

Universidad Autónoma de Baja California
Facultad de ciencias Marinas
Instituto de Investigaciones Oceanológicas
Posgrado en Ecología Molecular y Biotecnología



**Aislamiento y caracterización de péptidos
inmunomoduladores presentes en el veneno de
caracoles marinos del género *Conus*.**

T E S I S

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

Presenta

Karla Evelia Cervantes Luévano

Director de tesis

Dr. Alexei F. Licea Navarro

Ensenada, B.C., agosto del 2013

Facultad de ciencias Marinas
Instituto de Investigaciones Oceanológicas
Posgrado en Ecología Molecular y Biotecnología



**Aislamiento y caracterización de péptidos
inmunomoduladores presentes en el veneno de
caracoles marinos del género *Conus*.**

TESIS


Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

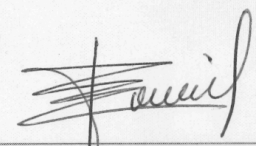
Presenta

Karla Evelia Cervantes Luévano

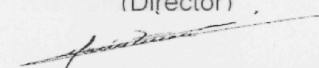
Aprobada por:



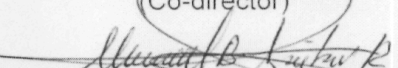
Dr. Alexei F. Licea Navarro
(Director)



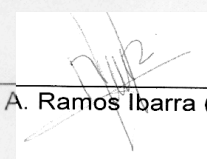
Dra. Irma E. Soria Mercado
(Co-director)



Dra. Ma. Teresa Viana Castellón
(Sinodal)



Dr. Manuel B. Aguilar Ramírez
(Sinodal)



Dr. Marco A. Ramos Ibarra (sinodal)

	Índice
RESUMEN	6
INTRODUCCIÓN	7
ANTECEDENTES	7
Polarización Th1/Th2 y M1/M2	8
Modulación del sistema inmune: canales iónicos dependientes de voltaje, acoplados a ligando, activados por depósito y de neurotransmisores.	9
<u>Señales moduladas por calcio. Canales de Ca²⁺ dependientes de depósito y canales de K⁺ dependientes de voltaje</u>	9
<u>Canales activados por ligando</u>	11
Género <i>Conus</i>	14
Toxinas de <i>Conus</i> antagonistas de canales iónicos de potasio, canales iónicos de calcio y receptores de acetilcolina	17
JUSTIFICACIÓN	18
OBJETIVOS	19
METODOLOGÍA	19
<i>Ensayo en línea celular</i>	20
• Evaluación de subfracciones de veneno total y péptidos sintéticos activos en canales de Ca ²⁺ .	20
• <i>Evaluación de toxinas con actividad en receptores nicotínicos</i>	21
• <i>Extracción de ARN total</i>	21
• <i>Tratamiento con DNasa I y retrotranscripción</i>	21
<i>PCR punto final y PCR tiempo real: validación de oligonucleótidos y condiciones de reacción</i>	22
<i>Análisis de resultados en PCR tiempo real</i>	23
<i>Purificación y repurificación de subfracciones con actividad antagónica competitiva en el análogo del receptor nicotínico (AChBP).</i>	23
RESULTADOS	25
<i>Conus californicus</i>	25
• <i>Péptidos sintéticos con actividad en canales de calcio.</i>	25
Selección, purificación y ensayo de subfracciones de veneno total con actividad en modelo de proteína de unión a acetilcolina (Ac-AChBP)	28
Efecto de antagonistas nicotínicos de <i>C. californicus</i> en la transcripción de genes de citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias	34
<i>Conus ximenes</i>	38
Efecto sobre la activación de macrófagos de α -conotoxinas de <i>Conus ximenes</i> con actividad antitúmica.	38
ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	42
CONCLUSIONES	52
REFERENCIAS	53

AGRADECIMIENTOS

Al CONACyT por la beca otorgada.

Al Dr. Alexei Licea, por haberme aceptado en su grupo de trabajo y por la confianza depositada en mí para realizar este tema. Por todas sus enseñanzas y el empuje que ha dado a mi formación.

A mis sinodales, la Dra. Tere Viana, Dr. Manuel Aguilar, Dra. Irma Soria y Dra. Iris Estrada. Por su apoyo y guía a lo largo de este gran proceso, y al Dr. Marco Ibarra por su ayuda a pesar de la premura de la situación.

A la secretaria de posgrado Angélica por ser una gran ayuda siempre.

A la Dra. Ivonne Giffard por su interés en mi formación y proceso.

Al M. en C. Eduardo Morales por su apoyo en la purificación por HPLC.

A mis compañeros del lab por todos los buenos momentos y por todo su apoyo en todo, por siempre tener una sonrisa o palabra de aliento: Félix, Irasema, Andrea F., Hannah, Samanta, Jairo, Oscar, Carmen y Nacho, Mayra, Mimi, Edna, Ricardo, Abraham, Tanya, Pavel, y todos los que me falten por mencionar.

A la manzana (Sam), Andrea y Hannah por ser mi apoyo, amigas, confidentes, psicólogas, etc. Muchas gracias!

A mis vecinas Rita y Tzitzlali (Heriberto y Diego por default) por ser excelentes vecinas y un gran apoyo siempre.

A Coco (qepd) por ser el primer motor que me dio apoyo en esto. Te extraño.

A lolo y ronrona, por que con esos ojos me hacen sentir feliz.

A mi esposo Ramón, que siempre ha sido mucho más que una pareja, ha sido un compañero, cómplice, amigo, soporte y empuje. Te amo.

A mi familia (papás y hermanas) por que desde lejos siempre estan conmigo. Los amo.

A Dios, por iluminarme y dejarme comprender un poquito de su creación.

DEDICATORIA

A mi familia (esposo, padres y hermanas), por ustedes tuve fuerza y voluntad para terminar y continuar.

RESUMEN

Los macrófagos son células fagocíticas presentes en todos los tejidos. Tienen un papel importante en casi todos los aspectos biológicos de un organismo, desde el desarrollo, la homeostasis y reparación de tejidos; hasta la respuesta inmune frente a patógenos. Su activación y diferenciación hacia un subtipo pro-inflamatorio (M1) o anti-inflamatorio (M2), es un paso esencial en la resistencia frente a patógenos, al daño tisular y cáncer.

Existe una gran cantidad de evidencia que demuestra que la actividad de canales iónicos y receptores de neurotransmisores, es capaz de controlar la respuesta de activación en macrófagos, siendo el papel de los receptores nicotínicos el más preponderante. Por lo anterior, hay un gran interés en el desarrollo y descubrimiento de moléculas que agonicen o antagonicen a éstos, logrando así controlar la respuesta inmune.

En el presente trabajo, se demuestra que conotoxinas antagonistas de canales de calcio o receptores nicotínicos, procedentes del veneno de los caracoles marinos *Conus californicus* y *Conus ximenes*, pueden sinergizar o reducir la respuesta inflamatoria generada por el lipopolisacárido a nivel de transcripción génica, a la vez que son capaces de revertir el efecto anti-inflamatorio dado por el agonista nicotina. Estos efectos, son exclusivos para cada secuencia y se verán afectados por factores que alteren o modifiquen la afinidad de la toxina por su blanco molecular, como son: modificaciones post-traduccionales (amidación C-terminal), sustitución de aminoácidos (cambios conservadores de carga o cambios no conservadores) y el tipo de enlace entre cisteínas. Estos hallazgos, permitirán emplear a estas toxinas como agentes de tratamiento y/o auxiliares en el estudio de patologías del sistema inmunitario.

Dr. Alexei F. Licea Navarro (Director)

Dra. Irma E Soria Mercado (Co-director)

Dra. Ma. Teresa Viana Castellón (Sinodal)

Dr. Marco A. Ibarra Ramos (Sinodal)

Dr. Manuel Aguilar Ramírez (Sinodal)

INTRODUCCIÓN

ANTECEDENTES

El sistema inmune de mamíferos, está conformado por células y moléculas responsables de la acción coordinada y colectiva en contra de agentes invasores y de la eliminación de células apoptóticas o dañadas. La defensa en contra de organismos patógenos está mediada en la fase temprana por la acción de la inmunidad innata (compuesta células fagocíticas), y en la fase tardía por la inmunidad adaptativa (compuesta por células con capacidad de memoria y especificidad). La comunicación entre ambos subtipos celulares permitirá al organismo enfrentar la amenaza del patógeno sin afectarse a sí mismo (Abbas et al. 2010).

Papel de los macrófagos y linfocitos T en la inmunidad.

Los macrófagos y linfocitos T juegan un papel preponderante en el desarrollo de la inmunidad adaptativa. La interacción entre ambos mediante contacto célula-célula y las interacciones mediadas por citocinas permiten coordinar la evolución de las respuestas de inflamación y establecer la inmunidad adquirida a un patógeno específico (Tiwari et al. 2008). Los macrófagos actúan como células de la inmunidad innata, identifican y atrapan al patógeno invasor para posteriormente presentarlo al linfocito T. Los linfocitos T, por su parte son los mediadores centrales en el inicio y regulación de la inmunidad adaptativa a un antígeno (propio o extraño). Los linfocitos T vírgenes, requieren más de una señal para su activación completa; la primera, es una señal antígeno específica provista por el receptor de células T (TCR) al interactuar con el complejo mayor de histocompatibilidad de una célula presentadora de antígeno (APC), como el

macrófago. La segunda señal, es la provista por la interacción de receptores específicos en la célula T y sus ligandos en la APC. Una vez que se han efectuado estas dos señales, diferentes rutas puede ser activadas, entre ellas la ruta del calcio-calcineurina, ruta RAS-mitógeno proteína-cinasa activada (RAS-MAPK) y la ruta del factor nuclear κ B (NF- κ B) (Vicente y Luggen, 2007; Abbas et al. 2010).

Polarización Th1/Th2 y M1/M2

Durante la activación mediada por TCR en un ambiente particular de citocinas, los linfocitos T vírgenes pueden diferenciarse en diferentes linajes de células T ayudadoras (Th), que incluyen Th1, Th2, Th17 y iTreg, diferenciadas entre sí por el patrón de citocinas producidas y por su función en el organismo (Zhu et al. 2010). De igual manera, los macrófagos pueden diferenciarse en M1 (productores de IL-12) y M2 (mayormente productores de IL-10) (Mosser, 2003). En el contexto de eliminación de patógenos, la activación por vía clásica de macrófagos (M1) y la diferenciación de linfocitos T vírgenes a células Th1 permite orquestar las respuestas necesarias para la eliminación del invasor. Un exceso en la producción de mediadores pro-inflamatorios puede conllevar al daño tisular, mientras que una estimulación insuficiente permite la prevalencia y avance de la enfermedad. El balance adecuado entre respuestas tipo Th1 y Th2, con el consecuente efecto en la diferenciación de macrófagos es necesario para erradicar eficientemente al agente infeccioso. Ya que los macrófagos están involucrados tanto en la respuesta inmune innata como en la adaptativa, son un principal objetivo farmacológico en el desarrollo de terapias inmunomoduladoras.

Modulación del sistema inmune: canales iónicos dependientes de voltaje, acoplados a ligando, activados por depósito y de neurotransmisores.

Señales moduladas por calcio. Canales de Ca^{2+} dependientes de depósito y canales de K^+ dependientes de voltaje

La actividad del calcio como segundo mensajero ha sido descrita en diversos tipos celulares, incluidas células del sistema inmune. La unión del complejo TCR/CD3 con el péptido inmunogénico unido a una molécula de MHC y el reconocimiento de moléculas asociadas a patógenos (PAMP's) en la membrana del linfocito y macrófago respectivamente, generan alteraciones en la concentración intracelular de iones Ca^{2+} . La elevación en el Ca^{2+} citosólico libre es requerida para mantener la transducción de señales durante la cascada de activación de genes necesarios para la actividad efectora y proliferación celular. Para mantener el incremento en la entrada de Ca^{2+} y evitar la despolarización de membrana se requiere de la acción conjunta de canales iónicos de Ca^{2+} y K^+ (Chandy, 2001; Varga y Gáspár, 2006). El reconocimiento de patógenos o PAMP's genera alteraciones en el Ca^{2+} intracelular causando una alteración en factores de transcripción que conllevan a cambios en la expresión de genes, diferenciación celular y estabilidad del ARNm, afectando el perfil de genes pro-inflamatorios expresados y de enzimas participantes en el proceso de eliminación de patógenos (Dolmetsch et al. 1998; Azenabor et al. 2009; Zhu et al. 2011; Ye et al. 2012).

Las células del sistema inmune expresan en su membrana canales de K^+ voltaje dependientes (Kv), canales de K^+ activados por Ca^{2+} (IKCa), canales Ca^{2+} activados por liberación de Ca^{2+} (CRAC ó SOCE por sus siglas en inglés), y otros como canales de Ca^{2+} tipo L activados por voltaje y canales de Cl^- que

han sido sugeridos. La actividad de estos canales ha sido descrita en la regulación de la activación de células, proliferación, regulación de volumen celular y apoptosis. Los canales tipo CRAC son esenciales en la activación de linfocitos T, macrófagos, células dendríticas, mastocitos y otras células hematopoyéticas. Al ser el principal recurso para la entrada de Ca^{2+} al interior de la célula; esta entrada de Ca^{2+} es sostenida por la acción conjunta de canales de K voltaje dependiente como los Kv1.3 y los IKCa. Lo anterior concuerda con estudios en los que el bloqueo selectivo de canales de Kv1.3, IKCa²⁺ y tipo CRAC en linfocitos inhibe la activación de éstos al entrar en contacto con el antígeno (Krasznai, 2005; Chandy et al. 2004; Bagdáany et al. 2005; Wulff et al. 2004). Los canales de potasio Kv1.3 se encuentran cercanos a la ubicación del receptor CD3 en células T; estos canales son reclutados en la sinapsis inmunológica del complejo de señalización formado entre células citotóxicas y células blanco. Se ha sugerido, que esta vecindad entre los canales Kv1.3 y las cinasas proteicas en el complejo de señalización podría permitir una regulación recíproca de estas proteínas, y por lo tanto, modular la eficacia del proceso de reconocimiento del antígeno (Krasznai, 2005).

En macrófagos, los canales de Kv están implicados en la migración, proliferación, activación y producción de citocinas. Estudios realizados por Vicente et al. 2003, demuestran que mediante el bloqueo de canales de K⁺ dependientes de voltaje en macrófagos, se inhibe la expresión de la sintetasa de óxido nítrico, así como la proliferación, activación, crecimiento celular y se modula la respuesta específica de la célula. Asimismo, bloqueadores de canales de Ca^{2+} son efectivos como moduladores de citocinas pro-

inflamatorias, producción de óxido nítrico (NO) y estrés oxidativo en modelos de inflamación *in-vitro* e *in-vivo* (Wright et al. 1985; Szabó et al. 1997; Matsumori et al. 2010; Liu et al. 2011).

Receptores de neurotransmisores involucrados en la activación del macrófago

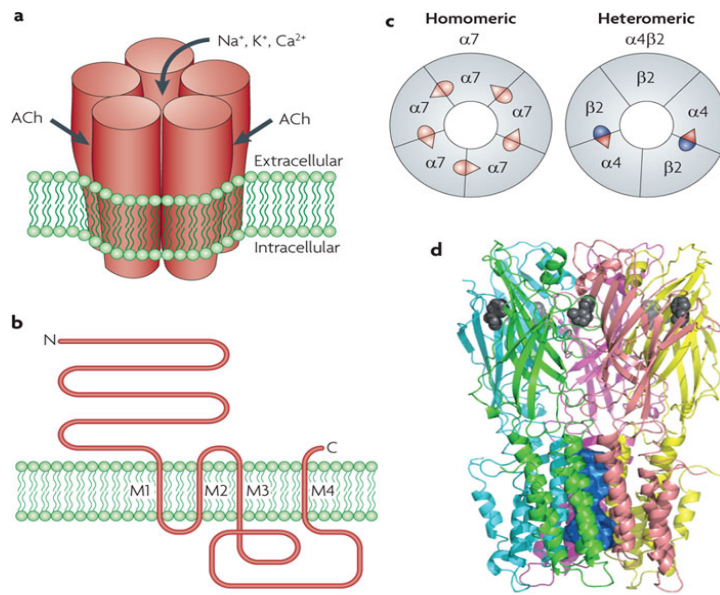
La producción de neurotransmisores inhibitorios es necesaria para que se produzca un control en la producción de citocinas pro-inflamatorias. Mientras que estos neurotransmisores controlan la activación del macrófago y su capacidad para fagocitar, las citocinas generan en las neuronas una modulación en la interacción en las respuestas a estrés del eje hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales. Hasta la fecha se ha descrito la presencia de receptores de histamina, neuropéptidos, adenosina, endocannabinoides, catecolaminas, GABA, nicotínicos, glicina y serotonina; todos con capacidad de inhibir o potenciar la activación y producción de citocinas pro-inflamatorias (Reyes-García y Tamayo, 2009).

Canales activados por ligando

Los canales iónicos activados por ligando, son una superfamilia compuesta de receptores transmembranales pentaméricos que modulan la transmisión de señales rápidas en el sistema nervioso central. Éstos incluyen al receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR), receptor de serotonina tipo 3 (5-HT₃), receptor de glicina (GlyR) y receptores de ácido γ -aminobutírico tipo A y C (GABA_{A/C}); históricamente son más conocidos como receptores “cys-loop” por la presencia de un enlace disulfuro en el dominio extracelular (Miller y Smart, 2009). La presencia y función de nAChR, GABA_A, y GlyR ha sido descrita en células del sistema inmune; particularmente en macrófagos se ha observado

que el uso de agonistas nicotínicos y el GABA disminuye la producción de citocinas pro-inflamatorias (Wang et al. 2003; Reyes-García et al. 2007). El papel de GlyR como regulador de la respuesta inflamatoria en macrófagos aún no ha sido elucidado (Webb y Lynch, 2007), aunque se ha reportado que la glicina es capaz de inducir la producción de citocinas pro-inflamatorias y está involucrada en el desarrollo y progresión de enfermedades autoinmunes; su acción parece estar mediada por transportadores de aminoácidos y no por el GlyR (Carmans et al. 2010).

El papel de los receptores nicotínicos en la modulación de la respuesta inflamatoria ha sido más ampliamente descrito en la literatura. Además de macrófagos, los linfocitos T y B, las células dendríticas, mastocitos, neutrófilos y células asesinas naturales que expresan en su membrana receptores nicotínicos de tipo neuronal (Ulloa y Jonge, 2007). Éstos están compuestos de 5 subunidades que pueden ser idénticas (homopentámeros) o diferentes (heteropentámeros); cada subunidad está formada de un dominio amino terminal extracelular; cuatro dominios transmembranales, un asa intracelular y un dominio extracelular COOH terminal (ver Figura 1). Se conocen 17 tipos de subunidades en vertebrados, $\alpha 1$ - $\alpha 10$, $\beta 1$ - $\beta 4$, γ , δ y ϵ ; de las cuales las subunidades $\alpha 2$ - $\alpha 10$ y $\beta 2$ - $\beta 4$ son de tipo neuronal y el resto están exclusivamente en músculo (Albuquerque et al. 2009; Yan y Li, 2010; Pucci et al. 2011).



Nature Reviews | Neuroscience

Figura 1: Estructura del receptor nicotínico de acetilcolina. a) esquema general del receptor con 5 subunidades; b) dominios extracelular, transmembranales y citoplasmático de cada subunidad; c) organización general de un receptor homopentámero y heteropentámero, d) vista lateral del modelo de receptor $\alpha 7$ unido al agonista nicotina (perlas grises). Modificado de Changeux (2010).

De los receptores de neurotransmisores descritos en macrófagos, los nAChR son los mayormente involucrados en la modulación de la activación, proliferación, crecimiento y presentación de antígeno. Particularmente, se ha referido al nAChR homopentámero $\alpha 7$ como el principal involucrado en la inhibición de la liberación del TNF- α en macrófagos al ser estimulado por la liberación de acetilcolina del nervio vago (Wang et al. 2003; Zanden et al. 2009). Múltiples estudios demuestran que el uso de agonistas como la nicotina logra controlar la producción de citocinas pro-inflamatorias en macrófagos activados con LPS, tanto *in vitro* (Pavlov et al. 2003; Tsetlin y Hucho, 2004; Ulloa, 2006; Yan y Li, 2010), como *in vivo* (Li et al. 2011).

Género *Conus*

El género *Conus* (suborden: *Toxoglossa*) comprende aproximadamente 700 especies. Estos moluscos contienen una potente mezcla de aproximadamente 200 péptidos biológicamente activos, utilizados como estrategia de defensa y caza (Livett, et al. 2004; Becker y Terlau, 2008; Wang y Chi, 2004; Olivera, 2006). Estos péptidos son inicialmente sintetizados como proteínas precursoras que eventualmente se transforman en una toxina madura a lo largo del ducto venenoso (Figura 2) gracias a un complejo multienzimático que genera modificaciones post-traduccionales necesarias para su completa actividad y estructura (Safavi-Hemani et al. 2012). La toxina madura se caracteriza por tener propiedades como: una elevada especificidad, potencia, estabilidad y estructura pequeña. Se estima que se han caracterizado < 0.1% del total de péptidos del veneno de *Conus*, mismos de los que se ha reportado la acción sobre diversos receptores celulares y canales iónicos, siendo estos objeto de la mayoría de los estudios realizados en la actualidad (Wang y Chi, 2004; Lewis y García, 2003; Olivera y Teichert, 2007; McIntosh, et al. 2005). Aquellos péptidos caracterizados han sido catalogados en superfamilias (A, M, O, P, S, T, I, J, C, V, Y, B, K, L, conopresinas, conantocinas, conotrifanos y contulacinas) de acuerdo a su secuencia señal y pro-péptido, y son subdivididos en familias (Figura 3) de acuerdo a su blanco farmacológico (Wang y Chi, 2004; Kaas et al. 2012).

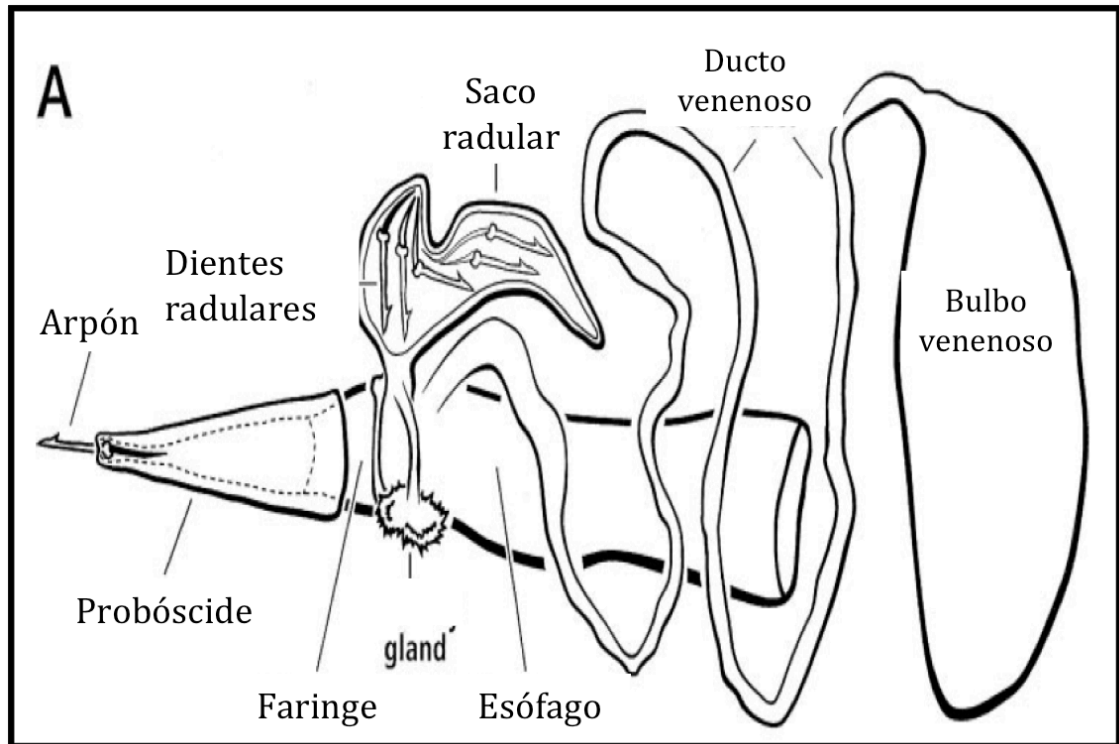


Figura 2: El aparato venenoso de estas especies consta en general de un bulbo que se piensa sirve para propulsar el veneno, seguido de un ducto que es el lugar de síntesis del veneno, el cual después entra a la faringe hacia el saco radular que contiene los dientes que serán luego cargados de veneno en la faringe generando el arpón venenoso (estructura similar a una aguja hipodérmica) a través del cual será inyectado el veneno. Modificado de Olivera, 2008.

Pocos enlaces disulfuro					
	Sin enlace disulfuro			Un enlace disulfuro	
Familia	contulacinas	conantocinas	conorfamida	conopresina	conotrifano
Blanco	Receptor neurotensina	Receptor NMDA	Receptor RFamida	Receptor vasopresina	Canal de calcio tipo L

Ricos en disulfuros

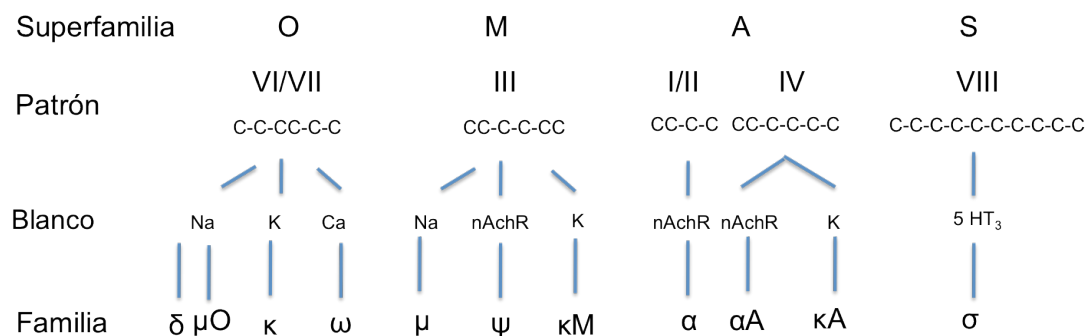


Figura 3: Clasificación general de conotoxinas. Modificado de Norton y Olivera, 2006.

Los efectos biológicos obtenidos a partir del veneno de una especie de *Conus* en particular están en función del blanco fisiológico al cual son afines las conotoxinas incluidas en dicho veneno. Aunque se ha postulado el uso de los hábitos alimenticios de las especies de *Conus* como herramienta de predicción de las conotoxinas que pueden ser encontradas en dicho veneno, se ha observado que especies estrechamente relacionadas poseen componentes diversos una de otra, por lo que la caracterización y purificación del veneno de una especie en particular es de suma importancia en la obtención de nuevos agentes farmacológicos (Grant et al. 2004; Olivera, 2006).

Toxinas de *Conus* antagonistas de canales iónicos de potasio, canales iónicos de calcio y receptores de acetilcolina

Hasta la fecha se han reportado 8 péptidos procedentes de especies de *Conus* con especificidad hacia canales de K^+ voltaje dependiente: Conkunitzina S1 (ConK-S1) de *Conus striatus* que bloquea canales de K tipo shaker (Bayrhuber et al. 2005); κ M-conotoxina RIIIK (KM-RIIIK) de *Conus radialus* que bloquea canales tipo shaker y Kv1.2, (Ferber et al. 2004); κ A-SIVA de *Conus striatus* en canales de K^+ en músculo de rana (Kelley et al. 2006); κ -PVIIA de *Conus purpurascens* que bloquea canales de K^+ tipo shaker (Naranjo, 2002); κ -Btx de *Conus betulinus* que sobremodula canales de Ca^{2+} y maxi K sensibles (Fan et al. 2003); ViTx de *Conus virgo* que bloquea canales Kv1.1 y Kv1.3 (Kaufenstein et al. 2003); κ -SrXIA de *Conus spurius* que inhibe Kv1.2 y Kv1.6 (Aguilar, et al. 2010); y el primer péptido reportado con acción sobre un canal iónico y receptor activado por ligando, perteneciente a la superfamilia J: la toxina pl14a de *Conus planorbis* que tiene actividad sobre Kv1.6 y nAChR $\alpha 3\beta 4$ (Imperial, et al. 2006).

En contraste, existen gran cantidad de péptidos con actividad sobre canales de Ca^{2+} (ω -conotoxinas), y sobre nAChR homopentámeros y/o heteropentámeros (α -conotoxinas). Estas últimas, pueden funcionar como antagonistas competitivos o no competitivos (Loughnan et al. 2009), y son la familia de toxinas más ampliamente distribuida a lo largo de las especies de *Conus* descritas hasta ahora en diferentes superfamilias (A, M, S, C, D, L y J) y con diversos patrones de cisteínas, siendo las α -conotoxinas pertenecientes a la superfamilia A y con el patrón #I las mejor estudiadas hasta ahora (Jiménez, 2013). Dentro de las α -conotoxinas caracterizadas hasta la fecha sobre el

receptor nicotínico $\alpha 7$, los péptidos Iml e Imll procedentes de *Conus imperialis* son los antagonistas más selectivos, aunque se han descrito otras procedentes de *Conus pennaceus* (PnlB), *Conus arenatus* (ArlA y ArlB), *Conus episcopatus* (Epl), *Conus anemone* (AnlB), *Conus omaria* (OmlA) y *Conus geographus* (GiD) con actividad en este receptor (Azam y McIntosh, 2009).

JUSTIFICACIÓN

Los macrófagos son células ampliamente distribuidas en la matriz extracelular de diversos órganos, donde participan en la inducción y conservación de la inmunidad a través de respuestas innatas y adquiridas, además de que constituyen un elemento de comunicación bidireccional entre el sistema inmune y el sistema nervioso central. Por lo anterior, existe un interés creciente en el desarrollo y descubrimiento de nuevas moléculas con capacidad para modular la respuesta de activación en macrófagos, y que a su vez puedan ser empleadas como tratamiento en patologías autoinmunes.

En este sentido, el uso de péptidos de *Conus* con actividad conocida en receptores nicotínicos o canales iónicos, no ha sido explorado en el campo de inmunomodulación, a pesar de que existe un enorme potencial de estas moléculas como agentes de estudio y/o terapéuticos. Es así que se plantea en el presente trabajo evaluar el efecto de diferentes péptidos de *Conus* en la activación del macrófago cuando este es expuesto a un estímulo pro-inflamatorio (LPS), anti-inflamatorio (nicotina) o ambos, permitiendo así medir la respuesta de activación celular a través de los genes expresados para diferentes citocinas pro- y anti-inflamatorias.

HIPÓTESIS

Las toxinas de caracoles del género *Conus* son capaces de modular a nivel de transcripción celular, la activación de macrófagos expuestos a un estímulo pro-inflamatorio.

OBJETIVOS

1. Aislar péptidos activos en receptores nicotínicos a partir de subfracciones con actividad antagonica sobre el análogo del receptor de acetilcolina (*Ac-AChBP*).
2. Caracterizar biológicamente el efecto de péptidos antagonistas del receptor nicotínico de acetilcolina, empleando ensayos de modulación de la activación de macrófagos *in vitro*.
3. Caracterizar biológicamente el efecto de péptidos sintéticos antagonistas de canales de calcio en la modulación de la activación de macrófagos *in vitro*.
4. Caracterizar bioquímicamente el/los péptidos aislados.

METODOLOGÍA

Cultivo estándar de línea celular tipo macrófago J774A.1 y criopreservación.

La línea celular tipo macrófago J774A.1 fue mantenida en medio RPMI-1640 suplementado con 10% suero fetal bovino inactivado (SFB) y 1% antibiótico – antimicótico (RPMI-c), en atmósfera de 5% CO₂ y una temperatura de 37 °C. La expansión de la monocapa adherente se realizó al alcanzar el 80% de

confluencia mediante el pipeteo vigoroso y/o raspado de la monocapa. Para el almacenamiento de la línea celular se desprendió la monocapa y se centrifugó en medio RPMI-c a 4000 rpm x 6 min., posteriormente se eliminó el sobrenadante y se agregó SFB-5% DMSO disgregando el paquete celular para almacenar después en viales a – 80°C.

Ensayo en línea celular

- Evaluación de subfracciones de veneno total y péptidos sintéticos activos en canales de Ca^{2+} .

Para ver el efecto de las toxinas de *Conus* en la respuesta inflamatoria generada por la exposición a LPS, se sembró un total de 1×10^6 células por pozo en placa de 24 pozos. Para ello, luego de desprender la monocapa y ajustar la densidad celular, se mantuvo a las células en medio no nutritivo RPMI-s (RPMI 1640, 5% SFB y 1% antibiótico/antimicótico).

Posteriormente se retiró el medio y se realizaron 2 lavados con PBS 1X (templado) para retirar células no adheridas, agregando medio RPMI-c suplementado con la concentración de subfracción o toxina a evaluar 5 minutos previos a la adición de $1\mu\text{g/mL}$ de lipopolisacárido (LPS), cada condición se evaluó por duplicado. Las células expuestas a cada tratamiento se mantuvieron en atmósfera 5% CO_2 a 37 °C por 12 h. Terminado el tiempo de exposición, se retiró el medio de cultivo y se realizaron 2 lavados con PBS 1X a 37°C. La lisis celular y extracción de ARN total se realizó mediante la adición de 500 μL de reactivo Tri (Sigma). Este homogenizado se almacenó en un tubo de 1.5 mL estéril a -80°C hasta su procesamiento.

- Evaluación de toxinas con actividad en receptores nicotínicos

Para evaluar el efecto inmunomodulador de α -conotoxinas sobre macrófagos, se procedió con las mismas condiciones de cultivo que en el apartado anterior, pero agregando una concentración 100 μ M de nicotina al medio de cultivo a los 5 min posteriores a la adición de toxina sintética y 5 min. previos a la adición de 1 μ g/mL de LPS.

- Extracción de ARN total

La extracción de ARN total se realizó de acuerdo a las especificaciones del fabricante (Tri Sigma), utilizando 1-bromocloropropano. La pastilla de ácidos nucleicos resultante se resuspendió en H₂O-0.1%DEPC, para posteriormente almacenarlo a -80 °C hasta su retrotranscripción. Se cuantificó el material y se verificó ausencia de proteínas por espectrofotometría UV (A_{260} , $A_{260/280}$). La integridad se evaluó por la técnica de gel desnaturalizante de agarosa y formamida (Masek et al. 2005).

- Tratamiento con DNasa I y retrotranscripción

Se realizó el tratamiento con el reactivo DNase I (Invitrogen) de 1 μ g de ARN total de acuerdo a las especificaciones del fabricante. De este material se procedió a realizar la retrotranscripción de 500 ng de ARN, empleando oligonucleótido dT₂₀ con el kit superscript III (Invitrogen). Se empleó un ciclo de 50°C como temperatura de reacción.

PCR punto final y PCR tiempo real: validación de oligonucleótidos y condiciones de reacción

En una primera instancia se comenzó a trabajar con la secuencia de oligonucleótidos para el gen endógeno GAPDH; sin embargo en una primera evaluación de la eficiencia de este gen, se demostró que su expresión no era constante en los tratamientos. De acuerdo a la literatura, GAPDH y β -actina son genes cuya expresión varía con el tiempo de incubación y la presencia de suero en el medio de cultivo (Schmittgen y Zakrajsek, 2000; Bass et al. 2004), por lo que a pesar de su amplio uso como genes constitutivos, son poco precisos como referencia interna. De esta forma, y debido a que en nuestros ensayos parte de la estrategia de normalización se hace en base al ARN total, se emplearon oligonucleótidos específicos para la secuencia de la subunidad ribosomal 18S. Para obtener resultados confiables en la cuantificación relativa de ARN mensajero, se procedió a validar las secuencias para gen endógeno y genes de interés de acuerdo a la guía de cuantificación relativa de expresión génica, del proveedor Applied Biosystems. Brevemente: un total de 5 μ g de ARN total extraído a partir de un control positivo (células expuestas a 1 μ g/mL de LPS), se convirtió a ADNc utilizando oligo dT₂₀ (superscript III Invitrogen) como se describió en el apartado anterior. Una serie de diluciones de 100, 50, 25, 10, 5 y 1 ng se utilizaron para realizar la curva de validación de cada par de oligonucleótidos (tabla 1). Las condiciones de reacción fueron iguales a las utilizadas en los ensayos con toxinas: 95°C x 10 min (hot-start), y 40 ciclos de 95°C x 1 min. y 60°C x 30 seg. y 72 °C x 1 min., empleando 5 μ L de Sybrgreen

master mix (Applied Biosystems), 0.2 μ M de cada oligo, y 4 μ L de ADNc ajustado a la concentración de análisis.

Tabla 1: Secuencias de oligonucleótidos para RT-PCR y clave de acceso a base de datos de genes (GenBank database)

Gen	Secuencia de oligonucleótidos	GenBank
18S	F: GTAACCCGTTGAACCCATT R: CCATCCAATCGGTAGTAGCG	NR_003278
INOS	F: CAGCTCCACAAGCTGGCTCG R: CAGGATGTCCTGAACGTAGACCTTG	NM_010927
TNF- α	F: TCTCATGCACCACCATCAAGGACT R: ACCACTCTCCCTTTGCAGAACTCA	M 13049.1
IL-1 β	F: ATGGCAACTGTTCCCTGAACTCAACT R: CAGGACAGGTATAGATTCTTTCTTT	NM_008361
IL-12p40	F: CAGAAGCTAACCATCTCCTGGTTTG R: CCGGAGTAATTTGGTGCTCCACAC	NM_00352
IL-10	F: ATGCAGGACTTTAAGGGTACTTGGGTT R: ATTTCCGGAGAGAGGTACAAACGAGGTTT	NM_010548.2

Análisis de resultados en PCR tiempo real

Para realizar la comparación entre tratamientos se siguió el protocolo de la guía para la expresión relativa de Applied Biosystems. Brevemente: se convirtió el valor de Ct obtenido para cada gen a cantidad relativa de ADNc, empleando la eficiencia de amplificación obtenida mediante la curva de validación de cada par de oligonucleótidos (EAMP). El gen 18S fue empleado como el control de expresión constitutivo.

Purificación y repurificación de subfracciones con actividad antagónica competitiva en el análogo del receptor nicotínico (AChBP).

Las subfracciones denominadas pico 30 y pico 29, con actividad de antagonista competitivo en el modelo de Ac-AChBP fueron repurificadas mediante HPLC a partir de veneno total y fracciones de 5 min de veneno total, con el afán de

tener material suficiente para su evaluación en ensayos de inmunomodulación y posterior secuenciación.

A partir de las condiciones iniciales de solución A (H₂O + 0.12% ácido trifluoroacético) y solución B (acetonitrilo y ácido trifluoroacético 0.1%) empleadas para el veneno total, se determinó el porcentaje de solución B (%B) de elución de cada pico de interés, y se modificó el protocolo de purificación considerando un -10%B y +20%B de la condición original. Para repurificar los picos a partir de fracciones de 5 minutos, se empleó la columna Zorbax C18 (250 x 4.6 mm), con un flujo de 0.3 mL/min en 60 minutos. Posteriormente cada subfracción individual fue repurificada en columna C18 (1.0 × 250 mm, 218 TP51, Grace Vydac) a flujo de 0.1 mL/min en 120 minutos. Las fracciones obtenidas, fueron liofilizadas y de acuerdo a su masa estimada fueron resuspendidas en un volumen igual de agua desionizada estéril para utilizarse en una concentración final de 50 µg/mL.

Tabla 2: condiciones de HPLC para purificación de veneno total y repurificación de fracciones y subfracciones.

minuto	%A / %B iniciales para veneno total	%A / %B para repurificación de fracción de 5' y subfracción
0	100/0	85 / 15
5	100/0	---
65	40/60	55 / 45

RESULTADOS

Conus californicus

- *Péptidos sintéticos con actividad en canales de calcio.*

Como parte de la estrategia de caracterización de conotoxinas con afinidad por receptores y/o canales iónicos implicados en el control de citocinas pro-inflamatorias, se trabajó para el caso de *Conus californicus* con dos péptidos sintéticos de una secuencia de 13 aminoácidos activa sobre canales de calcio voltaje – dependientes, previamente aislada y reportada por Bernáldez et al. (2011). Ambas isoformas comparten la secuencia **NCPAGCRSQGCCM** con el patrón de cisteínas XVI, divergente de las clásicas ω -conotoxinas activas contra canales de Ca^{2+} . Esta secuencia había sido previamente reportada y nombrada como cal15a y CalTx (Biggs et al. 2010; Bernaldez et al. 2011); pero siguiendo el esquema general de clasificación de conotoxinas definido por Olivera y Cruz (2001) esta conotoxina debe ser nombrada como cal16b, para evitar ambigüedad con cal16a reportada para *C. californicus* por Elliger et al. (2011).

La secuencia de cal16b fue valorada con la conectividad globular (cal16b_1) y de lazos (cal16b_2), al considerar que para una toxina con 4 cisteínas existen 3 posibles tipos de enlace disulfuro: globular (Cys1–Cys3, Cys2–Cys4), en gotas (Cys1-Cys2, Cys3-Cys4) y de lazos (Cys1–Cys4, Cys2–Cys3), y que en las toxinas nativas aisladas hasta el momento solo se ha encontrado la conectividad globular y de lazos (Kang et al. 2007; Halai y Craik, 2009; Ye et al. 2011; Haegen et al. 2012).

La actividad de ambos péptidos fue evaluada en presencia del estímulo pro-inflamatorio de LPS.

La Figura 4, muestra el efecto de cada péptido en los niveles de ARNm. En las células expuestas a cal16b_1 y cal16b_2 (sin LPS), el nivel de iNOS e IL-12p40 se mantuvo no detectable (Figura. 4D y 4E). En todas las condiciones de tratamiento, el nivel de transcripción del gen IL-10 (Figura. 4A) se mantuvo sin cambio ($p>0.05$). El tratamiento de LPS-péptido generó dos patrones de transcripción distintos: la forma cal16b_1 redujo la transcripción de IL-1 β , iNOS e IL-12p40 (Figura. 4B, 4D, 4E), e incrementó el nivel de ARNm de TNF- α (Figura. 4C). El tratamiento LPS-cal16b_2 incrementó IL-1 β , TNF- α e iNOS, sin alterar el nivel de IL-12p40 respecto al control de LPS (Figura. 4B, 4C, 4D y 4E)

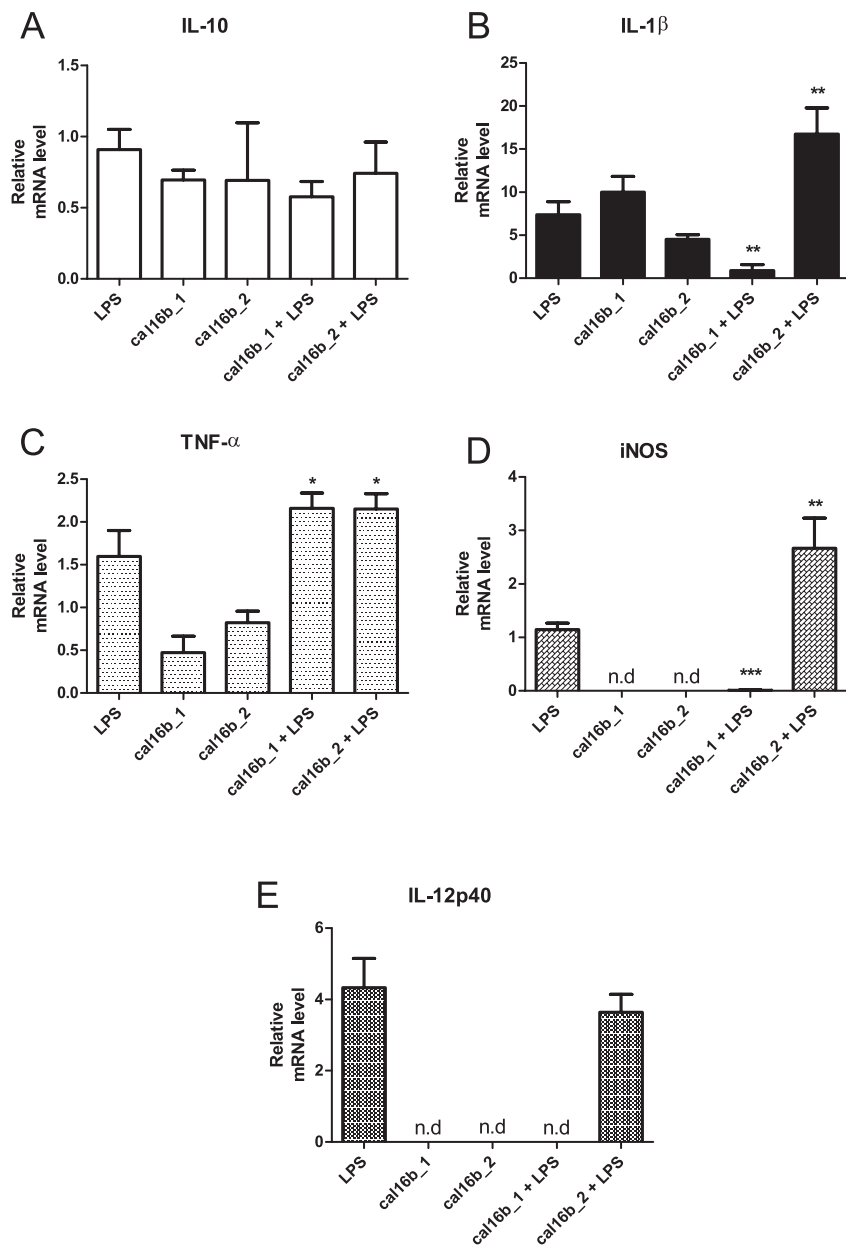


Figura 4. Niveles de ARNm de A) IL-10, B) IL-1β, C) TNF-α, D) iNOS and E) IL-12p40 en la línea celular J774A.1 expuesta a LPS y formas sintéticas de la toxina cal16b. Un total de 1×10^6 células fueron expuestas a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de los péptidos sintéticos cal16b_1 o cal16b_2 en presencia o ausencia de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LPS de *E. coli*. Luego de 12 h, el ARN total fue extraído y convertido a cDNA con oligo dT₂₀. Los niveles de transcripción de cada gen fueron medidos y comparados por RT-PCR. Los resultados se expresan como la media \pm SD

del incremento del gen de interés normalizado (gen de interés/gen constitutivo) en cada tratamiento, respecto al nivel del gen normalizado en las células no estimuladas (células sin LPS o péptidos). n = 3. *p<0.05, **p<0.01 y ***p<0.001 vs LPS (Student's *t*-test). n.d. = no detectado.

Selección, purificación y ensayo de subfracciones de veneno total con actividad en modelo de proteína de unión a acetilcolina (Ac-AChBP)

La proteína de unión a acetilcolina (AChBP por sus siglas en inglés), es una proteína soluble de 210 aminoácidos. Se aisló por primera vez de una biblioteca de ADNc del caracol de agua dulce *Lymnaea stagnalis* (*Ls-AChBP*). Esta proteína, es secretada en organismos como el ya mencionado y otros como *Aplysia californica* (*Ac-AChBP*) y *Bulinus truncatus* (*Bt-AChBP*) en las células gliales cercanas a las sinapsis colinérgicas, donde modula la transmisión sináptica al unirse a acetilcolina (Smit et al. 2003; Karlin, 2001; Bourne et al. 2010). Esta proteína, forma subunidades homologas al dominio N-terminal extracelular de unión a ligando del receptor nicotínico (Bourne et al. 2010), teniendo capacidad de unirse a agonistas y antagonistas competitivos de dicho receptor, como la epibadina, nicotina, (+)-tubocurarina, α -bungarotoxina y α -conotoxina Iml (Figura 5); siendo su espectro de actividad similar a los nAChR neuronales homopentámeros compuestos por las subunidades $\alpha 7$ ó $\alpha 9$. Lo anterior permite emplearla como modelo para la identificación e interacción de moléculas con estos receptores (Smit et al. 2003).

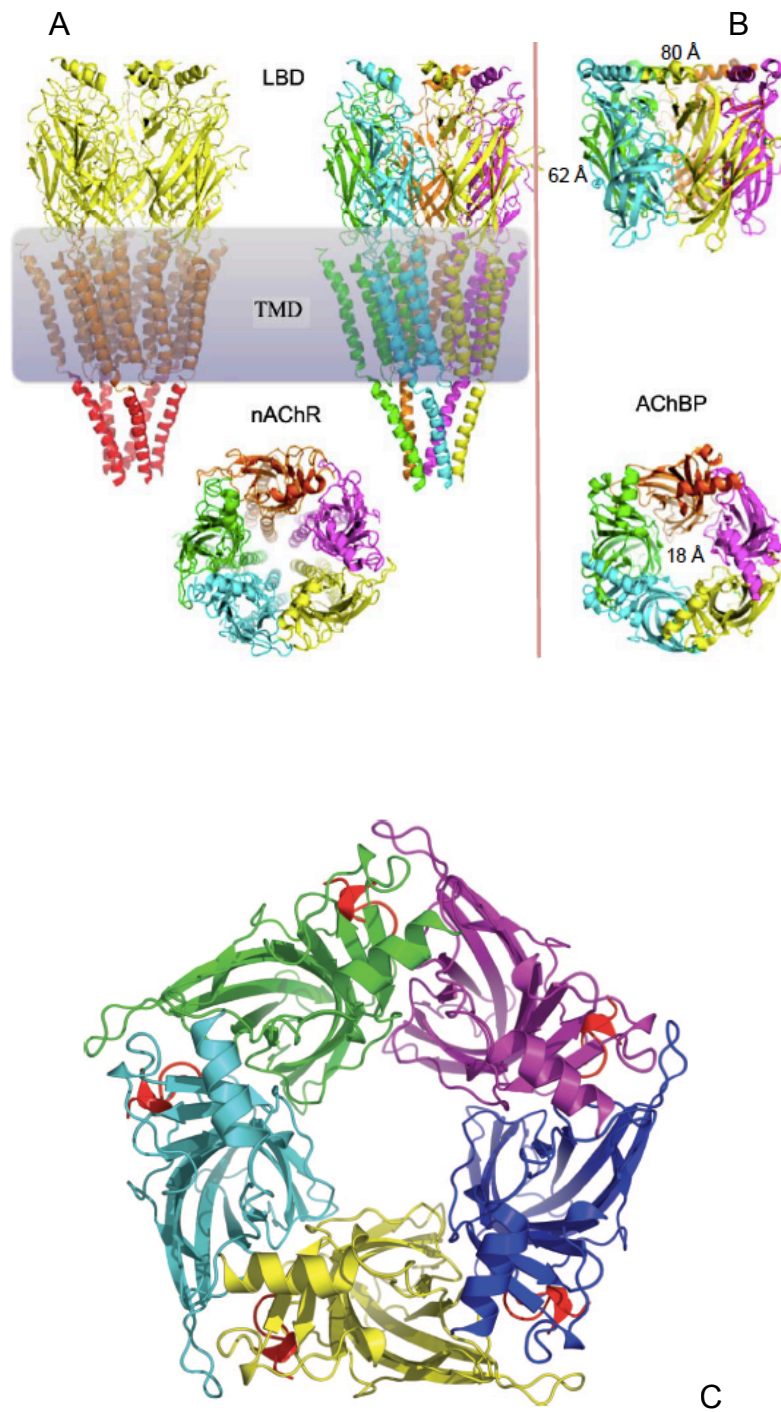
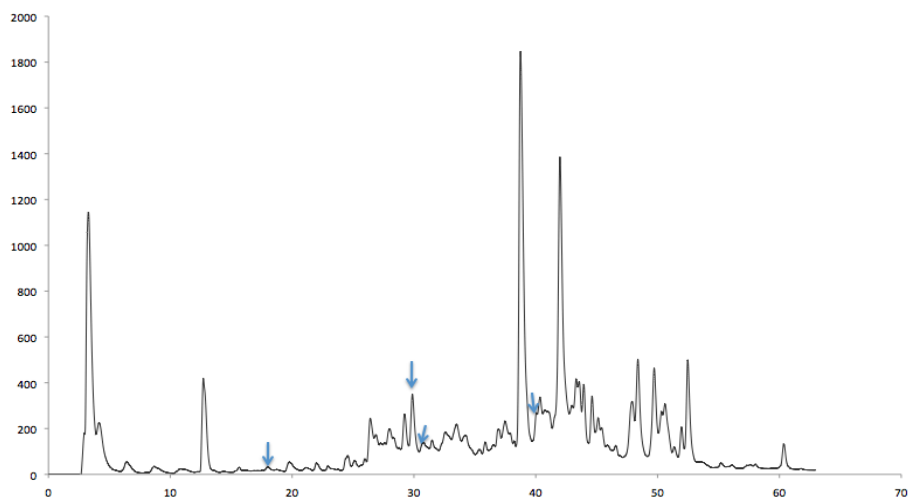


Figura 5: Estructura de: A) un nAChR, se muestra el dominio de unión a ligando (LBD) y dominio transmembranal (TMD). B) proteína AChBP en vista lateral (imagen superior) y vista superior (imagen inferior) comparada con la estructura de un nAChR. C) Modelo de unión de α -conotoxina Iml (en rojo) con Ac-AchBP. (Bourne et al. 2010; Ulens et al. 2006)

Como parte de la identificación de compuestos con actividad antagonista en nAChR (a ser evaluados como inmunomoduladores), se colectó de manera individual cada uno de los picos (subfracciones) del perfil cromatográfico de veneno total de *C. californicus* (figura 6A), nombrándolos de acuerdo a su consecución de colecta. Estas subfracciones, fueron liofilizadas y enviadas a UCSD para su evaluación en el ensayo de desplazamiento competitivo del ligando agonista [3H]-epibatidina en la proteína Ac-AChBP (Figura. 6B).

A



B

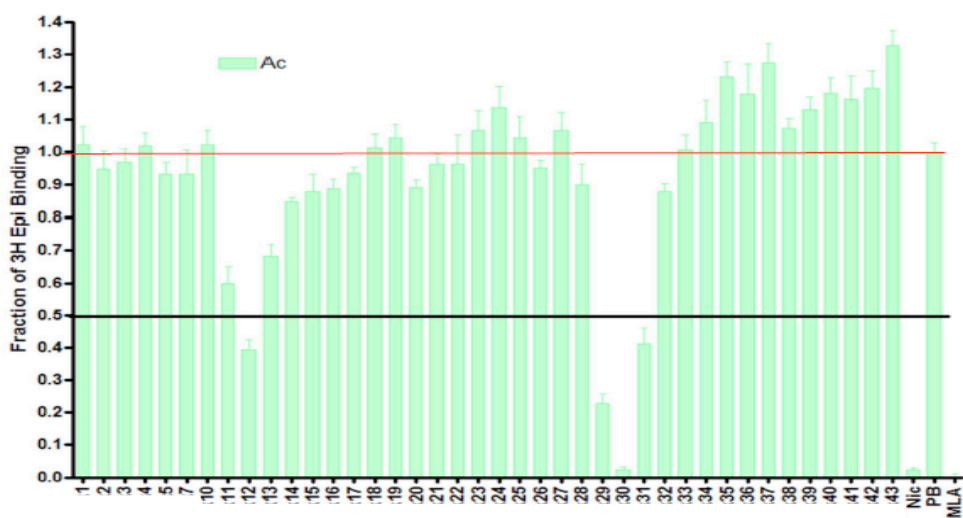


Figura 6: A) Perfil cromatográfico del veneno total de *C. californicus*. Las flechas indican las subfracciones con mayor actividad en el modelo de Ac-AChBP **B)** Resultados del modelo de desplazamiento competitivo en la proteína *Ac-AChBP*. Se observa el efecto de cada subfracción (1 a 43) del veneno de *C. californicus* vs el agonista [3H] epibatidina. Las subfracciones 12, 29, 30 y 31 disminuyen en más del 50% la unión del agonista, comparado con el control negativo de unión (PB), lo que implica la presencia de 1 ó más péptidos con actividad de antagonista nicotínico. Nic: control positivo de unión agonista (nicotina), PB: control negativo, MLA: metilcaconitina (control de unión inespecífica).

La purificación de las subfracciones con actividad se llevó a cabo con las condiciones mencionadas en la tabla 2. Solo se obtuvo material suficiente para analizar por masas a la subfracción 7.1.

El reporte preliminar del laboratorio de masas demostró la presencia de compuestos monocargados no peptídicos en el rango de 100 a 600 Da, y un compuesto de doble carga (péptido) de 929.32 Da, correspondiente a una masa experimental monoisotópica de 1856.64 Da. Sin embargo, este compuesto no pudo ser reducido y/o fragmentado para la elucidación de la secuencia en MS/MS. Por ello, se compararon las masas monoisotópicas teóricas de las secuencias clonadas y/o aisladas reportadas previamente para *C. californicus*, con la masa encontrada experimentalmente en nuestro trabajo. Del total de 51 clonas y 15 toxinas maduras reportadas se encontró una concordancia de la masa experimental teórica de la toxina cl14c (denominada así por ese grupo de trabajo). Los aminoácidos en la secuencia de cal14c, generan una masa monoisotópica calculada de 1860.09 Da (incluyendo los enlaces disulfuro) con un patrón de masas calculado $[M+2H]^{2+} = 932.045$, muy cercano al obtenido de forma experimental para la subfracción 7.1.

La toxina cl14c, forma parte de una nueva superfamilia junto con otras 5 secuencias aisladas a partir de ADNc de esta especie, y al igual que la toxina

cl14b fue encontrada en un clon de ADNc y en un pico mayoritario de veneno total. Ambos péptidos guardan una alta identidad con el péptido lt14a de *Conus litteratus*, que tiene una actividad antagonista en receptores nicotínicos y antinociceptiva (Peng et al. 2006). Lo anterior, sumado a la ausencia de miembros de la superfamilia A en esta especie de *Conus*, hizo suponer que estas toxinas son los principales antagonistas nicotínicos presentes en el veneno de *C. californicus*.

Considerando que las subfracciones 7.1 y 7.2 (también nombradas como subfracciones 29 y 30 en el ensayo de AChBP), tienen actividad de antagonismo competitivo, que eluyen en forma consecutiva y que la toxina cl14c y la subfracción 7.1 tienen un tiempo de retención y masas similares, se tomó la decisión de sintetizar los 6 péptidos de esta nueva superfamilia. Cabe remarcar que si bien, solo aislamos a la subfracción 7.1, la 7.2 podría corresponder a alguna de estas otras secuencias, por las razones ya mencionadas. Considerando su similitud con la toxina lt14a, el enlace entre cisteínas fue de tipo globular (1-3 y 2-4). La síntesis de estos péptidos, fue llevada a cabo por los laboratorios GenicBio Limited.

La concentración utilizada en los ensayos fue de 5 μ M. Esta concentración, fue seleccionada previa comparación con la IC50 de otras toxinas que afectan a receptores nicotínicos neuronales y que tienen el marco de cisteínas #XIV debido a que no contábamos con evidencia suficiente del subtipo de nAChR hacia el cual tienen afinidad las toxinas de *C. californicus* (Tabla 3).

Tabla 3: Toxinas con el patrón de cisteínas XIV que afectan a receptores nicotínicos neuronales

Toxina	Organismo	Subtipo nAChR	IC50	Referencia
Pu14a	<i>Conus pulicarius</i>	$\alpha 3\beta 2$ y $\alpha 6\alpha 3\beta 2$	10 μM y 1 μM respectivamente	Peng et al. 2010
Pl14a	<i>Conus planorbis</i>	$\alpha 3\beta 4$	8.7 μM	Imperial et al. 2006
Lt14a	<i>Conus litteratus</i>	No definido	No definido (evaluado a concentraciones 1, 5 y 10 μM)	Peng et al. 2006

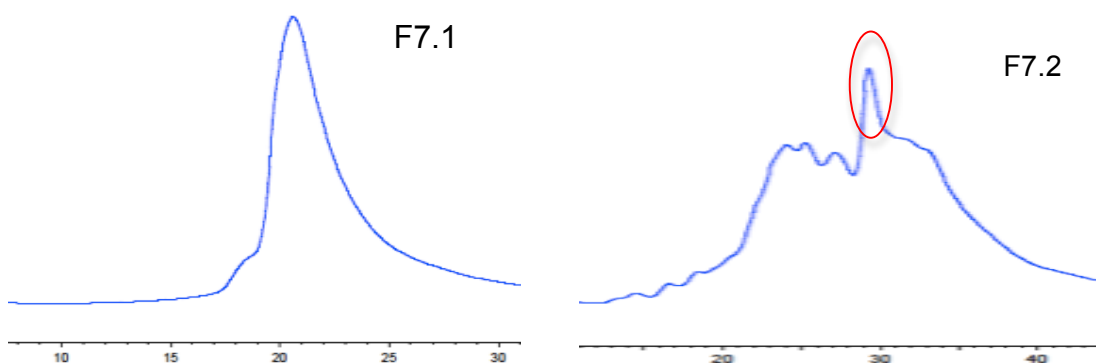
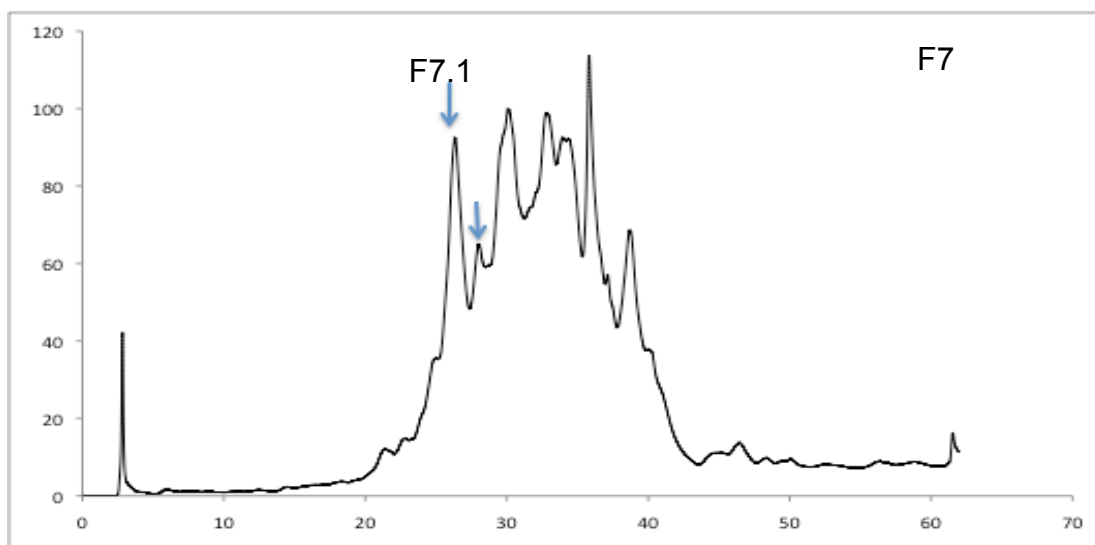


Figura 7: Perfil cromatográfico de la repurificación de la fracción 7 y subfracciones 7.1 y 7.2 de *C. californicus*

Efecto de antagonistas nicotínicos de *C. californicus* en la transcripción de genes de citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias

Tomando como base a la toxina It14a, en la síntesis de cada péptido se realizó con unión entre cisteínas de tipo enlace globular (cys1-cys3, cys2-cys4).

La nomenclatura de estos péptidos está basada en la propuesta por Olivera y Cruz (2001), empleando 3 letras para designar a la especie, número arábigo "14" para designar el marco de cisteínas, una letra minúscula para los péptidos aislados en veneno total, y el código de clona en aquellos que no han sido aislados del veneno total, pero que existen como secuencia de ADNc. Para evitar ambigüedad, se respetó el orden dado por Biggs en cada gen y se mantuvieron las letras "c" y "d" al final de la toxina correspondiente, evitando el uso de la letra "a" anteriormente empleada por Elliger et al. (2011), para designar a otra toxina de esta especie con el mismo patrón de cisteínas pero no perteneciente a esta superfamilia.

Tabla 4: Péptidos pertenecientes a la superfamilia J2.

Nombre	[M+2H] ²⁺ experimental del péptido sintético	Concentración de trabajo empleada
cal14c	930.55	5 µM
cal14.2b	914.55	
cal14.2c	922.55	
cal14b	952.35	
cal14.1a	924.55	
cal14.1b	888.30	

(:) conservado; (.) semi-conservado; (*) idéntico

A continuación, se detallará brevemente el efecto de cada uno de los 6 péptidos pertenecientes a esta superfamilia (tabla 4), en la transcripción de genes de citocinas pro-inflamatorias (TNF- α , IL-12p40, IL-1 β , iNOS) y anti-

inflamatorias (IL-10) en macrófagos; más adelante se hablará de la relevancia y significancia de estos efectos.

Como se observa en la Figura. 7A, ninguno de los péptidos tuvo un efecto de aumento o disminución del nivel de transcripción del gen IL-10 en comparación con el tratamiento de LPS ($p > 0.05$). Con excepción de las formas **cal14c** y **cal14b**, que inhiben la transcripción (N.D = no detectable). Tampoco se encontró una diferencia significativa para este gen entre los controles de tratamiento (LPS vs LPS+NIC).

La forma sintética de la toxina **cal14c**, aumentó significativamente la transcripción de TNF- α , IL-1 β , iNOS e IL-12p40 en presencia de LPS (Figura. 7 C, E, G, e I respectivamente) y revirtió el efecto anti-inflamatorio de la nicotina para estos mismos genes (Figura. 7 D, F, H y J respectivamente). Los péptidos **cal14.2c** y **cal14.2b**, comparten un 88% de identidad con cal14c en los residuos 7 a 17. La actividad de **cal14.2b** fue la más similar a la actividad de cal14c, al incrementar en presencia de LPS los niveles de transcripción de TNF- α , IL-1 β e IL-12p40, aunque no alteró el nivel de iNOS; también debilitó el efecto supresor de la nicotina en todos los genes pro-inflamatorios (Figura. 7 D, F, H y J), en menor proporción que cal14c. Por su parte, el péptido **cal14.2c** en presencia de LPS favoreció la transcripción de iNOS, no tuvo efecto en TNF- α , IL-12p40 e IL-1 β , pero si revirtió la acción anti-inflamatoria de la nicotina (Figura. 7 D, F, H y J) en similar proporción que cal14c.

Los péptidos **cal14.1a** y **cal14.1b** comparten un 94.12% de identidad, teniendo solamente un cambio no conservado de Glu a Gly en la posición 15 (tabla 4). Ambos tienen un efecto contrario en la transcripción: **cal14.1a** potencia el

efecto pro-inflamatorio generado por LPS en presencia y ausencia del agonista nicotina (Figura 7C a 7J). Mientras que **cal14.1b** es el único péptido que reduce el efecto pro-inflamatorio inducido por LPS para TNF- α , IL-1 β e IL-12p40 (Figura. 7 C, E, I), aumentando levemente la transcripción de iNOS (Figura. 7 G). En presencia de nicotina, cal14.1b no logra revertir el efecto anti-inflamatorio de ésta, con excepción del gen IL-12p40 que se ve levemente incrementado (Figura. 7J). La secuencia **cal14b** comparte con cal14.1a y cal14.1b un 54.94% de identidad, con un cambio conservado en la posición 2 y semiconservado en la posición 16. Sin embargo, su efecto difiere de estas toxinas, ya que en presencia de LPS solo incrementó el nivel de TNF- α (Figura. 7C) y revirtió el efecto de la nicotina en los niveles de TNF- α , IL-1 β e iNOS (Figura. 7 D, F y H).

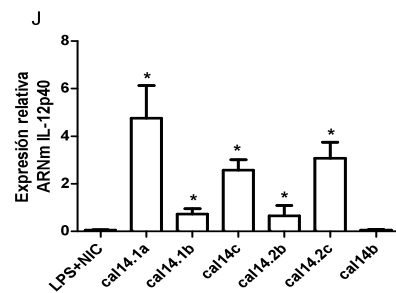
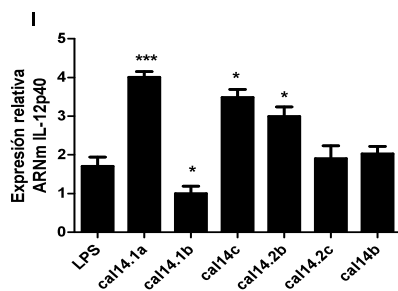
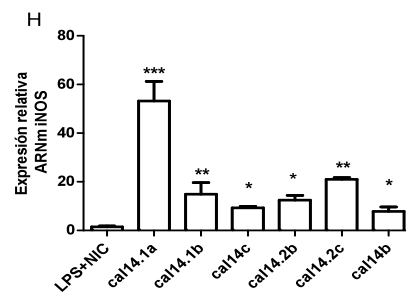
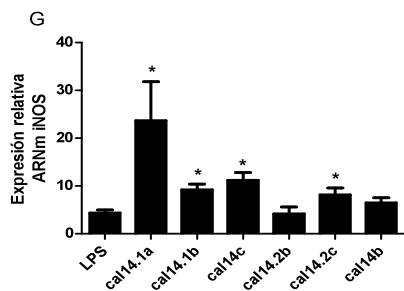
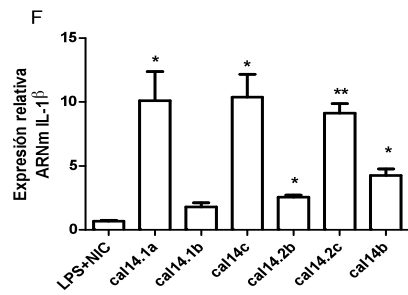
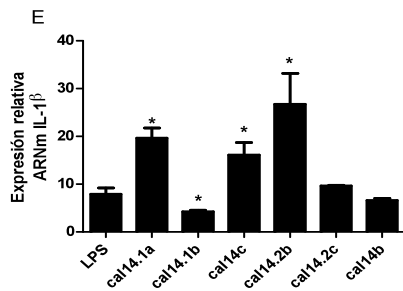
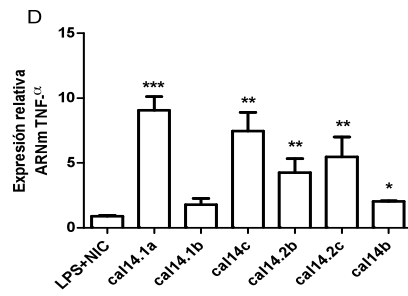
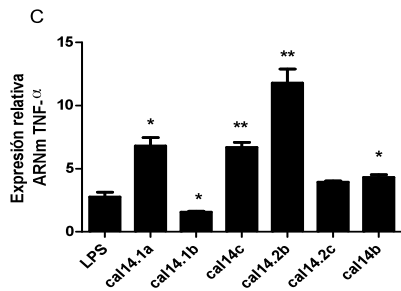
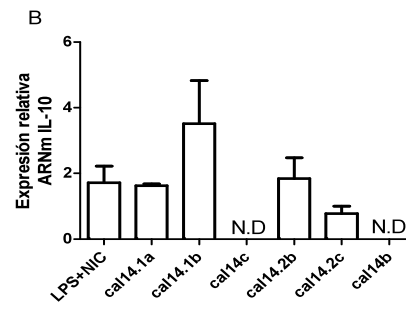
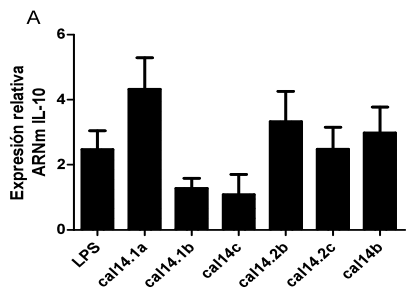


Figura 7: Efecto de péptidos sintéticos de la superfamilia J₂ de *C. californicus* en la transcripción de citocinas pro- y anti- inflamatorias A y B) IL-10; C y D) TNF- α ; E y F) IL-1 β ; G y H) iNOS e I y J) IL-12p40. 1 x 10⁶ células fueron expuestas a 5 μ M de cada péptido en presencia de 1 μ g/mL de LPS \pm 100 μ M nicotina. Luego de 12 h, el ARN total fue extraído y convertido a ADNc con oligo dT₂₀. Los niveles de transcripción de cada gen fueron medidos y comparados por RT-PCR. Los resultados se expresan como la media \pm SD del incremento del gen de interés normalizado (gen de interés/gen constitutivo) en cada tratamiento, respecto al nivel del gen normalizado en las células no estimuladas (células sin LPS, nicotina o péptidos). n = 3. *p<0.05, **p<0.01 y ***p<0.001 vs LPS+NIC (Student's *t*-test). n.d. = no detectado.

Conus ximenes

Efecto sobre la activación de macrófagos de α -conotoxinas de *Conus ximenes* con actividad antifímica.

Como se mencionó anteriormente, a diferencia de otros antagonistas nicotínicos como la α -bungarotoxina y MLA, el estudio del efecto de α -conotoxinas en modular la respuesta inflamatoria de macrófagos ha sido poco abarcado en la literatura.

Además de los experimentos realizados a toxinas de *C. californicus*, se trabajó con una toxina de *Conus ximenes* con actividad antifímica sobre la cepa H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis*. Esta toxina tiene una secuencia peptídica correspondiente a una α -conotoxina, con el patrón de cisteínas #I (CC-C-C), un patrón globular de enlace disulfuro entre cys1-cys3/cys2-cys4 y un patrón de 4/3 residuos entre cisteínas (Bernáldez, comunicación personal, 2012). Para esta secuencia, se evaluó el impacto de la presencia o ausencia de la amidación en el carboxilo terminal (xm1b y xm1a, respectivamente), en presencia del agonista nicotina y el estímulo de LPS. Para ello, en los ensayos realizados se evaluó la concentración mínima inhibitoria (MIC) para *M. tuberculosis* (50 μ g/mL), en presencia de 1 μ g/mL del estímulo inflamatorio LPS y 100 μ M del estímulo anti-inflamatorio del agonista nicotina.

Si bien el efecto comprobado de esta toxina es como agente antifímico, el interés de evaluar su efecto en macrófagos responde a que *M. tuberculosis* es un patógeno intracelular que infecta principalmente a éstas células, protegiéndose dentro de ellas de la respuesta inmune del hospedero y de la acción de medicamentos antituberculosis, reduciendo la activación del macrófago así como su capacidad citolítica y microbicida (Kaufmann, 2002). Los agonistas nicotínicos favorecen la reducción de citocinas pro-inflamatorias y reducen la capacidad microbicida; por lo que en células infectadas, la capacidad de eliminación de patógenos intracelulares se ve alterada así como su diferenciación hacia macrófagos tipo 1, que son capaces de producir IL-12 y de presentar el antígeno a una célula T (Yamaguchi et al. 2003; Yanagita et al. 2009).

En la figura 8, se observa que en comparación con el control de exposición pro-inflamatorio (LPS), en las células expuestas al agonista nicotina existe una reducción significativa en los niveles de ARNm de IL-1 β y TNF- α (Figura. 8 B y C), y no significativa en el gen IL-12p40 ($p > 0.05$). En presencia del estímulo pro-inflamatorio (LPS), anti-inflamatorio (LPS + Nic) y toxinas, no se observaron cambios en los niveles de transcripción de IL-10 (Figura. 8 A). La exposición a nicotina y LPS aumenta significativamente la transcripción de iNOS (Figura 8D). Si bien se ha reportado que este agonista es mayormente inhibidor de genes pro-inflamatorios, también se ha descrito el efecto contrario. Chen et al. (2004), encontraron un aumento en la producción de iNOS en la línea celular tipo macrófago RAW264.7, al exponer a las células a LPS (20ng/ml), IFN- γ (10ng/ml) y nicotina (0.2-1.6 mM).

En los grupos expuestos a toxinas, la forma amidada **xm1b** y la no amidada **xm1a**, incrementaron los niveles de transcripción de IL-1 β y TNF- α (Figura. 8 B y C); redujeron la transcripción de iNOS (Figura. 8 D) y no tuvieron efecto en IL-10 (Figura. 8 A; $p < 0.05$ respecto al control LPS+NIC); solo xm1b revirtió en forma significativa el efecto de la nicotina sobre la transcripción de IL-12p40 (Figura. 8 E, $p < 0.05$ respecto al control LPS+NIC).

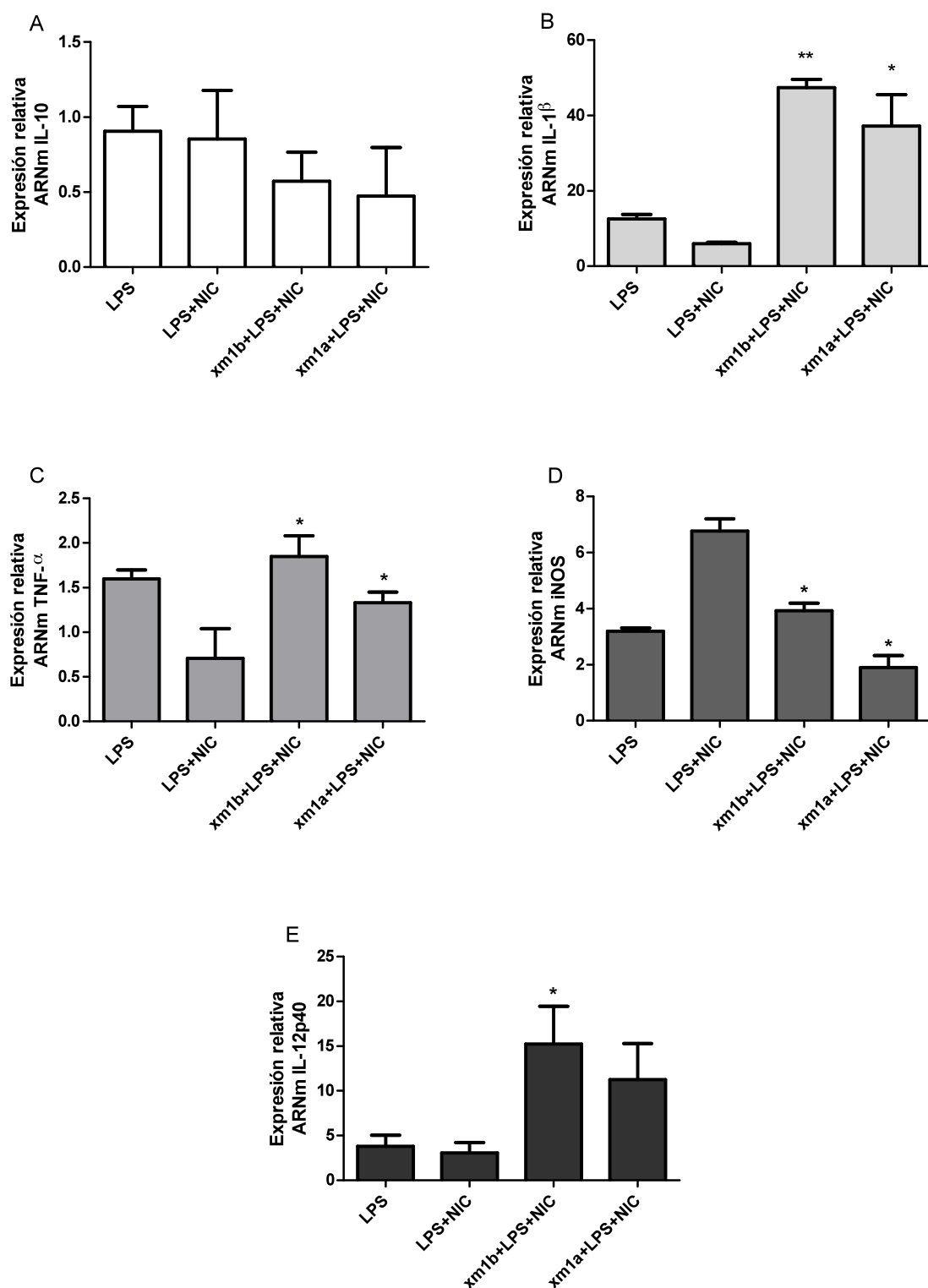


Figura 8: Efecto de α -conotoxinas sintéticas de *Conus ximenes* sobre la transcripción de citocinas pro-inflamatorias: A) IL-10; B) IL-1 β ; C) TNF- α ; D) iNOS y E) IL-12p40. Un total de 1×10^6 células se expusieron a $1 \mu\text{g/mL}$ de LPS en presencia o ausencia de $100 \mu\text{M}$ de nicotina. Luego de 12 h, el ARN total fue extraído y convertido a cDNA con oligo dT₂₀. Los niveles de transcripción de

cada gen fueron medidos y comparados por RT-PCR. Los resultados se expresan como la media \pm SD del incremento del gen de interés normalizado (gen de interés/gen constitutivo) en cada tratamiento, respecto al nivel del gen normalizado en las células no estimuladas (células sin LP, péptidos ni nicotina). n = 3. *p<0.05, **p<0.01 y ***p<0.001 vs LPS+NIC (Student's *t*-test). n.d. = no detectado.

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La mayoría de los reportes en conotoxinas las engloban como excelentes candidatos en terapia contra el dolor y otras afecciones del sistema nervioso, ya que sus blancos moleculares se encuentran principalmente en éstas células. Dado que canales de calcio y receptores nicotínicos modulan la respuesta de activación de células no excitables como los macrófagos, en la serie de experimentos realizados en este proyecto se evaluó cómo diferentes conotoxinas al bloquear a estos receptores, alteran la transcripción de genes pro-inflamatorios, ante un estímulo pro-inflamatorio (LPS) y un anti-inflamatorio (nicotina) *in vitro*. Con esta aproximación, se logró evaluar cómo se afecta la activación de macrófagos, así como el efecto que tienen en ésta algunas modificaciones post-traduccionales o cambios en la secuencia de la toxina.

Trabajos previos demostraron que las toxinas cal16b_1 y cal16b_2 son bloqueadoras de canales de calcio activados por voltaje, teniendo cal16b_1 aproximadamente 2.2 veces más potencia que cal16b_2 en reducir la corriente de calcio (datos no mostrados). Ambas toxinas producen efectos contrarios en la respuesta pro-inflamatoria y probablemente éstos estén mediados por la afinidad de cada isoforma por el canal iónico, resultado de la diferente unión entre cisteínas. Esta afinidad, estaría generando oscilaciones de Ca²⁺ causantes de alterar la estabilidad del ARNm, así como los eventos de

transcripción río abajo, necesarios para la completa transcripción de todos los genes pro-inflamatorios estudiados (Jin et al. 2007; Daly y Craik, 2009; Zhu et al. 2011). En células del sistema inmune se ha descrito a los canales de calcio operados por depósito (CRAC) como los responsables de mantener la elevación en el Ca^{2+} citosólico, modulando así el patrón de genes expresados y funciones necesarias de la célula, siendo estos canales insensibles a bloqueadores de Ca^{2+} como el diltiazem y verapamilo (Willmott et al. 1996). Aún siendo estos canales la principal entrada de Ca^{2+} y el principal objetivo de bloqueadores para la inmunomodulación, la presencia de otros canales de Ca^{2+} como los tipo L, hacen a los macrófagos susceptibles a la acción moduladora de toxinas bloqueadoras de canales Ca^{2+} . Los resultados obtenidos para cada isoforma de cal16b hacen suponer que los efectos de ambas son el resultado del bloqueo de un canal de Ca^{2+} voltaje dependiente, lo que genera oscilaciones de Ca^{2+} responsables del patrón de genes observado.

En la figura 4, se observa que en las células expuestas a LPS-cal16b_1 se reduce la transcripción de genes de citocinas pro-inflamatorias, con excepción del gen TNF- α . En contraste, las células expuestas solo a cal16b_1 incrementan la transcripción del gen IL-1 β . Este efecto de incremento y decremento en la transcripción de estos genes, en presencia/ausencia del estímulo LPS, ha sido también reportado para la toxina Ts2 del escorpión *Tityus serrulatus* (Zoccal et al. 2011), y para el bloqueador de canales CRAC: el fármaco SK&F 96365 (Ye et al. 2012). La toxina Ts2 en presencia de LPS genera el incremento en TNF- α e IL-6, y en ausencia de LPS reduce los niveles de ambas citocinas; mientras que SK&F 96365 incrementa a IL-1 β pero reduce

a TNF- α . El que la toxina cal16b_1 tenga este efecto podría ser debido a la alteración en la activación y translocación nuclear de factores de transcripción como el NF- κ B, que es una consecuencia del bloqueo de canales de Ca²⁺ reportada para algunos fármacos como el verapamilo, una fenil-alquil-amina bloqueadora de canales de calcio tipo L (Brown et al. 2004). Uno de los primeros genes transcritos, luego de la unión de LPS a su ligando TLR-4, es el TNF- α . Este a su vez, luego de su traducción y excreción, genera la señal necesaria para el inicio de transcripción de otros genes pro-inflamatorios como la IL-1 β . El péptido cal16b_1 interfiere con iNOS, IL-1 β e IL-12p40 pero no TNF- α , esto puede deberse a que la reducción en la tasa de entrada de iones inhibe o dificulta mecanismos de post-transcripción o post-traducción inducidos por Ca²⁺. El que la isoforma cal16b_2 genere el patrón contrario a cal16b_1, puede ser debido a que la toxina cambia su conformación en solución, al tener un diferente enlace entre cisteínas, traduciéndose no solo en una reducción en la afinidad de la toxina por el canal de calcio, sino también en un posible cambio del blanco molecular en macrófagos.

Los receptores nicotínicos de acetilcolina participan en procesos como la función cognitiva, el movimiento, percepción del sonido y el control de la respuesta inmune. Diferentes subtipos de estos receptores presentan una diferente localización anatómica, así como propiedades biofísicas y farmacológicas específicas en el tejido o célula en el que se localizan, siendo importantes en diferentes padecimientos, por ejemplo: α 6 β 2 y α 4 β 2 en Parkinson; α 7 en sepsis, Alzheimer y esquizofrenia; y α 9 α 10 en dolor neuropático (Essack et al. 2012).

En macrófagos, el papel del receptor homopentámero $\alpha 7$ es el descrito de mejor manera. Aunque también se ha reportado que distintos receptores controlan diferentes aspectos de la respuesta inmunológica, como el $\alpha 9\alpha 10$, $\alpha 4\beta 4$ y el $\alpha 4\beta 2$ en linfocitos B; y otros en células dendríticas, linfocitos T, mastocitos, neutrófilos, etcétera (Koval et al.2011). La búsqueda de subfracciones activas sobre receptores nicotínicos se llevó a cabo de tal manera que se identificaran moléculas activas sobre el homopentámero $\alpha 7$; aún así, el espectro de actividad determinado con la proteína AChBP puede identificar a compuestos activos en otros subtipos de receptores nicotínicos y otros receptores nicotinoides.

Los 6 péptidos analizados forman parte de una nueva superfamilia denominada por Biggs (2010) como J_2 . Estos péptidos, tienen una longitud de 17 aminoácidos, mantienen el arreglo **-CPP-C-C-C-**, donde el patrón de cisteínas y dos prolina luego de la primera cisteína, son altamente conservadas entre sí y con otras toxinas de *Conus*, activas sobre nAChR (lt14a y pu14a). Estas toxinas fueron subdivididas en dos grupos principales: el grupo 1 con la región conservada en las posiciones 7 a 17 (cal14c, cal14.2b y cal14.2c); y el grupo 2 donde no se conserva esta región (cal14b, cal14.1a y cal14.1b). En *C. californicus*, las variantes de una misma toxina flanqueadas por regiones altamente conservadas y variantes moleculares en otras regiones, ha sido asociada a la diversidad necesaria de esta especie para atacar a un mismo canal o receptor presente en diferentes organismos, siendo las regiones variables aquellas expuestas en la conformación tridimensional de la toxina y las necesarias para interactuar con el receptor blanco (Gilly et al. 2011). Por lo

anterior, es muy probable que todas estas toxinas afecten a receptores nicotínicos diferentes, o bien, tengan mayor afinidad por un tipo de subunidad en particular.

De los dos grupos en los que subdividimos a los péptidos analizados, obtuvimos patrones de transcripción distintos, los más similares entre sí son los péptidos englobados en el grupo I (cal14c, cal14.2b y cal14.2c), en los que se observó que existe una sinergia en la transcripción de genes de citocinas pro-inflamatorias entre el péptido y el LPS, además de que revierten el efecto anti-inflamatorio de la nicotina.

Las posiciones 1 y 2, en el extremo amino, son muy similares en 4 de las 6 toxinas. Esta secuencia amino terminal, y particularmente el residuo 1, han sido reportados como esenciales para la actividad y afinidad de la α -conotoxina PIA de *Conus purpurascens* sobre receptores nicotínicos constituidos por la subunidad $\alpha 6$ (Dowell et al. 2003; Pucci et al. 2011). En los receptores nicotínicos, la combinación de subunidades distintas hace que el receptor exhiba una afinidad particular por agonistas y antagonistas (Albuquerque et al. 2009). En el sistema inmune, existen diferentes subtipos de receptores nicotínicos de acuerdo al tipo de célula. El resultado en la activación o bloqueo de un nAChR puede resultar en consecuencias diferentes, dependiendo del tipo de célula inmune y de los receptores aledaños a éste, llegando a existir un efecto antagónico entre receptores compuestos de diferentes subunidades (Koval et al. 2009; Skok, 2009).

En el péptido cal14.2c, el cambio conservador de carga parece alterar la sinergia entre la toxina y el LPS (comparando con cal14c). Si bien, un cambio

de esta naturaleza no altera las propiedades fisicoquímicas de la toxina, es probable que favorezca la interacción con un subtipo distinto de receptor nicotínico, o bien, que al perder fuerza de afinidad, ésta se traduzca en una menor potencia del efecto pro-inflamatorio obtenido con LPS. Es probable que el grupo funcional sea importante para determinar la afinidad o potencia de estas toxinas sobre el receptor nicotínico afectado en macrófagos. Los efectos obtenidos por cambios conservadores de carga han sido reportados en otras conotoxinas. Jacobsen et al. (2000), demostraron que al cambiar Arg por Lys en la posición 2 de la κ -conotoxina PVIIA, se reducía la afinidad de la toxina por el canal *shaker*, sugiriendo que el residuo Arg es importante para la interacción de la toxina con la proteína del canal. De igual forma Pucci et al. (2011), observaron que al cambiar Arg por Lys en la posición 1 de la α -conotoxina PIA, se reducía en 56 veces la afinidad de la toxina por el nAChR $\alpha 6\beta 2^*$.

El péptido cal14.1b presenta un fuerte efecto anti-inflamatorio. En contraste con el péptido cal14.1a que tiene un efecto pro-inflamatorio, la única variación entre ambas secuencias es el cambio no conservado en la posición 15. Esta posición es un aminoácido muy conservado en 5 de las 6 toxinas. El hidrógeno de la cadena lateral de este aminoácido le da una mayor flexibilidad, lo que da como resultado que resida en zonas de plegamiento en la cadena peptídica donde se requiere un fuerte ángulo de torsión, por lo que cualquier cambio por otro aminoácido puede tener un fuerte impacto en la estructura tridimensional del péptido, así como en su función (Betts y Russell, 2003). En el caso de cal14.1a este cambio parece traducirse en una elevada sinergia del péptido con LPS.

Suponiendo que el único blanco molecular de la conotoxina cal14.1b es un receptor nicotínico, surge la pregunta ¿Por qué el efecto anti-inflamatorio de esta conotoxina, si cuando se emplean otros antagonistas nicotínicos existe un efecto pro-inflamatorio?. Como se mencionó anteriormente, la combinación de subunidades de un receptor nicotínico tiene un efecto particular en células del sistema inmune, pudiendo ser antagónicos entre sí. En los efectos reportados para diferentes subtipos de nAChR, destaca el papel del receptor $\alpha 9\alpha 10$. La presencia de este receptor ha sido reportada en linfocitos, macrófagos y partes del sistema nervioso, donde el uso de antagonistas favorece la respuesta anti-nociceptiva, involucrándolo directamente en mecanismos moleculares de analgesia (Sandall et al. 2003; Clark et al. 2006; Vincler y McIntosh, 2007; McIntosh et al. 2009). En el 2008, Vincler et al. demostraron que las α -conotoxinas RgIA y Vc1.1 tenían un efecto antinociceptivo en un modelo de dolor neuropático, además de que eran capaces de reducir la migración de linfocitos y macrófagos al sitio de daño nervioso, reduciendo la hipersensibilidad en el sitio y posiblemente la acción pro-inflamatoria de estas células. En el estudio mencionado, los autores señalan que este efecto es debido únicamente al bloqueo de la subunidad $\alpha 9\alpha 10$; sin embargo, más recientemente se ha descubierto que las α -conotoxinas RgIA, Vc1.1 y PeIA, funcionan como agentes antinociceptivos debido a que bloquean canales de calcio indirectamente, al unirse en forma antagonista al receptor GABA-B (Daly et al. 2011; Cuny et al. 2012; Adams y Berecki, 2013). El uso de antagonistas del receptor GABA-B, reduce la respuesta inflamatoria y la migración celular en la dermatitis de contacto (Duthey et al. 2010). El mecanismo de acción

propuesto para estas conotoxinas es el bloqueo del canal de Ca^{2+} asociado al receptor GABA-B: una vez que se une la α -conotoxina, ésta activa la cascada de señalización por medio de las subunidades de proteína G del receptor GABA-B, inactivando al canal de Ca^{2+} en forma voltaje independiente (Cuny et al. 2012; Adams y Berecki, 2013). En macrófagos, diversos receptores acoplados a proteína G regulan o están involucrados en funciones como el contacto célula-célula, quimiotaxis, supervivencia, activación y producción de mediadores inflamatorios (Lattin et al. 2007). Teniendo lo anterior como antecedente, nuestra hipótesis es que la toxina cal14.1b actúa como antagonista del receptor nicotínico $\alpha 9\alpha 10$, al mismo tiempo que tiene actividad sobre el receptor GABA-B presente en macrófagos, generando el efecto anti-inflamatorio observado, ya sea por acción del bloqueo de canales iónicos aledaños al receptor GABA-B, un canal de calcio, o por alteración de la cascada de señales dependientes de proteína G. Esto haría a cal14.1b un candidato potencial en el tratamiento de dolor inflamatorio y otras enfermedades inflamatorias.

Los péptidos xm1a y xm1b son α -conotoxinas 4/3, que varían entre sí por la presencia de una amidación en el carboxilo terminal. Dentro de las toxinas descritas con actividad hacia receptores nicotínicos, las $\alpha 4/3$ son las menos comunes e incluyen a ImI ($\alpha 7$), ImII ($\alpha 7$ y otros) y RgIA ($\alpha 9\alpha 10$). Estas toxinas, se han descrito como compuestos que han evolucionado en especies de un mismo linaje filogenético, y se cree que son más afines a receptores compuestos solo de subunidades α (Ellison y Olivera, 2007).

La búsqueda de compuestos con capacidad de incrementar las respuestas en inmunidad innata representa una estrategia en el combate a enfermedades infecciosas (Schepetkin et al. 2008). La capacidad de xm1b y xm1a de revertir el efecto inmunosupresor de la nicotina, es un buen indicio de la afinidad de estas toxinas por receptores nicotínicos, y de su potencial como péptidos inmunoestimulantes. Considerando que además de esto, inhiben el crecimiento de *M. tuberculosis*, podrían considerarse péptidos viables para formar parte de una terapia antiférmica.

Ambas toxinas incrementaron la transcripción generada por LPS a la vez que revertían el efecto de la nicotina, siendo la forma amidada xm1b la de efecto más notorio, particularmente para TNF- α . Esto puede deberse a una mayor afinidad por el nAChR. Reportes previos en toxinas de escorpión (Bot II de *Buthus occitanus tunetanus* y CsslI de *Centruroides suffusus suffusus*), implican a la amidación terminal como responsable de la afinidad por canales de sodio voltaje dependiente (Nav) y la actividad biológica de estas toxinas (Benkhadir et al. 2004; Estrada et al. 2011). En el caso de *Conus*, la amidación terminal es una modificación post-traducciona común en α -conotoxinas, que favorece la estabilidad del péptido ante proteasas, el plegamiento y la actividad biológica (Kang et al. 2005; Loughnan y Alewood, 2004).

Una constante en las células expuestas a α -conotoxinas de *C. ximenes* o a α J₂-conotoxinas de *C. californicus*, es un efecto sinérgico en algunos de los tratamientos LPS-NIC-Péptido (una fuerte elevación en el nivel de transcripción del gen analizado en comparación con el control de LPS y LPS+NIC). A pesar de que la nicotina es un agonista que genera un efecto anti-inflamatorio,

también ha sido reportada como pro-inflamatoria, ya que a diferencia de otros agonistas como la colina o acetilcolina, ésta no es removida del sitio de unión con el receptor, por lo que la presencia constante promueve la desensibilización del receptor y la reactivación del factor NF- κ B, generando la sobre-expresión de otras citocinas pro-inflamatorias como la osteopontina (OPN), IL-6 y MCP-1. Así, la nicotina origina un circuito pro-inflamatorio, formado por la asociación NF- κ B/OPN, que reactiva la cascada pro-inflamatoria (Gahring y Rogers, 2007; Wang et al. 2012). La concentración de nicotina analizada (100 μ M) corresponde a la concentración estándar necesaria para tomar medidas relativas a la respuesta del receptor homopentámero α 7, aunque puede resultar excesiva para algunos otros subtipos. Además, si la concentración de las conotoxinas analizadas favorece su afinidad por más de un receptor nicotínico, estas podrían estar acelerando el proceso pro-inflamatorio originado por la nicotina.

Los macrófagos, tienen un papel importante en la inmunidad innata, adaptativa y en la homeostasis en tejidos. El reconocimiento de patógenos vía TLR conlleva a la activación de macrófagos, iniciando la producción de mediadores que coordinan la respuesta inflamatoria. La amplitud de esta respuesta requiere de una fina regulación para poder eliminar efectivamente al patógeno y limitar el daño colateral. La medida en que las respuestas de los macrófagos a diferentes bacterias son distintas o similares a nivel de la transcripción, depende de múltiples factores. Teniendo en cuenta los componentes celulares compartidos entre las bacterias y la vía de señalización compartida por los receptores TLR que responden a estos componentes, los macrófagos pueden

responder a todas las bacterias de una manera estándar. Sin embargo, la diversidad de bacterias y las diferencias en su patogénesis pueden conducir a respuestas de patógenos específicos. Por ejemplo, algunos microorganismos, como *M. tuberculosis*, puede sobrevivir dentro de los macrófagos y reducir la respuesta de activación de la célula (Nau et al. 2002; Rocha-Ramírez et al. 2008). El inhibir o potenciar uno o más genes involucrados en la respuesta pro-inflamatoria, le da un potencial particular a cada una de las toxinas analizadas, ya que si bien, es deseable revertir el efecto polarizante de un patógeno como *M. tuberculosis*, también puede darse el caso en que se produzca una inflamación excesiva que conlleve a daño tisular, por lo que el uso de cada toxina como posible agente terapéutico es una larga ruta aún por recorrer.

CONCLUSIONES

- Al favorecer o reducir la afinidad de una conotoxina con variaciones en la secuencia, cambios en el enlace entre cisteínas y modificaciones post-traduccionales, se observará un diferente patrón de transcripción genética.
- El tratamiento de macrófagos con cal16b_2 y toxinas bloqueadoras de receptores nicotínicos sensibiliza a las células a exhibir una mayor respuesta a un estímulo pro-inflamatorio dependiente de TLR. Esta respuesta no altera la producción de IL-10, lo que potencia la actividad del TLR al interrumpir o retardar los mecanismos de autoinhibición dependientes de IL-10.
- La toxina cal14.1b favorece una polarización a macrófagos tipo 2, al inhibir la transcripción de citocinas pro-inflamatorias sin alterar la transcripción de

citocinas anti-inflamatorias. Este efecto, probablemente esta mediado por la participación de receptores GABA-B presentes en la membrana del macrófago a los que la toxina se une en forma antagónica.

- Como se observó para las toxinas cal16b_1 y cal14.1b, los cambios en la estructura terciaria, generados a partir de modificar el enlace entre cisteínas o sustituir aminoácidos clave para el plegamiento, pueden revertir el efecto inmunosupresor. Esto puede ser debido a que las toxinas cambien su afinidad o se dirijan hacia un blanco molecular diferente.

REFERENCIAS

- Abbas, AK, Lichtman, A.H., Pillai, S., 2010. Celular and molecular immunology. 6ta edición. Saunders Elsevier.
- Aguilar, MB, Pérez-Reyes, LI, López, Z, de la Cotera, EPH, Falcón, A, Ayala, C, Escobar, L I, 2010. Peptide sr11a from *Conus spurius* is a novel peptide blocker for Kv1 potassium channels. *Peptides*, 31, 1287-1291.
- Albuquerque, EX, Pereira, EFR, Alkondon, M, Rogers, S, 2009. Mammalian Nicotinic Acetylcholine Receptors: From Structure to Function. *Physiol Rev.* 89, 73–120.
- Azam, L, & McIntosh, JM, 2009. Alpha-conotoxins as pharmacological probes of nicotinic acetylcholine receptors. *Acta pharmacologica Sinica*, 30, 771-783.
- Azenabor, A, Kennedy, P, York, J, 2009. Free intracellular Ca²⁺ regulates bacterial lipopolysaccharide induction of iNOS in human macrophages. *Immunobiology.* 214, 143–152
- Bagdáany, M, Batista, CV, Valdez-Cruz, NA, Somodi, S, de la Vega, R, Licea, AF, Panyi, G, 2005. Anurotoxin, a new scorpion toxin of the α -KTx 6 subfamily, is highly selective for Kv1. 3 over IKCa1 ion channels of human T lymphocytes. *Molecular pharmacology*, 67, 1034-1044.
- Baldomero–Olivera, M, Teichert, RW, 2007. Diversity of the neurotoxic *conus* peptides. *Molecular interventions.* 7, 251–259.
- Bas A, Forsberg G, Hammarström S, Hammarström ML, 2004. Utility of the housekeeping genes 18S rRNA, beta-actin and glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase for normalization in real-time quantitative

- reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of gene expression in human T lymphocytes. *Scand. J. Immunol.* 59, 566-573.
- Bayrhuber, M, Vijayan, V, Ferber, M, Graf, R, Korukottu, J, Imperial, J, Becker, S, 2005. Conkunitzin-S1 Is the First Member of a New Kunitz-type Neurotoxin Family structural and functional characterization. *JBC.* 280, 23766-23770.
- Becker, S, & Terlau, H, 2008. Toxins from cone snails: properties, applications and biotechnological production. *Applied microbiology and biotechnology*, 79, 1-9.
- Benkhadir, K, Kharrat, R, Cestele, S, Mosbah, A, Rochat, H, El Ayeub, M & Karoui, H, 2004. Molecular cloning and functional expression of the alpha-scorpion toxin BotIII: pivotal role of the C-terminal region for its interaction with voltage-dependent sodium channels. *Peptides*, 25, 151-61
- Bernaldez, J, 2012. Comunicación personal, Tesis en proceso: Aislamiento y caracterización de toxinas de organismos marinos con capacidad inhibitoria del canal mecano sensible de alta conductibilidad (MscL) presente en *Mycobacterium tuberculosis*. Posgrado en Ciencias de la vida. CICESE
- Bernaldez, J, Lopez, O, Licea, A, Salceda, E, Arellano, RO, Vega, R, 2011. Electrophysiological characterization of a novel small peptide from the venom of *Conus californicus* that targets voltage-gated neuronal Ca(2+) channels. *Toxicon.* 57, 60–67.

- Betts, MJ, Russell, RB, 2003. Amino acid properties and consequences of substitutions. In *Bioinformatics for Geneticists*, M.R. Barnes, I.C. Gray eds, Wiley.
- Biggs, JS, Watkins, M, Puillandre, N, Ownby, JP, Lopez-Vera, E, Christensen, S, Moreno, KJ, Navarro, AL, Corneli, PS, Olivera, BM, 2010. Evolution of Conus peptide toxins: analysis of *Conus californicus* Reeve, 1844. *Mol. Phylogenet. Evol.* 56, 1–12.
- Brown, DM, Donaldson, K, Borm, PJ, Schins, RP, Dehnhardt, M, Gilmour, P, Stone, V, 2004. Calcium and ROS-mediated activation of transcription factors and TNF- α cytokine gene expression in macrophages exposed to ultrafine particles. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 286, L344-L353.
- Carmans, S, Jerome, JA, Hendriks, KT, Van den Eynden, J, Stinissen, P, Rigo, M, Hellings, N, 2010. The inhibitory neurotransmitter glycine modulates macrophage activity by activation of neutral amino acid transporters. *Front Mol Neurosci.* 2: 9.
- Chandy, KE, Wulff, H, Beeton, C, Pennington, M, Gutman GA, and Cahalan, MD, 2004. K1 channels as targets for specific immunomodulation. *TRENDS in Pharmacological Sciences.* 25, 280 – 289.
- Changeux, JP, 2010. Nicotine addiction and nicotinic receptors: lessons from genetically modified mice. *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 389-401.
- Chen, Yen-Chou; Shen, Shing-Chuan; Lin, Hui-Yi; Tsai, Shu-Huei; Lee, Tony JF, 2004. Nicotine enhancement of lipopolysaccharide/interferon- γ -

induced cytotoxicity with elevating nitric oxide production. *Toxicology Letters*. 191-200

Chernyavsky, A.I., Arredondo, J., Skok, M., Grando, S.A., 2010. Auto/paracrine control of inflammatory cytokines by acetylcholine in macrophage-like U937 cells through nicotinic receptors. *International Immunopharmacology* 10, 308–315.

Clark, R. J., Fischer, H., Nevin, S. T., Adams, D. J., & Craik, D. J., 2006. The synthesis, structural characterization, and receptor specificity of the α -conotoxin Vc1. 1. *JBC*. 281, 23254-23263.

Cuny, H., de Faoite, A., Huynh, T. G., Yasuda, T., Berecki, G., & Adams, D. J., 2012. γ -Aminobutyric Acid Type B (GABAB) Receptor Expression Is Needed for Inhibition of N-type (Cav2. 2) Calcium Channels by Analgesic α -Conotoxins. *JBC*. 287, 23948-23957.

Daly, N.L., and Craik, D.J., 2009. Critical Review: Structural Studies of Conotoxins. *IUBMB Life*. 61, 144–150.

De Jonge, W.J., Ulloa, L., 2007. The α 7 nicotinic acetylcholine receptor as a pharmacological target for inflammation. *Br J Pharmacol*. 151, 915-29.

Dolmetsch, R.E., Xu, K., Lewis, R.S., 1998. Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. *Nature*. 392, 933-936.

Dowell, C., Olivera, B. M., Garrett, J. E., Staheli, S. T., Watkins, M., Kuryatov, A., ... & McIntosh, J. M. (2003). α -Conotoxin PIA is selective for α 6 subunit-containing nicotinic acetylcholine receptors. *The Journal of neuroscience*. 23, 8445-8452.

- Duthey, B., Hübner, A., Diehl, S., Boehncke, S., Pfeffer, J., & Boehncke, W. H. (2010). Anti-inflammatory effects of the GABAB receptor agonist baclofen in allergic contact dermatitis. *Experimental dermatology*. 19, 661-666.
- 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 novel evolutionary history. *Toxicon*. 57, 311-322.
- Ellison, M., & Olivera, B. M., 2007. α 4/3 conotoxins: phylogenetic distribution, functional properties, and structure–function insights. *The Chemical Record*. 7, 341-353.
- Essack, M., Bajic, V. B., & Archer, J. A., 2012. Conotoxins that confer therapeutic possibilities. *Marine Drugs*. 10, 1244-1265.
- Estrada, G., Restano-Cassulini, R., Ortiz, E., Possani, L. D., & Corzo, G., 2011. Addition of positive charges at the C-terminal peptide region of CsslI, a mammalian scorpion peptide toxin, improves its affinity for sodium channels Nav1.6. *Peptides*. 32, 75-79.
- Fan, C.X., Chen, X.K., Chen Zhang, C., Wang, L., Duan, K., He, L., Cao, Y., Liu, S.Y., Zhong, M., Ulens, C., Tytgat, J., Chen, J.S., Chi, C., Zhou, Z., 2003. A Novel Conotoxin from *Conus betulinus*, k-BtX, Unique in Cysteine Pattern and in Function as a Specific BK Channel Modulator. *JBC*. 278, 12624–12633.

- Ferber, M., Al-Sabi, A., Stocker, M., Olivera, B. M., & Terlau, H., 2004. Identification of a mammalian target of κ M-conotoxin RIIK. *Toxicon*. 43, 915-921.
- Gahring, L. C., & Rogers, S. W., 2005. Neuronal nicotinic acetylcholine receptor expression and function on nonneuronal cells. *The AAPS Journal*. 7, E885-E894.
- 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, 147-161.
- Grant, M. A., Hansson, K., Furie, B. C., Furie, B., Stenflo, J., & Rigby, A. C., 2004. The Metal-free and Calcium-bound Structures of a γ -Carboxyglutamic Acid-containing Contryphan from *Conus marmoreus*, Glacontryphan-M. *JBC*. 279, 32464-32473.
- Haegen, A., Peigneur, S., Dyubankova, N., Möller, C., Marí, F., Diego-García, E., Naudé, R., Lescrinier, E., Herdewijn, P., Tytgat, J., 2012. Pc16a, the first characterized peptide from *Conus pictus* venom, shows a novel disulfide connectivity. *Peptides*. 34, 106-113.
- Halai, R., Craik, D.J., 2009. Conotoxins: natural product drug leads. *Nat. Prod. Rep.* 26, 526-36
- 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, 8331-8340.

- Jacobsen, R. B., Koch, E. D., Lange-Malecki, B., Stocker, M., Verhey, J., Van Wagoner, R. M., Terlau, H., 2000. Single amino acid substitutions in κ -conotoxin PVIIA disrupt interaction with the Shaker K⁺ channel. *JBC*. 275, 24639-24644.
- Jimenez, EC. 2013. Diversity of Conus peptides that target the nicotinic acetylcholine receptors. *Philippine Science Letters*.
- Jin, A.H., Brandstaetter, H., Nevin, S.T., Tan C.C., Clark R.J., Adams, D.J, Alewood, P.F., Craik, D.J., Daly, N.L., 2007. Structure of α -conotoxin Bu1A: influences of disulfide connectivity on structural dynamics. *BMC Struct. Biol.* 7.
- Jin, A.H., Brandstaetter, H., Nevin, S.T., Tan C.C., Clark R.J., Adams, D.J, Alewood, P.F., Craik, D.J., Daly, N.L., 2007. Structure of α -conotoxin Bu1A: influences of disulfide connectivity on structural dynamics. *BMC Struct. Biol.* 7.
- Kaas Q, Yu R, Jin AH, Dutertre S and Craik DJ., 2012. ConoServer: updated content, knowledge, and discovery tools in the conopeptide database. *Nucleic Acids Research*.
- Kang, T.S, Radić, Z., Talley, T.T., Jois, S.D., Taylor, P., Kini, R.M., 2007. Protein folding determinants: structural features determining alternative disulfide pairing in alpha- and chi/lambda-conotoxins. *Biochemistry*. 46, 3338-3355.
- Kaufenstein, S., Huys, I., Lamthanh, H., Stöcklin, R., Sotto, F., Menez, A., ... & Mebs, D., 2003. A novel conotoxin inhibiting vertebrate voltage-sensitive potassium channels. *Toxicon*. 42, 43-52.

- Kaufmann, S. H., 2002. Protection against tuberculosis: cytokines, T cells, and macrophages. *Annals of the rheumatic diseases*. 61, ii54-ii58.
- Kelley, W. P., Schulz, J. R., Jakubowski, J. A., Gilly, W. F., & Sweedler, J. V. 2006. Two toxins from *Conus striatus* that individually induce tetanic paralysis. *Biochemistry*. 45, 14212-14222.
- Koval, L., Lykhmus, O., Zhmak, M., Khrushov, A., Tsetlin, V., Magrini, E., ... & Skok, M., 2011. Differential involvement of $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 7$ and $\alpha 9\alpha 10$ nicotinic acetylcholine receptors in B lymphocyte activation in vitro. *Int J Biochem & Cell Biol*. 43, 516-524.
- Krasznai, Z. 2005. Ion channels in T cells: from molecular pharmacology to therapy. *Arch Immunol Ther Exp*. 53, 127–135
- Lattin, J., Zidar, D. A., Schroder, K., Kellie, S., Hume, D. A., & Sweet, M. J. (2007). G-protein-coupled receptor expression, function, and signaling in macrophages. *Journal of leukocyte biology*. 82, 16-32.
- Lewis, RJ, Garcia, M. 2003. Therapeutic potential of venom peptides. *Nature reviews*. 2, 790–800.
- Li, J., Mathieu, S. L., Harris, R., Ji, J., Anderson, D. J., Malysz, J., ... & Gopalakrishnan, M., 2011. Role of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors in regulating tumor necrosis factor- α (TNF- α) as revealed by subtype selective agonists. *Journal of Neuroimmunology*. 239, 37-43.
- Liu, M., Matsumori, W., 2011. Calcium channel blockers and modulation of innate immunity. *Curr. Opin. Infect. Dis*. 2, 254-258
- Livett, BG, Gayler, KR, Khalil, Z. 2004. Drugs from the sea: conopeptides as potential therapeutics. *Current Medicinal Chemistry*. 11, 1715-1723.

- Loughnan, M. L., Nicke, A., Lawrence, N., & Lewis, R. J., 2009. Novel α D-Conopeptides and Their Precursors Identified by cDNA Cloning Define the D-Conotoxin Superfamily. *Biochemistry*. 48, 3717-3729.
- Masek, T., Vopalensky, V., Suchomelova, P., Pospisek, M., 2005. Denaturing RNA electrophoresis in TAE agarose gels. *Anal. Biochem*. 336, 46–50.
- Matsumori, A., Nishio, R., Nose, Y., 2010. Calcium channel blockers differentially modulate cytokine production by peripheral blood mononuclear cells. *Circ. J*. 74, 567 – 571.
- McIntosh, J. M., Absalom, N., Chebib, M., Elgoyhen, A. B., & Vincler, M., 2009. Alpha9 nicotinic acetylcholine receptors and the treatment of pain. *Biochemical pharmacology*. 78, 693.
- McIntosh, JM, Plazas, PV, Watkins M, Gomez- Casati, ME, Baldomero-Olivera M, Elgoyhen, B., 2005. A novel α -conotoxin, PeIA, cloned from *Conus pergrandis* discriminates between rat α 9 α 10 and α 7 nicotinic cholinergic receptors. *JBC*. 280, 30107-30112.
- Miller, P.S., Smart, T.G., 2009. Binding, activation and modulation of cys-loop receptors. *Trends Pharm. Sci*. 31, 161-174.
- Mosser, D.M., 2003. The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol*. 73, 209-212.
- Naranjo, D., 2002. Inhibition of Single Shaker K Channels by κ - Conotoxin-PVIIA. *Biophysical Journal*. 82, 3003-3011.
- Nau, G. J., Richmond, J. F., Schlesinger, A., Jennings, E. G., Lander, E. S., & Young, R. A., 2002. Human macrophage activation programs induced by bacterial pathogens. *PNAS*. 99, 1503-1508.

- Norton, R. S., & Olivera, B. M., 2006. Conotoxins down under. *Toxicon*. 48, 780-798.
- Olivera, B.M. 2006. Conus peptides: Biodiversity-based discovery and exogenomics. *JBC*. 281, 31173–31177.
- Olivera, B.M., Cruz, L.J., 2001. Conotoxins in retrospect. *Toxicon*. 39, 7 – 14.
- Pavlov, VA, Wang, H, Czura, CJ, Friedman, S, Tracey, K. 2003. The Cholinergic Anti-inflammatory Pathway: A Missing Link in Neuroimmunomodulation. *Molecular Medicine*. 9, 125-134.
- Peng C, Tang S, Pi C, Liu J, Wang F, Wang L, Zhou W, Xu A. 2006. Discovery of a novel class of conotoxin from *Conus litteratus*, It14a, with a unique cysteine pattern. *Peptides* 27, 2174 – 2181.
- Pucci, L., Grazioso, G., Dallanocce, C., Rizzi, L., De Micheli, C., Clementi, F., Bertrand, S., Bertrand, D., Longhi, R., De Amici, M., and Gotti, C., 2011. Engineering of α -conotoxin MII-derived peptides with increased selectivity for native $\alpha 6\beta 2^*$ nicotinic acetylcholine receptors. *FASEB*, 25: 3775-3789
- Reyes-García MG, Hernández-Hernández F, Hernández-Téllez B, García-Tamayo F. 2007. GABA (A) receptor subunits RNA expression in mice peritoneal macrophages modulate their IL-6/IL-12 production. *J Neuroimmunol*. 188, 64-8.
- Rocha-Ramírez, L. M., Estrada-García, I., López-Marín, L. M., Segura-Salinas, E., Méndez-Aragón, P., Van Soolingen, D., Isibasi, A., 2008. Mycobacterium tuberculosis lipids regulate cytokines, TLR-2/4 and MHC class II expression in human macrophages. *Tuberculosis*, 88, 212-220.

- Safavi-Hemami H, Gorasia DG, Steiner AM, Williamson NA, Karas JA, Gajewiak J, Olivera BM, Bulaj G, Purcell AW., 2012. Modulation of conotoxin structure and function is achieved through a multienzyme complex in the venom glands of cone snails. *JBC*. 5,34288-303.
- Sandall, D. W., Satkunanathan, N., Keays, D. A., Polidano, M. A., Liping, X., Pham, V., Gayler, K. R., 2003. A novel α -conotoxin identified by gene sequencing is active in suppressing the vascular response to selective stimulation of sensory nerves in vivo. *Biochemistry*. 42, 6904-6911.
- Schepetkin, I. A., Xie, G., Kirpotina, L. N., Klein, R. A., Jutila, M. A., & Quinn, M. T., 2008. Macrophage immunomodulatory activity of polysaccharides isolated from *Opuntia polyacantha*. *Int. Immunoph.* 8, 1455-1466.
- Schmittgen, T.D., Zakrajsek, B.A., 2000. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *J. Biochem. Biophys. Methods*. 46, 69–8
- Skok, M. V., 2009. Editorial: To channel or not to channel? Functioning of nicotinic acetylcholine receptors in leukocytes. *Journal of leukocyte biology*. 86, 1-3.
- Szabó, C., Haskó, G., Németh, Z.H., Vizi, S., 1997. Calcium entry blockers increase interleukin -10 production in endotoxemia. *Shock*. 7, 304 – 307.
- Tiwari RL, Singh V, Barthwal MK. 2008. Macrophages: an elusive yet emerging therapeutic target of atherosclerosis. *Med Res Rev* 28, 483–544
- Tsetlin, VI, Hucho, F., 2004. Snake and snail toxins acting on nicotinic acetylcholine receptors: fundamental aspects and medical applications. *FEBS Letters*. 557: 9-13.

- Ulloa, L. 2006. How elucidating nicotine's biochemical pathways could lead to more potent anti-inflammatory drugs. *Scientific American*. Web: <http://www.scientificamerican.com/article.cfm?id=body-blazes>
- Ulloa, L., de Jonge WJ, 2007., The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor as a pharmacological target for inflammation. *Br J Pharmacol*. 151, 915-29. Epub 2007
- Vicente R, Escalada A, Coma M, Fuster G, Sánchez-Tilló E, López-Iglesias C, Soler C, Solsona C, Celada A, Felipe A. 2003. Differential voltage-dependent K⁺ channel responses during proliferation and activation in macrophages. *JBC*. 278, 46307-20.
- Vincler M, McIntosh JM., 2007. Targeting the alpha9alpha10 nicotinic acetylcholine receptor to treat severe pain. *Expert Opin Ther Targets*. 11, 891-7.
- Wang H, Yu M, Ochani M, Amella CA, Tanovic M, Susarla S, Li JH, Wang H, Yang H, Ulloa L, Al-Abed Y, Czura CJ, Tracey KJ., 2003. Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature*. 23, 384-8.
- Wang, Y., Zhang, F., Yang, W., & Xue, S., 2012. Nicotine Induces Pro-inflammatory Response in Aortic Vascular Smooth Muscle Cells Through a NFκB/Osteopontin Amplification Loop-Dependent Pathway. *Inflammation*. 35, 342-349.
- Webb, T.I., Lynch, W.J., 2007 Molecular Pharmacology of the Glycine Receptor Chloride Channel. *Curr Pharm Design*.

- Willmott, N.J., Choudhury, Q., Flower, R.J., 1996. Functional importance of the dihydropyridine-sensitive, yet voltage-insensitive store-operated Ca(2+) influx of U937 cells. *FEBS. Lett.* 394, 159 – 164.
- Wright, B., Zeidmann, J., Greig, R., Poste, G., 1985. Inhibition of macrophage activation by calcium channel blockers and calmodulin antagonist. *Cell Immunol.* 95, 46 – 53
- Wulff H, Knaus HG, Pennington M, Chandy KG., 2004. K⁺ channel expression during B-cell differentiation: implications for immunomodulation and autoimmunity. *J Immunol.* 173, 776–786
- Yamaguchi, H., Friedman, H., & Yamamoto, Y., 2003. Involvement of nicotinic acetylcholine receptors in controlling *Chlamydia pneumoniae* growth in epithelial HEp-2 cells. *Infection and immunity.* 71, 3645-3647.
- Yan C., Li, M.C., 2010. Nicotinic Modulation of Innate Immune Pathways Via $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor. *J Neuroimmune Pharmacol.*
- Yanagita M, Kobayashi R, Murakami S., 2009. Nicotine can skew the characterization of the macrophage type-1 (M Φ 1) phenotype differentiated with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to the M Φ 2 phenotype. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 388, 91-95.
- Ye, M., Hong, J., Zhou, M., Huang, J., Shao, X., Yang, Y., 2011. A novel conotoxin qc16a, with a unique cysteine framework and folding. *Peptides.* 32, 1159-1165.
- Zanden, EP, Boeckxstaens, GE, De Jonge, WJ., 2009. The vagus nerve as a modulator of intestinal inflammation. *Neurogastroenterol Motil.* 21, 6–17

Zhu, J., Yamane, H., Paul, W., 2010. Differentiation of Effector CD4 T Cell Populations. *Annu. Rev. Immunol.* 28, 445–89

Zhu, L., Song, S., Pi, Y., Yu, Y., She, W., Ye, H., Su, Y., Hu, Q., 2011. Cumulated Ca²⁺ spike duration underlies Ca²⁺ oscillation frequency-regulated NFκB transcriptional activity. *J. Cell Sci.* 124, 2591-2601.