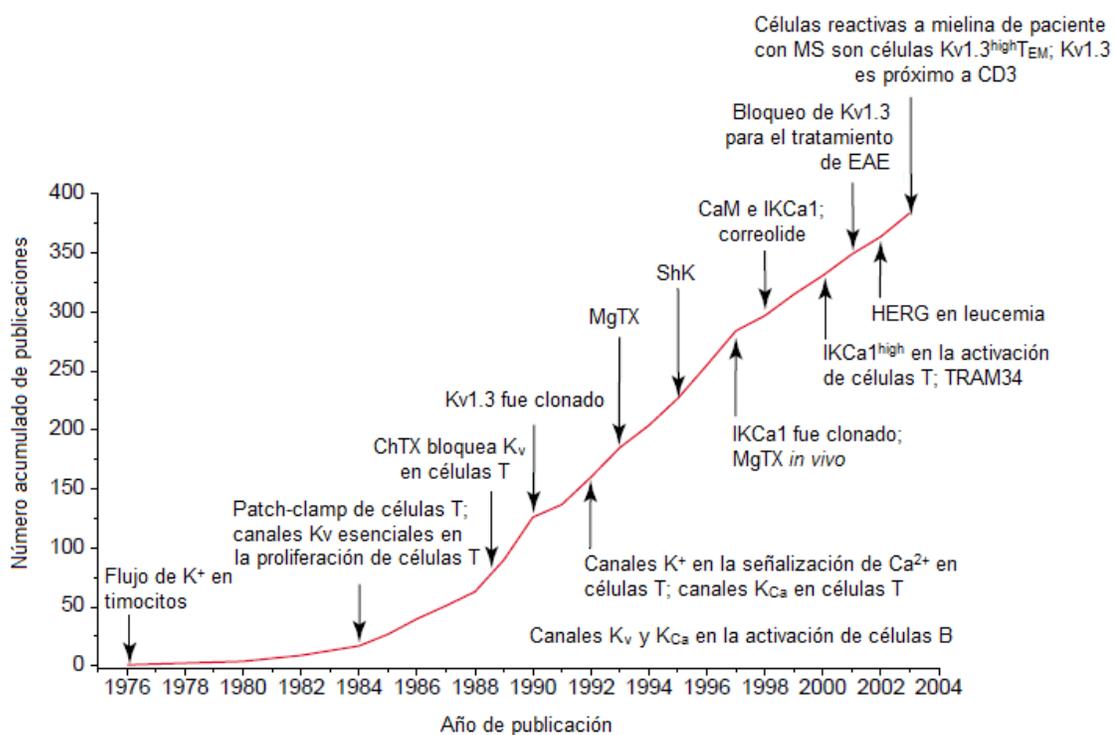


Figura 3. Descubrimiento de bloqueadores de canales K^+ en células del sistema inmune(Chandy et al., 2004).

También, se ha demostrado la presencia de un sistema colinérgico no neuronal implicado en la inmunomodulación autocrina y paracrina del sistema inmune. Los linfocitos son capaces de sintetizar y secretar acetilcolina (ACh), y expresar receptores colinérgicos del tipo muscarínico (mAChR) y nicotínico (nAChR) (De Rosa et al., 2005). Los receptores mAChR son glicoproteínas acopladas a proteínas G con efecto sobre segundos mensajeros, concentración de iones y modulación de la actividad de proteínas cinasas (Figura 4), existiendo cinco tipos de estos receptores: M1, M2, M3, M4 y M5 (Kawashima & Fujii, 2003; Qian et al., 2011). Los receptores nAChR son pentámeros (tipos de subunidades de $\alpha 1$ a $\alpha 10$, de $\beta 1$ a $\beta 4$, γ y δ) miembros de la superfamilia de receptores ionotrópicos o canales iónicos activados por ligando, median la entrada de Na^+ y Ca^{2+} , y la

salida de K^+ (Kawashima & Fujii, 2003; Qian et al., 2011). Se ha reportado que la activación de linfocitos T vía TCR-CD3/CD28 provoca la sobreexpresión de ACh, y que la presencia de agonistas nicotínicos y muscarínicos estimula la síntesis de ADN, producción de IL-2, incremento en la expresión de la subunidad $\alpha 7$, y oscilaciones en la concentración de Ca^{2+} en linfocitos periféricos humanos (De Rosa et al., 2005; Kawashima et al., 2012). Además, leucocitos mononucleares que tienen el gen para $\alpha 7$ silenciado expresan más IFN- γ e IL-6 en presencia de ovoalbúmina, mientras que ratones que tienen los genes silenciados para los receptores M1 y M5 expresan menos IFN- γ e IL-6 cuando se les expone a ovoalbúmina, sugiriendo la importancia de los receptores mAChR y nAChR en la respuesta inmune mediada por células T (Kawashima et al., 2012). Estas características convierten a estos receptores en posibles blancos farmacológicos.

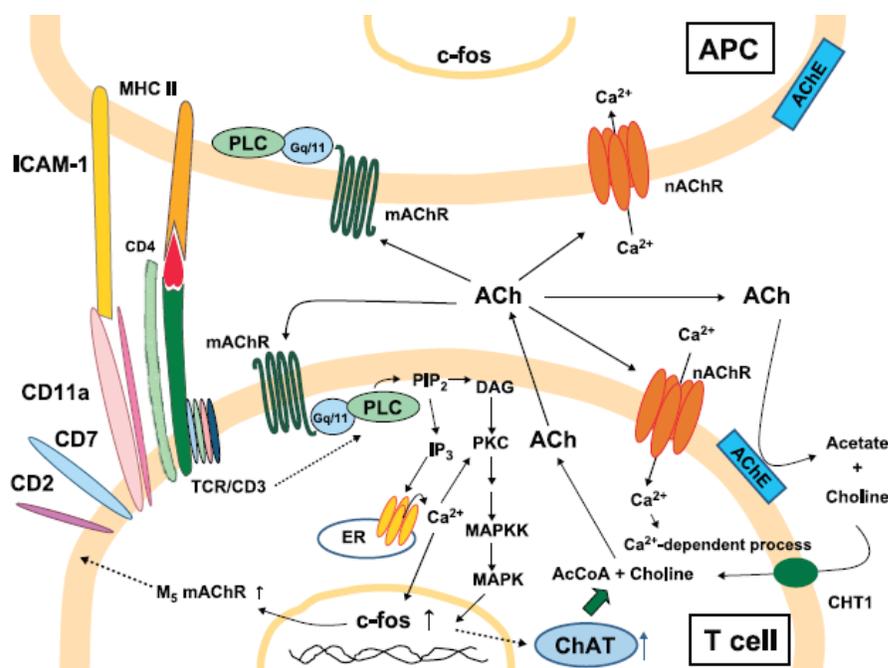


Figura 4. Vías de señalización involucradas en el sistema colinérgico de linfocitos activados en la respuesta inmune. (Kawashima & Fujii, 2003).

Conotoxinas

El reino animal incluye más de 100,000 especies venenosas representadas en los principales filos como cordados (reptiles, peces, anfibios y mamíferos), equinodermos (estrellas de mar), moluscos (caracoles cono, pulpos), anélidos, nemertinos, artrópodos (arácnidos, insectos) y cnidarios (anémonas, medusas, corales) (Favreau & Stöcklin, 2009).

La mayoría de los invertebrados marinos sésiles y de cuerpo blando han desarrollado métodos químicos para defenderse de los depredadores y de las especies competidoras (Fusetani & Kem, 2009). Los caracoles carnívoros del género *Conus* han desarrollado un poderoso método de sobrevivencia a través del ataque a sus presas por medio de un arpón que libera un veneno abundante en péptidos (menores a 40 aminoácidos) ricos en cisteínas, de rápida acción y con afinidad específica sobre diversos canales iónicos, receptores y enzimas. Fue a mediados de 1970 cuando se purificó el primer componente polipeptídico del veneno de *C. geographus* que presentó evidencia farmacológica al inhibir canales Na^+ dependientes de voltaje (Norton & Olivera, 2006). Hasta hoy se han descrito al menos 500 especies depredadoras del género *Conus*, cada una de ellas posee su propio veneno distintivo con más de 200 diferentes componentes, estimando así más de 50,000 componentes farmacológicamente activos con la capacidad de discriminar entre miembros de una familia de canales iónicos (Terlau & Olivera, 2004).

El aparato venenoso de los caracoles *Conus* (Figura 5) consiste en un conducto, donde el veneno se sintetiza y almacena, un bulbo venenoso, que se piensa es para expulsar

el veneno desde el conducto, y una aguja tipo arpón de punta hueca (rádula modificada) para inyectar el veneno mediante una probóscide muscular (Fusetani & Kem, 2009; Norton & Olivera, 2006).

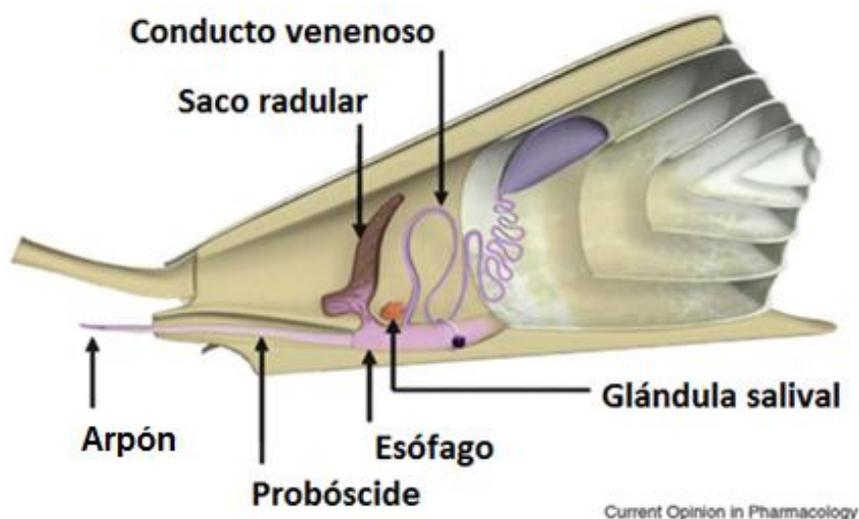


Figura 5. Vista esquemática del aparato venoso de los caracoles cono. Modificado de (Favreau&Stöcklin, 2009).

Se le nombra conotoxinas a los conopéptidos ricos en puentes disulfuro, clasificándolas con base en su patrón de cisteínas y su secuencia señal pre-pro-péptido (Terlau & Olivera, 2004). A la fecha se han descrito más de 26 superfamilias (con base en su secuencia señal), 26 diferentes patrones de cisteínas y 12 familias farmacológicas, clasificaciones representadas por letras (A-Y), números romanos (I-XXVI) y por letras del alfabeto griego (α - ω), respectivamente (ConoServer). Las conotoxinas son interesantes moléculas con un gran potencial terapéutico en humanos: como antinociceptivo, antiepiléptico, y como protector de cardio- y neuro-actividad, demostrando ser péptidos altamente selectivos y potentes bloqueadores o moduladores de la función de

los canales iónicos implicados (Bernáldez *et al.*, 2013). El potencial terapéutico de las conotoxinas se ve favorecido por su pequeño tamaño (< 5 kDa), su relativa facilidad para ser sintetizadas, estabilidad estructural y especificidad por su blanco (Fusetani & Kem, 2009). La primera conotoxina capaz de bloquear un canal de K^+ se identificó hace más de 15 años, y sólo unos pocos conopeptidos bloqueadores de los canales de K^+ han sido extensamente caracterizados (Terlau & Olivera, 2004). Un fuerte contraste entre los péptidos que bloquean canales K^+ de aquellos que bloquean canales de Na^+ es que las familias de péptidos bloqueadores de canales Na^+ parece ser conservada en diferentes especies de *Conus*, mientras que las familias de péptidos que bloquean canales K^+ divergen entre las distintas especies de *Conus*(Terlau & Olivera, 2004).

La variedad de las conotoxinas contenidas en el veneno de los caracoles *Conus* se ha asociado con su dieta(Elliger et al., 2011). De entre todas las especies de caracoles cono,*Conuscalifornicus*Hinds 1844 es endémico de las aguas subtropicales de la costa noreste del pacífico (del centro de California a Baja California Sur) y es el miembro más inusual y con la dieta más variada del género (Gilly et al., 2011). Comparado con otros miembros del género *Conus*, su capacidad para vivir en las aguas subtropicales del pacífico y poder cazar más de 56 especies, sugiere el novedoso arsenal venenoso de *C. californicus*(Elliger et al., 2011).



Figura6. Conus californicus. Natural History of Orange County, California School of Biological Sciences, Fotografía por Peter J. Bryant.

En 2010 Biggs y colaboradores propusieron a la superfamilia J2 con el patrón de cisteínas XIV que se diferencia de la superfamilia J por la secuencia señal, incluyendo a seis péptidos de *C. californicus* y uno de *C. literatus*. La conotoxina lt14a procedente de *C. literatus*, fue reportado con actividad sobre receptores nicotínicos neuronales en músculo de rana (Peng et al., 2006) y como analgésico altamente efectivo en ratones (Sun et al., 2011). Además, de la superfamilia J se ha descrito a p14a de *C. planorbis* (Imperial et al., 2006) con capacidad de inhibir el canal Kv1.6 y subunidades de receptores nAChR neuronales y musculares, y a la conotoxina Vil14a de *C. villepini* (Möller et al., 2005) con capacidad de bloquear canales de potasio en células PC12.

Tomando en cuenta los resultados obtenidos para la toxina ShKStichodactylahelianthus, capaz de inmunomodular canales iónicos en linfocitos T humanos de manera dosis dependiente con una $IC_{50} \approx 20$ pM y suprimiendo la expresión de

IL-2 e IFN- γ (Chi et al., 2012), además de los resultados reportados por Cervantes-Luévano (2013) describiendo el efecto modulador de conotoxinas de la superfamilia J2 de *C. californicus* en la expresión de citocinas proinflamatorias en macrófagos murinos, el presente trabajo tiene como objetivo probar la capacidad de las conotoxinas de *C. californicus* para modular la polarización Th1/Th2 de la respuesta inmune en linfocitos T murinos.

JUSTIFICACIÓN

Los linfocitos T cooperadores orquestan la respuesta inmune adaptativa y dependiendo del antígeno presentado madurarán hacia un subtipo celular, expresando factores de transcripción y citocinas específicas. En padecimientos autoinmunes ciertas poblaciones celulares se expresan sobre otras. El poder modular la activación de células efectoras en padecimientos autoinmunes representa una estrategia razonable. Las conotoxinas poseen un amplio potencial farmacológico, debido a su afinidad por diversos canales y receptores y su efecto sobre la modulación de la polarización celular Th1/Th2 ha sido poco explorada. Es así como el presente trabajo tiene como objetivo probar el efecto de conotoxinas sintéticas en la proliferación y expresión de genes y citocinas característicos de los linfocitos Th1/Th2 murinos.

HIPÓTESIS

Las conotoxinas afectan funciones efectoras de los linfocitos T murinos como la producción de citocinas.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de las toxinas de *Conuscalifornicus* sobre la polarización de la respuesta inmune Th1/Th2murina.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Explorar las diferencias en la expresión de citocinas Th1/Th2 en linfocitos T murinos tratados con toxinas de *Conuscalifornicus*.
- Evaluar el efecto de las toxinas de *Conuscalifornicus* en la expresión de los factores de transcripción murinos responsables de la polarización Th1/Th2.
- Evaluar el efecto de las toxinas de *Conuscalifornicus* en la proliferación de linfocitos T murinos.

METODOLOGÍA

Obtención de linfocitos

Se utilizaron ratones con un peso aproximado de 20 g, manteniéndolos en jaulas con alimento y agua *ad libitum*, en una habitación con temperatura ambiente (21°C) y luz/oscuridad controladas (12 horas luz, 12 horas oscuridad), habituándolos a las condiciones de vivienda 7 días previos a su sacrificio. Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical de acuerdo a los lineamientos establecidos por la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

Las células fueron obtenidas a partir de los nódulos linfáticos. Se colocó al animal en una plancha de operación con el abdomen hacia arriba (atando sus patas hacia los extremos de la plancha de operación), fue rociado con etanol al 70% y se procedió a hacerle una incisión en la línea media con ayuda de unas tijeras iris, para después remover la piel hacia los costados (pinchándola en la plancha), y proceder a remover los nódulos axilares, cervicales e inguinales (Figura 7); los nódulos mesentéricos fueron removidos tras hacer una incisión (2 cm) en el peritoneo y localizarlos por el área del intestino delgado (Coligan, 2001).

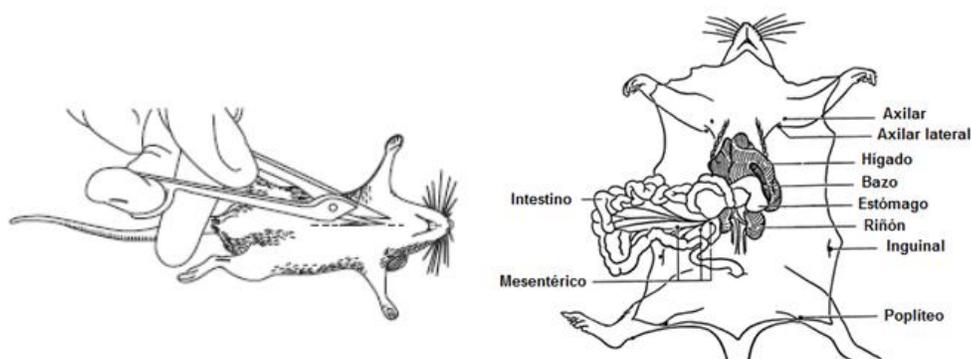


Figura 7. Disección de los nódulos linfáticos en modelo murino(Coligan, 2001).

Los nódulos extraídos se colocaron en una caja Petri con 3ml de medio RPMI 1640 suplementado con 10% suero fetal bovino inactivado y 1% antibiótico-antimicótico (RPMI 1640-s), para después disgregarlos sobre una membrana de nylon con la ayuda del émbolo de una jeringa y recuperar las células en suspensión en un tubo de 15 ml, y proceder acentrifugar a 300 x *g* por 5 minutos, descartar el sobrenadante y resuspender las células en un volumen conocido de medio RPMI 1640-s.

Cultivo primario de linfocitos

A partir de las células obtenidas de los nódulos linfáticos, se montó un cultivo primario en placa de 96 pozos. Se cultivaron 0.5×10^6 células por pozo, agregando 1 μ l de Dynabeads® Mouse T-Activator CD3/CD28 (Life Technologies) por cada 100 μ l de cultivo, adicionando los péptidos Cal14.1a, Cal14.1b, Cal14c, Cal14.2b, Cal14.2c y Cal14b a una concentración final en pozo de 5 μ M (péptidos y concentraciones reportadas sobre células del sistema inmune por Cervantes-Luévano, 2013), en un volumen final de 200 μ l/pozo, incubando el cultivo por 72 h a 37°C en atmósfera de 5% CO₂. El diseño experimental de la placa se muestra en la Figura 8.

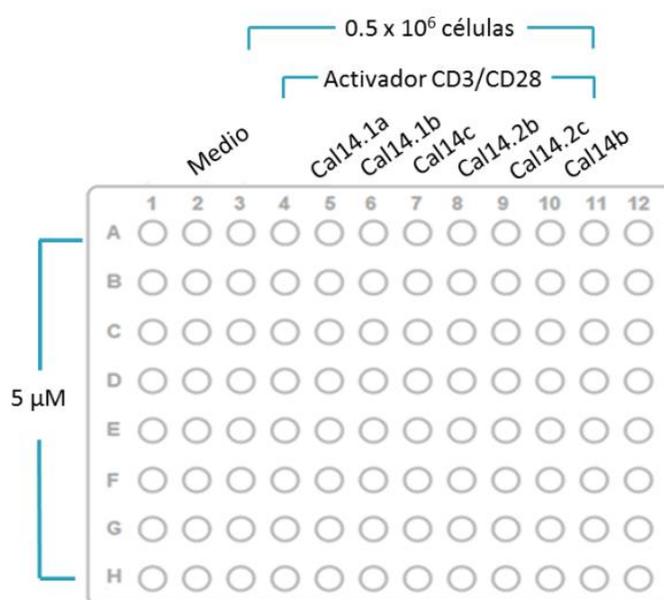


Figura 8. Diseño experimental del cultivo primario de nódulos linfáticos tratados con conotoxinas.

Evaluación de la proliferación celular

Transcurridas las 72 h de cultivo, se procedió a evaluar la proliferación celular a través de un ensayo colorimétrico por reducción de MTS (Promega), adicionando 20 μ l de la solución por cada 100 μ l de cultivo y leyendo (2 h y 4h posteriores a la adición del MTS) a 490 nm con un lector de placas (Epoch, BioTek).

Extracción de ARN

Bajo las condiciones de cultivo primario mencionadas anteriormente y transcurridas las 72 h de cultivo, se procedió a extraer el ARN total a través de la solución TRI Reagent (Sigma) siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente, se lisaron $5-10 \times 10^6$ células en 1 ml de TRI reagent, incubando por 5 min a temperatura ambiente, para después agregar 0.1 ml de 1-bromo-3-cloropropano (BCP) y agitar (manualmente) por 15 s, dejando

reposar por 15 min y proceder a centrifugar a 12 000 x g por 15 min a 4°C; a continuación se recuperó la fase transparente para depositarla en un nuevo tubo al que se agregó 500 µl de isopropanol, se agitó (manualmente) y se dejó reposar por 10 min a temperatura ambiente para después centrifugar a 12 000 x g a 4°C por 15 minutos. El ARN se lavó descartando el sobrenadante y adicionando 1 ml de etanol al 75% (H₂O-DEPC) para después centrifugar a 7 500 x g a 4°C por 5 min, descartando el sobrenadante y dejando secar a temperatura ambiente. El ARN se resuspendió en 20 µl de H₂O-DEPC, se cuantificó (UV-Vis NanoDrop 2000) y se comprobó su integridad en un gel desnaturizante de agarosa (1.2%) (Sambrook y Russell, 2001).

Síntesis de ADNc

La síntesis del ADNc se realizó con el kit SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Brevemente, en un tubo (en hielo) de 200 µl se agregó 4.5 µg de ARN total, 1 µl Oligo dT20, 1 µl buffer de alineación, completando el volumen a 8 µl con H₂O-DEPC, para proceder a incubar a 65°C por 5 min en un termociclador y pasar el tubo a hielo por 1 min, agregar 10 µl de 2X First-Strand Reaction Mix y 2 µl de SuperScript III/RNaseOUT Enzyme Mix, agitar con vortex, centrifugar e incubar por 50 min a 50°C y por 5 min a 85°C.

PCR punto final y PCR tiempo real

A partir del ADNc se amplificaron los genes de interés por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El volumen de reacción fue de 25 µl por cada par de

oligonucleótidos, reacción que consistió en 5x green buffer, MgCl₂ 2.5 mM, dNTPS 0.2 mM, 3 µl ADNc (~50 ng), 1.25 U GoTaq DNA pol y 0.2 µM de cada oligonucleótido (variable para cada par de oligonucleótidos, Tabla 1). Las condiciones de PCR fueron: un ciclo inicial de desnaturalización de 95°C por 2 min, 40 ciclos de 95°C por 30 s, 60°C por 30 s, 72°C por 1 min, y un ciclo final de extensión a 72 °C por 5 min. Los productos amplificados por PCR fueron evaluados en un gel de agarosa al 2%.

Una vez que se comprobaron las condiciones mencionadas, se procedió a realizar PCR tiempo real (ciclo inicial de 10 min a 95°C; 40 ciclos con 30 s a 95°C, 30 s a 60°C y 1 min a 72°C; ciclo final de 5 min a 72 °C) para la cuantificación relativa de expresión génica de los factores de transcripción Tbet y GATA3 de acuerdo a la guía del proveedor AppliedBiosystems utilizando como control de expresión la subunidad ribosomal 18S. Brevemente, se partió de 20 ng deADNc en un volumen de 4.5 µl, agregando 5 µl de Sybrgreen master mix (AppliedBiosystems) y al menos 0.2 µM de cada par de oligonucleótidos (Tabla 1), aforando a 10 µl con H₂O.

Tabla 1. Secuencia y concentración de oligonucleótidos empleados para amplificar los genes murinos de interés.

Gen	Secuencia	Concentración OligonM
T-bet	FGCCAGGGAACCGCTTATATG	900
	RGACGTCATCTGGGTCACATTGT	
GATA3	FCTGACGGAAGAGGTGGACGT	300
	RGGATACCTCTGCACCGTAGCC	
18S	F GTAACCCGTTGAACCCATT	200
	RCCATCCAATCGGTAGTAGCG	

Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA)

Se evaluó la expresión de las citocinas IFN- γ , IL-2, IL-4 e IL-10 en el cultivo primario de linfocitos tratados con las conotoxinas bajo las condiciones mencionadas anteriormente con ayuda del kit Mouse Th1/Th2 ELISA Ready SET-Go (eBioscience) según las especificaciones del fabricante. Brevemente, se cubrió la placa con 100 μ l/pozo del anticuerpo de captura (diluido en Coating Buffer) y se incubó a 4°C por toda la noche. Después, se aspiraron los pozos y se lavaron cinco veces con \sim 250 μ l/pozo de PBS-Tween, esperando 1 min entre cada lavado absorbiendo los residuos con papel secante. Posteriormente, se bloqueó la placa con 200 μ l/pozo con 1x AssayDiluent y se incubó a temperatura ambiente por 1 h. A continuación, se agregaron 100 μ l/pozo de las muestras y las citocinas estándares, incubando a temperatura ambiente por 2 h. Después se lavó la placa (5 lavados con \sim 250 μ l/pozo de PBS-Tween) y se agregó 100 μ l/pozo del anticuerpo de detección, dejando incubar a temperatura ambiente por 1 h. Se procedió a lavar la placa (5 lavados con \sim 250 μ l/pozo de PBS-Tween) y se añadió 100 μ l/pozo de la enzima Avidin HRP, incubando 30 min. Se lavó la placa (7 lavados con \sim 250 μ l/pozo de PBS-Tween, esperando 2 min entre cada lavado) y se agregó 100 μ l/pozo del sustrato TMB, dejando incubar 15 min y leyendo a 450 y 570 nm. Las citocinas estándar, el anticuerpo de detección, y la enzima fueron diluidos en 1x Assaydiluent. Las muestras son el sobrenadante de cada condición de cultivo (descritas anteriormente) obtenidas por centrifugación (en tubos de 1.5 ml) a 4,000 rpm por 6 min a 4°C.

Análisis Estadístico

Los datos fueron analizados por la prueba t student con ayuda del software GraphPadPrism, tomando como valores significativos $P < 0.05$.

RESULTADOS

Evaluación de la Proliferación Celular

Por medio del ensayo colorimétrico con MTS, se obtuvo el índice de proliferación celular en las células tratadas con las conotoxinas sintéticas del veneno de *C. californicus*. En la Figura 9, se muestra el cambio de color de los pozos con células y los pozos con células tratadas con el activador CD3/CD28, con respecto al medio solo (sin células), indicando mayor reducción del reactivo. A las absorbancias obtenidas tras la lectura de la placa a 490 nm, se les restó el promedio de las absorbancias obtenidas en los pozos con medio solo más MTS. Los resultados se graficaron como la absorbancia promedio \pm la desviación estándar de cada condición, normalizados contra la absorbancia promedio del control (linfocitos tratados con el activador CD3/CD28) indicada como una línea horizontal en la Figura 10. Las conotoxinas que presentaron cambios significativos en la proliferación celular ($P < 0.05$) fueron Cal14.1b, Cal14.2b, Cal14.2c y Cal14b. Así, Cal14.2b, Cal14.2c y Cal14b tienen un efecto negativo sobre la proliferación celular reduciéndola al menos en un 27%, mientras que Cal14.1b es la única toxina con la capacidad de aumentar el índice de proliferación hasta en un 59%.

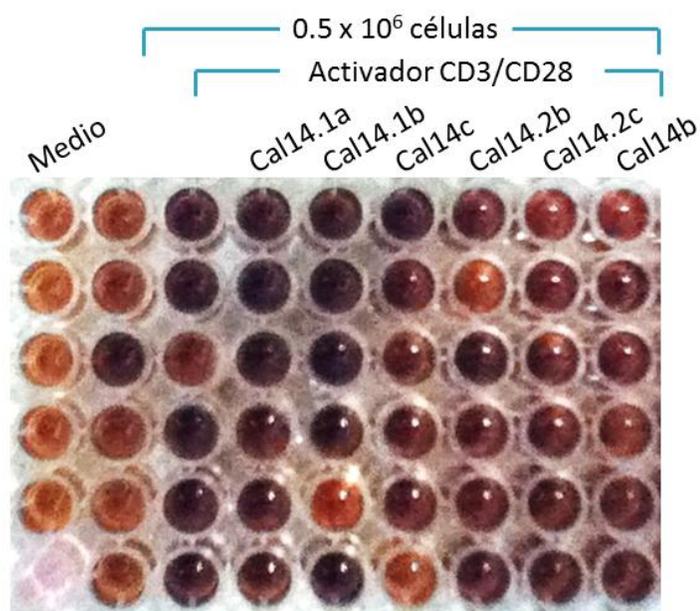


Figura 9. Ensayo de reducción de MTS. Cambio colorimétrico observado tras 4 h de incubación del cultivo con el reactivo MTS.

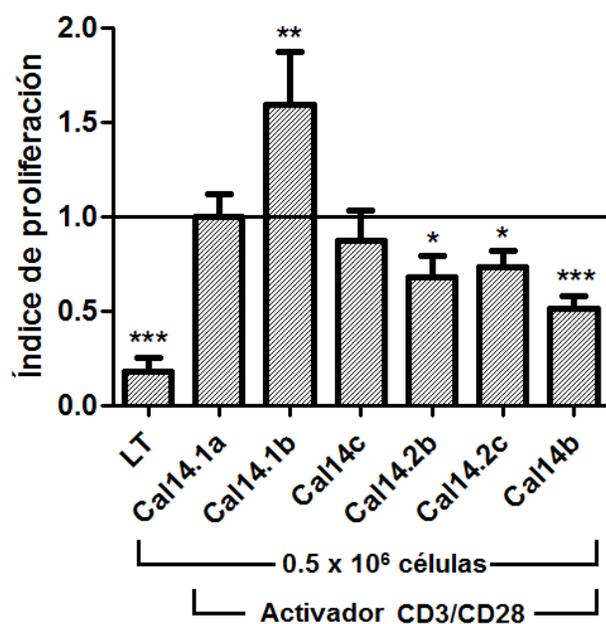


Figura 10. Índice de proliferación en células tratadas con conotoxinas. El índice de proliferación se obtuvo tras normalizar la absorbancia (lectura a 490nm) de las células tratadas con las conotoxinas, entre la absorbancia de las células activadas con el activador CD3/CD28 (Índice de proliferación = 1, barra horizontal). Los valores representan el promedio \pm la desviación estándar. * $P < 0.05$; ** $P < 0.005$; *** $P < 0.0005$.

Evaluación de la expresión de los factores de transcripción Tbet y GATA3

Por medio de RT-PCR y PCR en Tiempo Real, se cuantificó la expresión relativa a nivel de ARNm de los factores de transcripción Tbet y GATA3, involucrados en la diferenciación de linfocitos Th1 y Th2, respectivamente. La extracción de ARNm se realizó a las 72 h de cultivo bajo las condiciones establecidas en la metodología. El análisis de los datos (Figura 11) se realizó por medio de la normalización de la expresión relativa del gen de interés (Tbet y/o GATA3) contra el gen constitutivo (la unidad ribosomal 18s), además de una segunda normalización contra la expresión relativa de Tbet y GATA3 en el control (linfocitos tratados con el activador CD3/CD28).

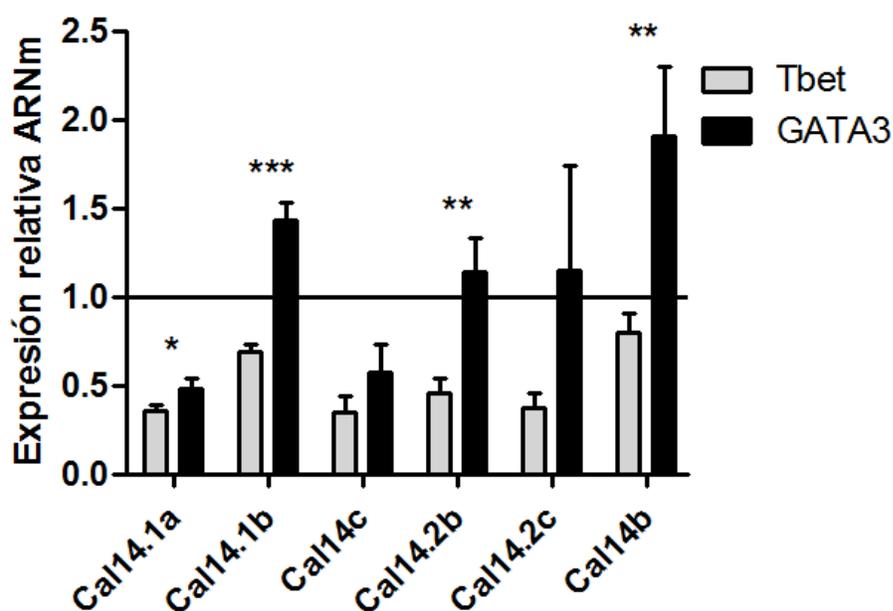


Figura 11. Expresión relativa de los factores de transcripción Tbet y GATA3. Los datos fueron normalizados contra el gen endógeno (unidad ribosomal 18s) y contra el control (linfocitos tratados con el activador CD3/CD28, expresión relativa = 1, línea horizontal). Los valores representan el promedio \pm la desviación estándar. * $P=0.04$; ** $P<0.009$; *** $P=0.0009$.

En la Tabla 2, se presenta los datos graficados en la Figura 11. En general, todos los tratamientos con las conotoxinas hicieron dominar la expresión de GATA3, con valores significativos ($P < 0.05$) en las células tratadas con las toxinas Cal14.1a, Cal14.1b, Cal14.2b y Cal14b. Las conotoxinas Cal14.1b, Cal14.2b, Cal14.2c y Cal14b, lograron aumentar la expresión de GATA3 en un 43%, 14%, 15% y 91%, respectivamente. La expresión relativa de Tbet se mantuvo similar para Cal14.1a, Cal14c, Cal14.2b y Cal14.2c, presentando valores al menos 50% menores con respecto al control, mientras que Cal14.1b y Cal14b lograron disminuir la expresión en un 20-30%.

Tabla 2. Expresión relativa de Tbet y GATA3 en células tratadas con conotoxinas.

Condición	Expresión Relativa ARNm Tbet	Expresión Relativa ARNm GATA3
LT + DB	1.00±0.40	1.00±0.96
Cal14.1a	0.36±0.03	0.48±0.06
Cal14.1b	0.70 ±0.05	1.43±0.10
Cal14c	0.35±0.09	0.57±0.16
Cal14.2b	0.46±0.08	1.14±0.19
Cal14.2c	0.37±0.09	1.15±0.59
Cal14b	0.79 ±0.11	1.91±0.39

Evaluación de la expresión de IFN- γ , IL-2, IL-4 e IL-10

Para conocer el patrón de expresión de citocinas en las células tratadas con las toxinas, se realizó un ELISA de sándwich. Se evaluó la presencia en sobrenadante de las citocinas IFN- γ , IL-2, IL-4 e IL-10 tras las condiciones de cultivo mencionadas en la metodología.

La cuantificación se realizó con base en una curva de calibración elaborada con concentraciones conocidas de los estándares de las citocinas. Para el análisis de los resultados, se restaron las lecturas obtenidas a 570 nm de aquellas obtenidas a 450 nm, para después extrapolar los resultados a las curvas de calibración para cada citocina. Los valores se expresan en pico gramos (pg) de proteína total evaluados en 100 µl de sobrenadante del cultivo celular (Figura 12 y Figura 13).

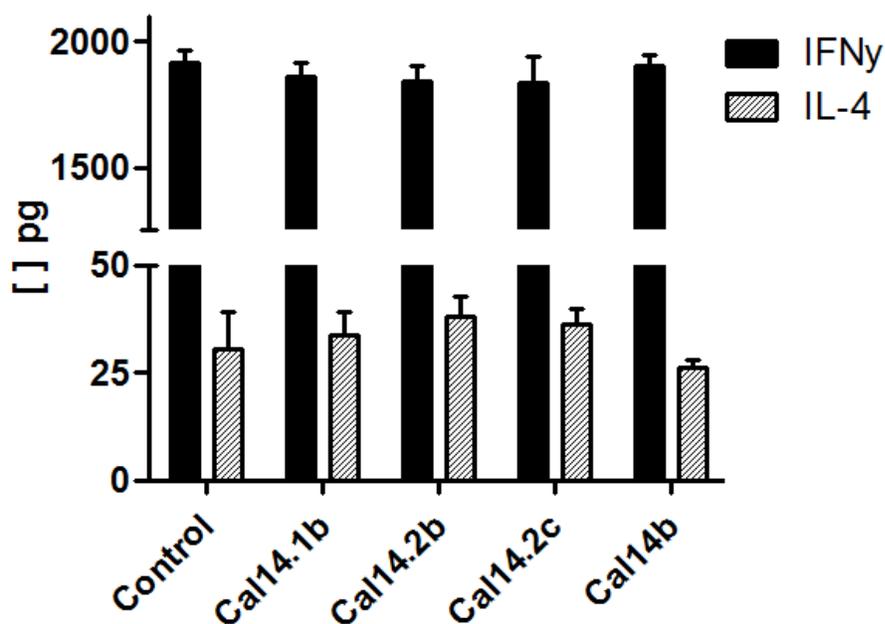


Figura 12. Cuantificación de IFN- γ e IL-4 en células tratadas con conotoxinas. El control son las células tratadas con el activador CD3/CD28.

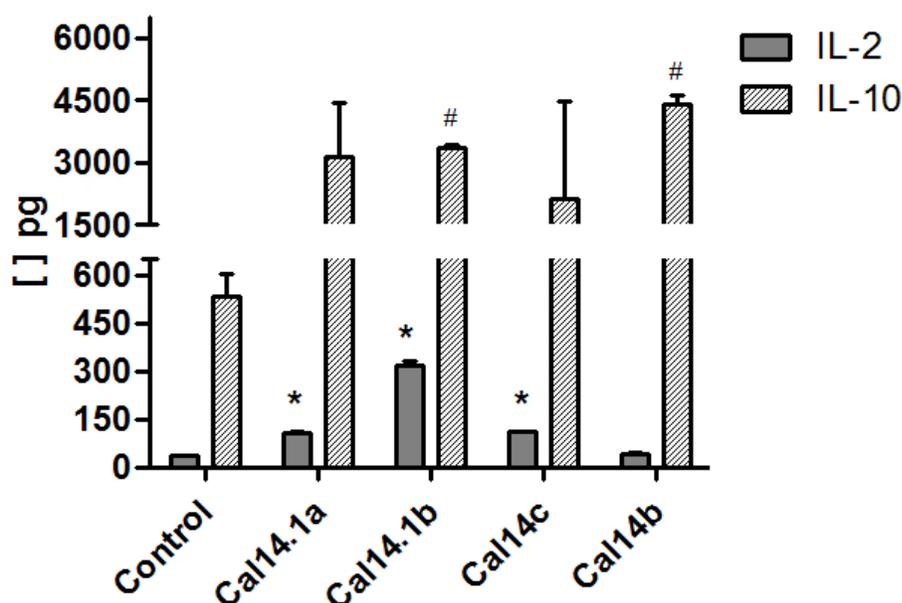


Figura 13. Cuantificación de IL-2 e IL-10 en células tratadas con conotoxinas. El control son las células sin ningún estímulo. Las diferencias significativas ($p < 0.05$) de IL-2 con respecto al control se denotan con *. Las diferencias significativas ($p < 0.05$) de IL-10 con respecto al control se denotan con #.

Los resultados muestran patrones similares en la expresión de citocinas de células tratadas con conotoxinas, de aquellas que no recibieron ningún estímulo o solo fueron tratadas con el activador CD3/CD28. En la Figura 12, se observa la expresión de IFN- γ en ~2,000 pg, mientras que IL-4 no supera los 50 pg. Por su parte, en la Figura 13, se puede observar mayor expresión de IL-10 > 2000 pg con respecto a IL-2 < 400 pg, obteniendo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) con respecto al control en las células tratadas con Cal14.1a, Cal14.1b y Cal14c para IL-2, mientras que para IL-10 las células tratadas con Cal14.1b y Cal14b. Así, la citocina con mayor presencia en sobrenadante es IL-10, seguida de IFN- γ , IL-2 e IL-4, sin seguir un patrón de expresión hacia Th1 o Th2 evidente.

ANÁLISIS Y DISUCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

En este trabajo se comprobó el efecto de las conotoxinas de la superfamilia J2 en aspectos de la diferenciación de linfocitos T murinos. Cuando las conotoxinas son evaluadas como agentes con potencial farmacológico, por ejemplo, en líneas celulares de cáncer, se realizan ensayos de citotoxicidad, por lo cual para evaluar el potencial farmacológico en la polarización de los linfocitos T murinos es importante conocer su efecto comparado con el activador CD3/CD28. Según los resultados obtenidos, se observó que cuatro de los seis péptidos logran potenciar o disminuir el índice de proliferación. Esto representa un resultado alentador sobre el efecto de las conotoxinas en células del sistema inmune, debido a que aunque los seis péptidos conservan alta identidad entre ellos, los resultados no fueron similares. Cal14.1b guarda alta identidad con Cal14.1a (sólo un aminoácido de diferencia, información no mostrada); sin embargo, éste último no mostró cambios significativos con respecto al control ($P > 0.05$), caso similar ocurre entre Cal14c, Cal14.2b y Cal14.2c, donde Cal14c no mostró efecto mientras que Cal14.2b y Cal14.2c sí (índice de proliferación 0.68 y 0.73, respectivamente). El péptido Cal14b mostró el mayor efecto sobre la inhibición de la proliferación celular (50% menos con respecto al control), presentando la secuencia más diversa en comparación con los otros cinco péptidos, pero conservando su identidad con ellos en al menos un 70% (información no mostrada).

La polarización de los linfocitos tratados con las conotoxinas se pudo haber evaluado por la expresión relativa de las citocinas pertenecientes al perfil Th1 y Th2; sin embargo, no es suficiente, ya que existen citocinas implicadas en ambos perfiles. Una manera factible de complementar el estudio fue evaluando la expresión de Tbet y GATA3,

factores de transcripción “maestros” en la diferenciación de linfocitos Th, ya que desencadenan su expresión vía retroalimentación positiva con IFN- γ (para Tbet) e IL-4 (para GATA3). Aun cuando existen otros factores de transcripción implicados como STAT1 y STAT4 para Th1 y STAT6 para Th2, estos factores colaboran en la expresión de las citocinas que al final ayudan a expresar Tbet y GATA3, es decir, son más actores secundarios que protagonistas en la diferenciación de los linfocitos Th. Los resultados obtenidos muestran que las conotoxinas dirigen la polarización hacia el subtipo Th2, ya que para todos los casos la expresión relativa de GATA3 fue mayor que la de Tbet. En el control (células tratadas con el activador CD3/CD28) se cumplió con las expectativas de expresión, ya que se expresó Tbet sobre GATA3. En las células tratadas con Cal14.1b y Cal14b la expresión relativa de ambos genes superó los niveles obtenidos en el control, seguidos de Cal14.2b y Cal14.2c. Tomando en cuenta que para el ensayo se partió de la misma cantidad de ADNc (20 ng), esto muestra un efecto a nivel genético ocasionado por el tratamiento de las células con los péptidos. Para este ensayo no fue posible observar cambios debidos a una conotoxina en particular, a diferencia de lo obtenido en los ensayos de proliferación celular. Una causa por la cual se exprese mayormente GATA3 puede ser la predisposición genética de los ratones (wild type) a activar linfocitos Th2. También, las conotoxinas pudieran estar afectando eventos río abajo involucrados en la translocación de factores de transcripción en el núcleo celular, favoreciendo a aquellos implicados en la expresión de GATA3.

Aunque se esperaba complementar los resultados obtenidos para la expresión relativa de Tbet y GATA3 con la cuantificación de la forma proteínica de las citocinas en

sobrenadante, los resultados obtenidos no empataron. Para lo anterior, se esperaba encontrar altas concentraciones de IL-4 e IL-10 en comparación con IL-2 e IFN- γ , acertando sólo para IL-10 e IL-2, ya que la cuantificación de IL-4 se mantuvo a niveles bajos (~25 pg) y no cambió con respecto al control. En cambio, IL-10 logró expresarse en mayor proporción (>2 000 pg), en especial en las células tratadas con Cal14.1b y Cal14b. Qian et al. (2011) también obtuvieron cambios no significativos en la expresión de IL-4 aun cuando los estímulos empleados en linfocitos murinos provocaron cambios positivos en la expresión de IL-10. Así, aunque no se encontró alta expresión de IL-4, si se encontraron altas concentraciones de IL-10, citocina secretada por linfocitos diferenciados en Th2 que inhibe el desarrollo de linfocitos Th1. Los altos niveles de IFN- γ pueden deberse a que en un principio las células fueron estimuladas hacia el subtipo Th1 (vía TCR-CD3/CD28); sin embargo, las conotoxinas pudieron polarizar la respuesta hacia Th2, siguiendo con la capacidad de plasticidad con la que se ha descrito a los linfocitos Th (Zhu & Paul, 2010). Justificando los resultados obtenidos en la expresión de citocinas con el trabajo de Qian et al. (2011), se puede confirmar el efecto de las conotoxinas en la polarización de la respuesta inmune Th2.

De las conotoxinas empleadas, sólo se conoce su efecto en la polarización de macrófagos (Cervantes Luévano, 2013), pero dada su identidad con la conotoxina lt14a (información no mostrada) de *Conuslitteratus* (Peng et al., 2006) se tiene como antecedente el potencial agonista o antagonista de las conotoxinas sobre receptores nicotínicos. La importancia de los receptores nicotínicos en la polarización de linfocitos T CD4+ murinos ha sido descrita por Qian et al. (2011), quien encontró cambios en el perfil de expresión de

los receptores nAChRs cuando eran activados a través de la vía TCR-CD3/CD28, además de encontrar cambios en la expresión de IFN- γ en linfocitos Th vírgenes activados vía TCR-CD3/CD28 en presencia de nicotina y nicotina+mecamylamine (agonista+antagonista de nAChRs), aumentando y disminuyendo la expresión de IFN- γ , respectivamente, es decir la estimulación de nAChRs polariza la respuesta hacia Th1. Por otro lado, se ha descrito la capacidad de las conotoxinas con marco de cisteínas XIV para inhibir canales K^+ (Imperial et al., 2006; Möller et al., 2005). Sumando ambos posibles blancos moleculares de las conotoxinas empleadas, se atribuye los resultados obtenidos a la unión a alguno de ellos. Cabe resaltar que ambos convergen en la vía de señalización de Ca^{2+} . La disminución del índice de proliferación celular por el tratamiento con Cal14.2b, Cal14.2c y Cal14b pudiera deberse a que los péptidos están revirtiendo el efecto de la activación vía TCR-CD3/CD28 al inhibir canales K^+ o actuar como antagonistas en receptores nicotínicos, y por tanto afectar el incremento del Ca^{2+} intracelular, mientras que el efecto positivo de Cal14.1b en la proliferación celular pudiera deberse a que contribuye a las rápidas oscilaciones de calcio intracelular implicadas en la activación del factor de transcripción NFAT (Kotturi, Hunt, & Jefferies, 2006) vía los nAChRs.

Dado que todas las conotoxinas revirtieron el efecto de la activación de las células donde se encontró mayor expresión de Tbet que de GATA3, se les puede describir como agentes moduladores de la respuesta Th2. Uno de los mecanismos implicados podría ser el efecto antagónico sobre receptores nicotínicos dada su implicación en la polarización Th1 (Qian et al., 2011) o su unión prologada a dichos receptores que ocasiona la disminución de su expresión (Kawashima & Fujii, 2003). Aunado a lo anterior, se ha descrito que la

disminución de la expresión de nAChRs está asociada a la actividad linfocítica (Kawashima & Fujii, 2003), razón que explicaría el efecto visto de Cal14.2b, Cal14.2c y Cal14b en la elevada transcripción de GATA3 y el efecto negativo en la proliferación celular. Con respecto a Cal14.1b, es de observarse que es la toxina que presentó diferencias significativas en el índice de proliferación y en la expresión de GATA3 sobre Tbet; sin embargo, su efecto en la proliferación es contrario al de Cal14.2b, Cal14.2c, y Cal14b, pudiendo pensar que aunque causa el mismo efecto a nivel de factores de transcripción, su blanco molecular es distinto.

Se ha descrito a la diversidad de las conotoxinas para distinguir entre blancos moleculares similares. Sin embargo, dados los resultados obtenidos, se piensa que todas las conotoxinas actúan a través del mismo mecanismo. La secuencia de aminoácidos (información no mostrada) puede estar influyendo en el efecto, ya que toxinas como Cal14.2b y Cal14.2c mostraron efectos muy similares, e incluso aunque Cal14.2c muestre mayor identidad con Cal14c, el tratamiento de las células con ésta último no mostró efectos significativos en la proliferación y transcripción de genes. De resaltar es la presencia de lisina en Cal14.1b y Cal14b, residuo al cual se le ha adjudicado la capacidad de las conotoxinas de bloquear canales de K^+ (Möller et al., 2005; Peng et al., 2010), además de un residuo de glicina junto a la lisina, acomodo no observado en Cal14.1a, que a diferencia de Cal14.1b y Cal14b no mostró efecto significativo sobre los aspectos celulares y moleculares evaluados.

CONCLUSIONES

- Los resultados obtenidos muestran la capacidad de las conotoxinas Cal14.1a, Cal14.1b, Cal14c, Cal14.2b, Cal14.2c y Cal14b de *Conuscalifornicus* en polarizar la respuesta inmune en un cultivo primario de linfocitos T murinos hacia el subtipo Th2.
- La proliferación celular se vio favorecida por el tratamiento de los linfocitos murinos con Cal14.1b, efecto contrario causado por las conotoxinas Cal14.2b, Cal14.2c y Cal14b de *Conuscalifornicus*.
- Las conotoxinas lograron potenciar la expresión de IL-10 y alterar los niveles de expresión de IL-2 en linfocitos murinos, sin modificar significativamente la expresión de IL-4 e IFN- γ .
- Las conotoxinas aumentaron la expresión del factor de transcripción GATA3 implicado en la polarización de linfocitos Th2murino.

REFERENCIAS

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2010). *Cellular and Molecular Immunology* (6th ed.). Saunders Elsevier.
- American Autoimmune Related Diseases Association (AARDA) 2010. Autoimmunity: A Major Women's Health Issue. https://aarda.org/women_and_autoimmunity.php. Acceso: 23 de julio (2013).
- Arai, K., Lee, F., Miyajima, A., Miyatake, S., Arai, N., & Yokota, T. (1990). Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses. *Annual review of ...*, 59, 783–836. Retrieved from <http://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev.bi.59.070190.004031>
- Bagdány, M., Batista, C. V. F., Valdez-cruz, N. A., Somodi, S., Rodriguez de la Vega, R. C., Licea, A. F., ... Panyi, G. (2005). Anuroctoxin, a New Scorpion Toxin of the alfa-KTx 6 Subfamily, Is Highly Selective for Kv1.3 over IKCa1 Ion Channels of Human T Lymphocytes. *Molecular Pharmacology*, 67(4), 1034–1044.
- Borish, L. C., Nelson, H. S., Corren, J., Bensch, G., Busse, W. W., Whitmore, J. B., & Agosti, J. M. (2001). Efficacy of soluble IL-4 receptor for the treatment of adults with asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 107(6), 963–70. doi:10.1067/mai.2001.115624
- Cervantes Luévano, K. E. (2013). *Aislamiento y caracterización de péptidos inmunomoduladores presentes en el veneno de caracoles marinos del género Conus*. Universidad Autónoma de Baja California.
- Chandy, K. G., Wulff, H., Beeton, C., Pennington, M., Gutman, G. a, & Cahalan, M. D. (2004). K⁺ channels as targets for specific immunomodulation. *Trends in pharmacological sciences*, 25(5), 280–289. doi:10.1016/j.tips.2004.03.010
- Chi, V., Pennington, M. W., Norton, R. S., Tarcha, E. J., Londono, L. M., Sims-Fahey, B., ... Chandy, K. G. (2012). Development of a sea anemone toxin as an immunomodulator for therapy of autoimmune diseases. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 59(4), 529–46. doi:10.1016/j.toxicon.2011.07.016
- Coligan, J. E. (2001). *Current Protocols in Immunology*. (John E. Coligan, B. E. Bierer, D. H. Margulies, E. M. Shevach, & W. Strober, Eds.). Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. doi:10.1002/0471142735
- De Rosa, M. J., Esandi, M. D. C., Garelli, A., Rayes, D., & Bouzat, C. (2005). Relationship between alpha 7 nAChR and apoptosis in human lymphocytes. *Journal of neuroimmunology*, 160(1-2), 154–61. doi:10.1016/j.jneuroim.2004.11.010
- Elliger, C. a, Richmond, T. a, Lebaric, Z. N., Pierce, N. T., Sweedler, J. V., & Gilly, W. F. (2011). Diversity of conotoxin types from *Conus californicus* reflects a diversity of prey types and a novel evolutionary history. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 57(2), 311–22. doi:10.1016/j.toxicon.2010.12.008
- Favreau, P., & Stöcklin, R. (2009). Marine snail venoms: use and trends in receptor and channel neuropharmacology. *Current opinion in pharmacology*, 9(5), 594–601. doi:10.1016/j.coph.2009.05.006

- Feldmann, M., Brennan, F. M., & Maini, R. N. (1996). Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annual review of immunology*, *14*, 397–440. doi:10.1146/annurev.immunol.14.1.397
- Fusetani, N., & Kem, W. (2009). *Marine Toxins as Research Tools*. (N. Fusetani & W. Kem, Eds.) (Vol. 46). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. doi:10.1007/978-3-540-87895-7
- Gilly, W. F., Richmond, T. a, Duda, T. F., Elliger, C., Lebaric, Z., Schulz, J., ... Sweedler, J. V. (2011). A diverse family of novel peptide toxins from an unusual cone snail, *Conus californicus*. *The Journal of experimental biology*, *214*(Pt 1), 147–61. doi:10.1242/jeb.046086
- Gordon, K. B., Langley, R. G., Gottlieb, A. B., Papp, K. a, Krueger, G. G., Strober, B. E., ... Valdes, J. M. (2012). A phase III, randomized, controlled trial of the fully human IL-12/23 mAb briakinumab in moderate-to-severe psoriasis. *The Journal of investigative dermatology*, *132*(2), 304–14. doi:10.1038/jid.2011.304
- Imperial, J. S., Bansal, P. S., Alewood, P. F., Daly, N. L., Craik, D. J., Sporning, A., ... Olivera, B. M. (2006). A novel conotoxin inhibitor of Kv1.6 channel and nAChR subtypes defines a new superfamily of conotoxins. *Biochemistry*, *45*(27), 8331–40. doi:10.1021/bi060263r
- Jiang, S., & Dong, C. (2013). A complex issue on CD4(+) T-cell subsets. *Immunological reviews*, *252*(1), 5–11. doi:10.1111/imr.12041
- Kawashima, K., & Fujii, T. (2003). The lymphocytic cholinergic system and its contribution to the regulation of immune activity. *Life Sciences*, *74*(6), 675–696. doi:10.1016/j.lfs.2003.09.037
- Kawashima, K., Fujii, T., Moriwaki, Y., & Misawa, H. (2012). Critical roles of acetylcholine and the muscarinic and nicotinic acetylcholine receptors in the regulation of immune function. *Life sciences*, *91*(21-22), 1027–32. doi:10.1016/j.lfs.2012.05.006
- Kotturi, M. F., Hunt, S. V., & Jefferies, W. a. (2006). Roles of CRAC and Cav-like channels in T cells: more than one gatekeeper? *Trends in pharmacological sciences*, *27*(7), 360–7. doi:10.1016/j.tips.2006.05.007
- Lazarevic, V., Glimcher, L. H., & Lord, G. M. (2013). T-bet: a bridge between innate and adaptive immunity. *Nature reviews. Immunology*, *13*(11), 777–89. doi:10.1038/nri3536
- Möller, C., Rahmankhah, S., Lauer-Fields, J., Bubis, J., Fields, G. B., & Marí, F. (2005). A novel conotoxin framework with a helix-loop-helix (Cs alpha/alpha) fold. *Biochemistry*, *44*(49), 15986–96. doi:10.1021/bi0511181
- Monteleone, I., Monteleone, G., Del Vecchio Blanco, G., Vavassori, P., Cucchiara, S., MacDonald, T. T., & Pallone, F. (2004). Regulation of the T helper cell type 1 transcription factor T-bet in coeliac disease mucosa. *Gut*, *53*(8), 1090–5. doi:10.1136/gut.2003.030551
- Mosmann, T. R., & Coffman, R. L. (1989). TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annual review of immunology*, *7*, 145–73. doi:10.1146/annurev.iy.07.040189.001045
- Natural History of Orange Country. California School of Biological Sciences. Fotograffa por Peter J. Bryant. University of California. Irvine. United States. <http://nathistoc.bio.uci.edu/Molluscs/Conus.htm>. Acceso: 27 de mayo (2013).

- Norton, R. S., & Olivera, B. M. (2006). Conotoxins down under. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 48(7), 780–98. doi:10.1016/j.toxicon.2006.07.022
- Panyi, G., Vámosi, G., Bodnár, A., Gáspár, R., & Damjanovich, S. (2004). Looking through ion channels: recharged concepts in T-cell signaling. *Trends in immunology*, 25(11), 565–9. doi:10.1016/j.it.2004.09.002
- Peng, C., Tang, S., Pi, C., Liu, J., Wang, F., Wang, L., ... Xu, A. (2006). Discovery of a novel class of conotoxin from *Conus litteratus*, It14a, with a unique cysteine pattern. *Peptides*, 27(9), 2174–81. doi:10.1016/j.peptides.2006.04.016
- Peng, C., Ye, M., Wang, Y., Shao, X., Yuan, D., Liu, J., ... Chi, C. (2010). A new subfamily of conotoxins belonging to the A-superfamily. *Peptides*, 31(11), 2009–16. doi:10.1016/j.peptides.2010.07.011
- Qian, J., Galitovskiy, V., Chernyavsky, I., Marchenko, S., & Grando, S. a. (2011). Plasticity of the murine spleen T-cell cholinergic receptors and their role in in vitro differentiation of naïve CD4 T cells toward the Th1, Th2 and Th17 lineages. *Genes and immunity*, 12(3), 222–30. doi:10.1038/gene.2010.72
- Reinisch, W., de Villiers, W., Bene, L., Simon, L., Rácz, I., Katz, S., ... Sands, B. E. (2010). Fontolizumab in moderate to severe Crohn's disease: a phase 2, randomized, double-blind, placebo-controlled, multiple-dose study. *Inflammatory bowel diseases*, 16(2), 233–42. doi:10.1002/ibd.21038
- Romagnani, S. (1991). RE s d-I, 152–158.
- Ryan, M., McCarthy, L., Rappuoli, R., Mahon, B. P., & Mills, K. H. (1998). Pertussis toxin potentiates Th1 and Th2 responses to co-injected antigen: adjuvant action is associated with enhanced regulatory cytokine production and expression of the co-stimulatory molecules B7-1, B7-2 and CD28. *International immunology*, 10(5), 651–62. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9645613>
- Sandborn, W. J., Feagan, B. G., Fedorak, R. N., Scherl, E., Fleisher, M. R., Katz, S., ... Rutgeerts, P. (2008). A randomized trial of Ustekinumab, a human interleukin-12/23 monoclonal antibody, in patients with moderate-to-severe Crohn's disease. *Gastroenterology*, 135(4), 1130–41. doi:10.1053/j.gastro.2008.07.014
- Saraiva, M., & O'Garra, A. (2010). The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nature reviews. Immunology*, 10(3), 170–81. doi:10.1038/nri2711
- Spelman, K., Burns, J. J., Nichols, D., Winters, N., Ottersberg, S., & Tenborg, M. (2006). Modulation of Cytokine Expression by Traditional Medicines : A Review of Herbal Immunomodulators Cytokines / Herbs. *Alternative Medicine Review*, 11(2), 128–150.
- Sun, D., Ren, Z., Zeng, X., You, Y., Pan, W., Zhou, M., ... Xu, A. (2011). Structure-function relationship of conotoxin It14a, a potential analgesic with low cytotoxicity. *Peptides*, 32(2), 300–5. doi:10.1016/j.peptides.2010.11.012
- Tangye, S. G., Ma, C. S., Brink, R., & Deenick, E. K. (2013). The good, the bad and the ugly - TFH cells in human health and disease. *Nature reviews. Immunology*, 13(6), 412–26. doi:10.1038/nri3447
- Terlau, H., & 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

- Tzianabos, A. O. (2000). Polysaccharide Immunomodulators as Therapeutic Agents : Structural Aspects and Biologic Function. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(4), 523–533. doi:10.1128/CMR.13.4.523-533.2000.
- Wilson, C. B., Rowell, E., & Sekimata, M. (2009). Epigenetic control of T-helper-cell differentiation. *Nature reviews. Immunology*, 9(2), 91–105. doi:10.1038/nri2487
- Zhu, J., & Paul, W. E. (2010). Heterogeneity and plasticity of T helper cells. *Cell research*, 20(1), 4–12. doi:10.1038/cr.2009.138