



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Efecto inmunomodulador de la toxina Vm24 del alacrán *Vaejovis mexicanus* en linfocitos T de memoria efectores CD4⁺

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
Q.F.B. José Ignacio Veytia Bucheli

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Lourival Domingos Possani Postay - Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Yvonne Jane Rosenstein Azoulay - Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México

Dra. Rosa Victoria Pando Robles - Instituto Nacional de Salud Pública

MÉXICO, D. F. Junio 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

COMITÉ TUTOR

¹Dr. Lourival Domingos Possani Postay

¹Dra. Yvonne Jane Rosenstein Azoulay

²Dra. Rosa Victoria Pando Robles

JURADO DE EXAMEN

¹Dra. Claudia Lydia Treviño Santa Cruz

¹Dr. Martín Gustavo Pedraza Alva

¹Dr. Ismael Secundino Velázquez

²Dr. Jesús Martínez Barnetche

³Dr. Fernando Esquivel Guadarrama

¹Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)

²Instituto Nacional de Salud Pública

³Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM)

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Lourival Domingos Possani Postay y la asesoría de la Dra. Yvonne Jane Rosenstein Azoulay y la Dra. Juana María Jiménez Vargas.

Este trabajo se financió parcialmente por los donativos SEP-CONACYT 153496 y DGAPA 200113 concedidos al laboratorio del Dr. Lourival Possani y la beca CONACYT (CVU 515949) otorgada al Q.F.B. José Ignacio Veytia Bucheli.

ÍNDICE

I. RESUMEN.....	4
II. INTRODUCCIÓN.....	5
2.1 Veneno de alacrán.....	5
2.2 Activación de linfocitos T y generación de células de memoria.....	6
2.3 Canales iónicos en la activación de linfocitos T.....	10
III. ANTECEDENTES.....	14
IV. HIPÓTESIS.....	19
V. OBJETIVO GENERAL.....	19
VI. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
VII. METODOLOGÍA.....	20
7.1 Purificación de linfocitos T _{EM} CD4 ⁺	20
7.2 Registro electrofisiológico.....	20
7.3 Estimulación celular y evaluación de la activación y proliferación.....	21
7.4 Cambios en el perfil de secreción de citocinas.....	22
VIII. RESULTADOS.....	23
8.1 Purificación de linfocitos T _{EM} CD4 ⁺	23
8.2 Registro electrofisiológico.....	24
8.3 Estimulación celular y evaluación de la activación y proliferación.....	25
8.4 Cambios en el perfil de secreción de citocinas.....	30
IX. DISCUSIÓN.....	33
X. CONCLUSIONES.....	35
XI. REFERENCIAS.....	36

I. RESUMEN

En enfermedades autoinmunes como la esclerosis múltiple, los linfocitos T autorreactivos exhiben un fenotipo de linfocitos T_{EM} (de memoria efectores). Para la activación, proliferación, secreción de citocinas y migración de los linfocitos T_{EM}, la señalización por calcio es esencial. Los canales de potasio Kv1.3 regulan la señalización por calcio en estas células. Es por ello que bloqueadores selectivos de los canales de potasio Kv1.3, inhiben la activación de los linfocitos T_{EM}. Esto hace de los bloqueadores de canales Kv1.3 potenciales inmunosupresores terapéuticos donde la selectividad es importante para evitar efectos secundarios.

La toxina peptídica Vm24 del alacrán mexicano *Vaejovis mexicanus smithi* es el bloqueador más potente y selectivo de canales Kv1.3 que se conoce en la actualidad.

El objetivo de este trabajo es evaluar el efecto inmunomodulador de la toxina Vm24 en linfocitos T_{EM} CD4⁺ para tener un modelo que permita el estudio de procesos moleculares asociados al bloqueo del canal Kv1.3 en esta población celular.

La toxina Vm24, a concentraciones que bloquean completamente los canales Kv1.3, inhibió parcialmente la activación y la proliferación de linfocitos T_{EM} CD4⁺ estimulados a través del receptor de células T.

Sin embargo, la toxina no tuvo un efecto significativo inhibiendo la activación y proliferación de linfocitos T_{EM} CD4⁺ cuando una señal coestimuladora se aplicó a través de CD28 (500 ng/mL de anti-CD28).

Además, la toxina Vm24 generó un cambio en el perfil de secreción de citocinas de células mononucleares activadas, disminuyendo la secreción de GM-CSF, GRO, IL-5, IL-10 y aumentando aparentemente la de IL-2.

II. INTRODUCCIÓN

2.1 Veneno de alacrán

La generación de toxinas es un rasgo evolutivo adquirido por diversos organismos como mecanismo de defensa y captura de presas. Las toxinas interactúan con macromoléculas biológicas, afectando las funciones esenciales de la célula para sobrevivir y comunicarse con su ambiente [1].

Entre los animales capaces de producir toxinas se encuentran los alacranes. Éstos representan uno de los grupos más antiguos de animales terrestres, pues aparecieron en el planeta hace más de 400 millones de años y en la actualidad se conocen más de 2000 especies, de las cuales alrededor de 250 se encuentran en México [2].

El veneno de alacrán es una mezcla compleja de componentes que incluye sales, lípidos, aminoácidos, nucleótidos, mucopolisacáridos y proteínas que van desde péptidos hasta enzimas de alto peso molecular [3, 4].

Diferentes péptidos en el veneno son los responsables del fenómeno de intoxicación producido por la picadura de alacrán. Estas toxinas interactúan con canales iónicos, modulando las propiedades eléctricas de las membranas celulares [1].

De acuerdo a su especificidad hacia los diferentes tipos de canales iónicos, las toxinas pueden clasificarse en cuatro familias:

- Toxinas de canales de sodio: Modulan la actividad de canales de sodio, inhibiendo el proceso de inactivación del canal o desplazando su umbral de activación hacia potenciales de membrana más negativos. Ejemplos: AaH II de *Androctonus australis* Hector, Lqh II de *Leiurus quinquestriatus hebraeus* y Cn2 de *Centruroides noxius* [5, 6, 7].
- Toxinas de canales de potasio: Bloquean el poro de conducción del canal, evitando el paso de iones a través del mismo. Ejemplos: ChTx de *Leiurus quinquestriatus hebraeus*, noxiustoxina de *Centruroides noxius* y tamapina de *Mesobuthus tamalus* [4, 8, 9].
- Toxinas de canales de calcio: Modulan la actividad de los receptores de rianodina en la membrana del retículo sarcoplásmico/endoplásmico, modificando la liberación de calcio de las reservas intracelulares. Ejemplos: Imperatoxina A de *Pandinus imperator* y maurocalcina de *Scorpio maurus palmatus* [4, 10].
- Toxinas de canales de cloruro: En la actualidad solo se conoce un miembro de esta familia, la clorotoxina de *Leiurus quinquestriatus hebraeus*. Esta toxina inhibe de manera irreversible e indirecta la corriente de canales de cloruro de baja conductancia CIC-3, uniéndose e induciendo la endocitosis del complejo proteico que contiene la metaloproteínasa-2 de matriz y los canales CIC-3 [11, 12].

La mayor parte de estas toxinas moduladoras de canales iónicos presenta un motivo estructural α/β estabilizado por cisteínas (CS- α/β) que consiste en una o dos α -hélices cortas y una hoja- β plegada de dos o tres cadenas unidas por tres o cuatro puentes disulfuro [4, 13].

El presente trabajo se centra en una toxina de alacrán bloqueadora de canales de potasio dependientes de voltaje Kv1.3. Este tipo de péptidos se han estudiado durante los últimos años por su potencial uso como moduladores de la función de linfocitos T [14].

2.2 Activación de linfocitos T y generación de células de memoria

Cuando las células presentadoras de antígeno (CPA), principalmente células dendríticas, capturan un antígeno, éste se transporta a los órganos linfoides secundarios como los ganglios linfáticos o el bazo, en donde los linfocitos T específicos para ese antígeno lo reconocen y se activan. Tras activarse, los linfocitos T vírgenes ($CD45RA^+$) proliferan y se diferencian en linfocitos efectores o de memoria (Figura 1) [15].

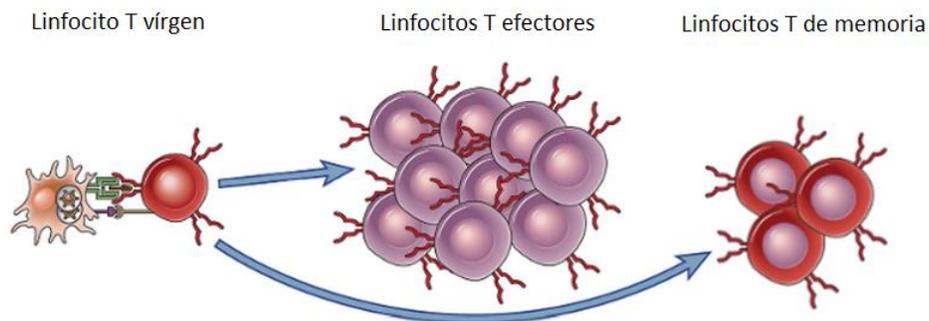


Figura 1. Diferenciación de linfocitos T vírgenes. En respuesta al antígeno y la coestimulación por parte de las CPA, los linfocitos T vírgenes se diferencian en células efectores y de memoria. Modificado de [15].

Los linfocitos efectores son capaces de migrar a focos infecciosos o inflamatorios, donde encuentran al antígeno y lo erradican (Figura 2). Una vez eliminado el antígeno, la mayoría de los linfocitos T efectores mueren por apoptosis. Sin embargo, una parte de los linfocitos T específicos para el antígeno permanecen como linfocitos T de memoria ($CD45RO^+$) y se alojan en médula ósea, órganos periféricos y circulación por largo tiempo. Conforme aumenta la edad su proporción incrementa, de forma que más de la mitad de los linfocitos T maduros en un adulto son de memoria [15].

Estas poblaciones de linfocitos de memoria están listas para responder a una futura exposición al antígeno de manera más rápida e intensa. Además, los requerimientos para la activación de las células de memoria son menos estrictos, presentando una sensibilidad aumentada a la estimulación a través del receptor de células T (RCT) tanto en presencia como en ausencia de coestimulación [15, 16, 17].

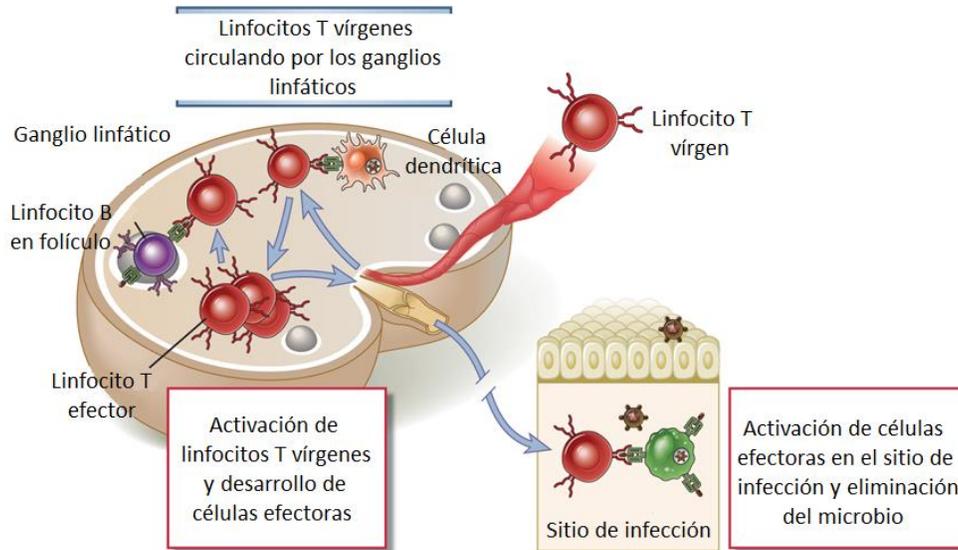


Figura 2. Activación de los linfocitos T vírgenes y efectoras. Los linfocitos T vírgenes en los órganos linfoides secundarios reconocen antígenos que transportan las células dendríticas. Los linfocitos T vírgenes se activan para diferenciarse en células efectoras y de memoria, que pueden permanecer en los órganos linfoides secundarios y activar linfocitos B o migrar a los tejidos periféricos. En los sitios de infección, las células efectoras se activan por los antígenos y los erradican. Modificado de [15].

Los linfocitos T de memoria son heterogéneos en su capacidad funcional y de migración, y pueden distinguirse dos subgrupos en base a la expresión del receptor de quimiocinas CCR7 (Tabla 1) [15, 16, 17].

Tabla 1. Marcadores fenotípicos de superficie de linfocitos T vírgenes, de memoria central (T_{CM}) y de memoria efectoras (T_{EM}).

Marcador	Linfocitos T vírgenes	Linfocitos T_{CM}	Linfocitos T_{EM}
CD45RA	+	-	-
CD45RO	-	+	+
CCR7	+	+	-

- Linfocitos T_{CM} : Al igual que los linfocitos T vírgenes, expresan CCR7, por lo que migran preferentemente a los órganos linfoides secundarios en donde se producen constitutivamente las quimiocinas CCL19 y CCL21 que son ligandos de este receptor. Esta subpoblación de células de memoria produce cantidades muy limitadas de citocinas

efectoras como $\text{IFN}\gamma$ e interleucina 4 (IL-4) tras su activación; sin embargo, proliferan rápidamente ante la exposición al antígeno y pueden diferenciarse en linfocitos de memoria efectoras (T_{EM}). Además, estimulan de manera muy eficiente a células dendríticas y linfocitos B en los ganglios linfáticos [16, 17].

- Linfocitos T_{EM} : No expresan CCR7, pero sí receptores para quimiocinas inflamatorias (CCR1, CCR3, CCR5), por lo que migran preferentemente a los focos infecciosos o inflamatorios sin necesidad de ser previamente activados en los órganos linfoides secundarios. Eliminan eficientemente al antígeno, pues producen y liberan rápidamente moléculas efectoras como $\text{IFN}\gamma$, IL-4 y perforina (Figura 3) [16, 17].

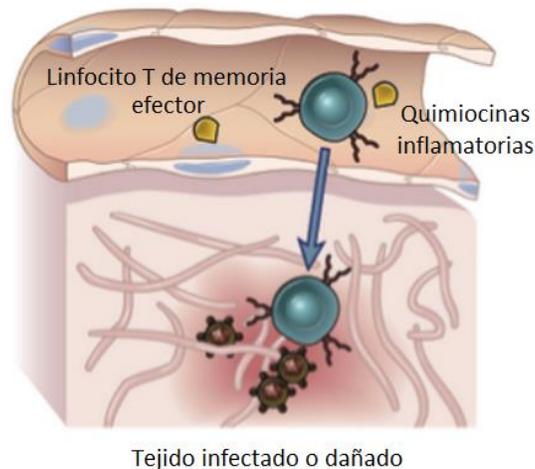


Figura 3. Activación de linfocitos T_{EM} . Los linfocitos T_{EM} expresan receptores para quimiocinas inflamatorias, por lo que migran preferentemente a los focos infecciosos o inflamatorios y eliminan eficientemente al antígeno, pues producen y liberan rápidamente moléculas efectoras. Modificado de [15].

En ciertas enfermedades autoinmunes como esclerosis múltiple, diabetes mellitus tipo I y artritis reumatoide, las células autorreactivas encontradas en las lesiones exhiben un fenotipo de linfocitos T_{EM} [14, 18, 19].

Las enfermedades autoinmunes se caracterizan por la generación de una respuesta inmune contra antígenos propios, afectando diversos órganos y tejidos como articulaciones, sistema nervioso central, glándulas endócrinas, riñones y piel, pudiendo ser mediadas por anticuerpos, complejos inmunes, linfocitos T o una combinación de ellos [15].

En el grupo de las enfermedades autoinmunes mediadas por linfocitos T autorreactivos, los linfocitos T $CD4^+$ y los linfocitos T $CD8^+$ secretan quimiocinas inflamatorias que reclutan células de la inmunidad innata y citocinas como el interferón γ ($\text{IFN}\gamma$) que activa macrófagos y el factor de necrosis tumoral (TNF) que induce inflamación. Los macrófagos activados liberan enzimas hidrolíticas, intermediarios reactivos de oxígeno y citocinas proinflamatorias que lesionan los

tejidos (Figura 4A). Además en algunos casos, los linfocitos T citotóxicos $CD8^+$ destruyen directamente las células diana que portan antígenos propios (Figura 4B) [15, 20].

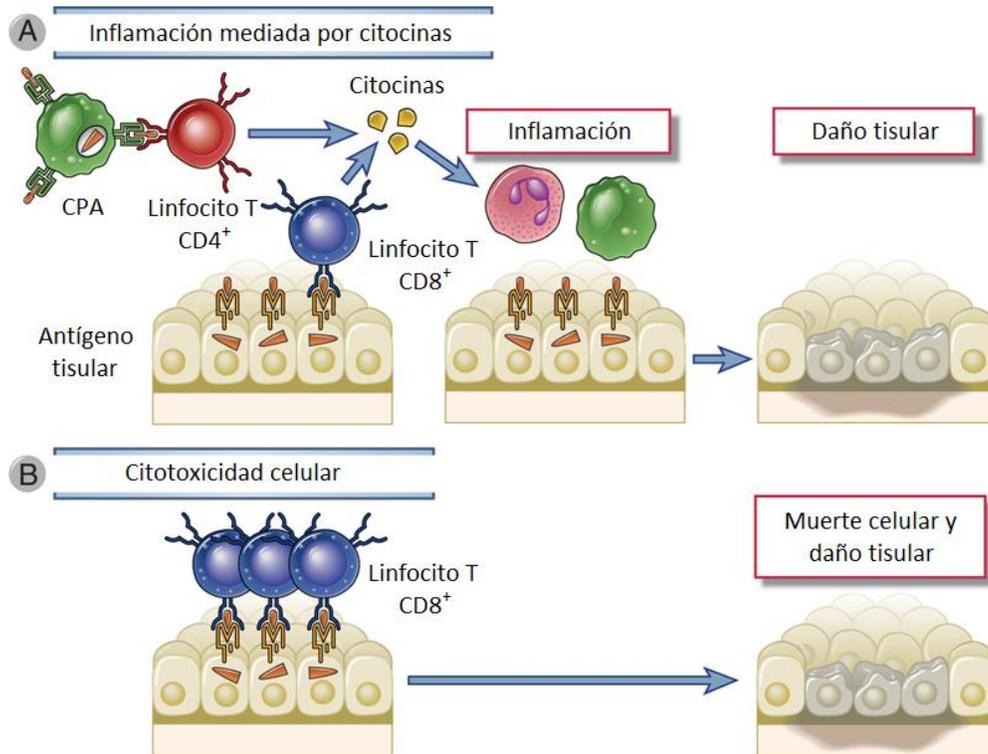


Figura 4. Mecanismos de las enfermedades autoinmunes mediadas por linfocitos T autorreactivos. A) Los linfocitos T $CD4^+$ y los linfocitos T $CD8^+$ secretan quimiocinas inflamatorias que reclutan células de la inmunidad innata y citocinas que activan macrófagos e inducen inflamación. Los macrófagos activados liberan enzimas hidrolíticas, intermediarios reactivos de oxígeno y citocinas proinflamatorias que lesionan los tejidos. B) Los linfocitos T citotóxicos $CD8^+$ destruyen directamente las células diana que portan antígenos propios. Modificado de [15].

Es por ello que estrategias que supriman de manera específica la activación y proliferación de los linfocitos T_{EM} sin comprometer la función de otras poblaciones de linfocitos T (linfocitos T vírgenes y linfocitos T_{CM}), serían de gran valor en el tratamiento de las enfermedades autoinmunes, ya que los tratamientos actuales son mucho más radicales e inespecíficos y suprimen casi por completo la respuesta inmune protectora [18].

2.3 Canales iónicos en la activación de linfocitos T

Los canales iónicos juegan un papel fundamental en la señalización por calcio en linfocitos T, la cual es necesaria para el proceso de activación, síntesis y secreción de citocinas, migración, diferenciación y proliferación [20].

Al inicio de la activación del linfocito T, el reconocimiento del antígeno por el receptor de células T (RCT), produce una agrupación en la membrana plasmática del complejo RCT con los correceptores CD4 o CD8. A continuación, la cinasa Lck asociada a los correceptores se activa y fosforila tirosinas presentes en los dominios intracelulares de las cadenas CD3 y ζ que forman parte del complejo RCT. Posteriormente, la cinasa ZAP-70 se recluta del citosol a la membrana plasmática y se une a fosfotirosinas en las cadenas ζ del complejo RCT. ZAP-70 se fosforila entonces por Lck y una vez activa, fosforila tirosinas en varias moléculas adaptadoras como LAT. Estas proteínas adaptadoras se convierten en sitios de acoplamiento de enzimas citosólicas como la fosfolipasa $Cy1$ (PLC γ 1) (Figura 5) [15].

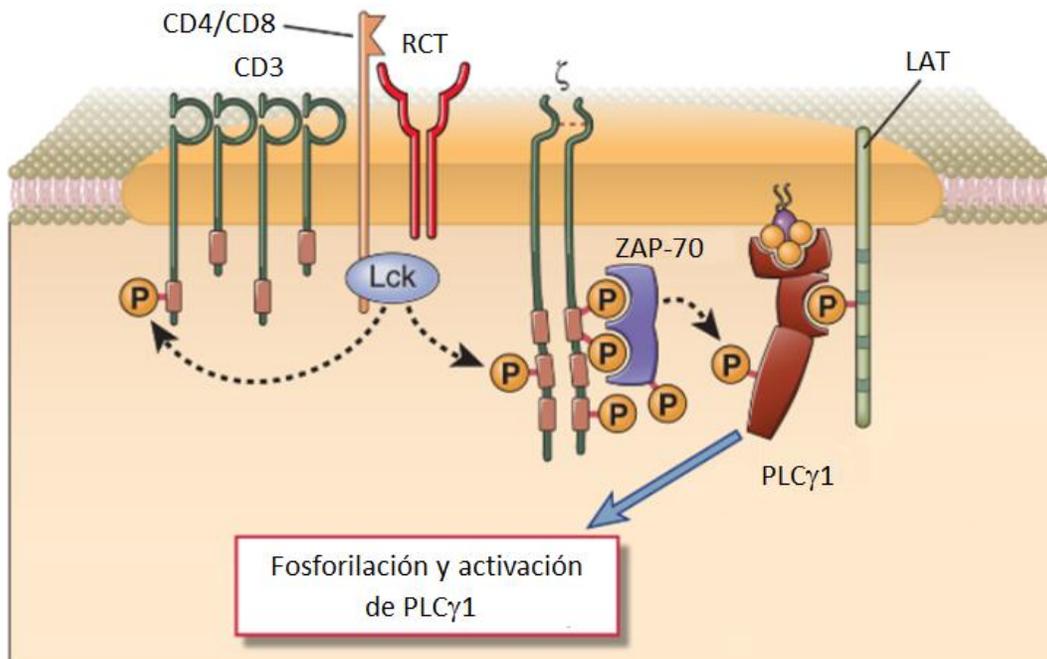


Figura 5. Fosforilaciones tempranas durante la activación de linfocitos T. Cuando se reconoce el antígeno por el RCT, la cinasa Lck asociada a los correceptores (CD4/CD8) se activa y fosforila tirosinas en los dominios intracelulares de las cadenas CD3 y ζ del complejo RCT. Posteriormente, la cinasa ZAP-70 se recluta del citosol a la membrana plasmática y se une a fosfotirosinas en las cadenas ζ del complejo RCT. Lck fosforila a ZAP-70 y una vez activa, fosforila tirosinas en varias moléculas adaptadoras como LAT. Estas proteínas adaptadoras se convierten en sitios de acoplamiento de enzimas citosólicas como la PLC γ 1. Modificado de [15].

La PLC γ 1, enzima específica de fosfolípidos inositolícos, se fosforila por ZAP-70 y una vez activa cataliza la hidrólisis del fosfolípido de membrana fosfatidil inositol-4,5-bisfosfato (PtdIns(4,5)P $_2$) y genera inositol-1,4,5-trisfosfato (InsP $_3$) y diacilglicerol (DAG) [15].

El InsP $_3$ difunde en el citosol y se une a su receptor (InsP $_3$ R) en el retículo endoplásmico, estimulando la liberación de calcio de los depósitos intracelulares. El agotamiento de calcio en el retículo endoplásmico es detectada por la proteína STIM1 que se agrupa debajo de la membrana plasmática, interactuando y generando la apertura de los canales iónicos ORAI1 que permiten el influjo de calcio extracelular. De esta manera se genera en unos pocos minutos un aumento de calcio libre citosólico desde un nivel basal de 100 nM hasta aproximadamente 1 μ M [15].

El calcio libre actúa como una molécula de señalización al unirse a la proteína calmodulina. El complejo calcio-calmodulina, activa la serina/treonina fosfatasa calcineurina. La calcineurina activada desfosforila factores de transcripción de la familia NFAT en el citoplasma, lo que descubre un sitio de localización nuclear y permite su translocación al núcleo, en donde se unen a secuencias específicas en los promotores de distintos genes, frecuentemente asociados con otros factores de transcripción como AP-1 y estimulan la expresión de citocinas efectoras como IL-2, IL-4 y TNF [15, 21, 22].

Los canales de potasio son fundamentales en este proceso de activación pues mediante el eflujo catiónico generan el potencial electroquímico requerido para promover la entrada de calcio. Los canales de potasio son el grupo de canales iónicos más numeroso y diverso. Éstos se clasifican en canales regulados por voltaje (Kv), activados por calcio (KCa), rectificadores entrantes (KIR) y canales con dos dominios de poro (K2P). En los linfocitos T, el canal de potasio regulado por voltaje Kv1.3 y el canal de potasio activado por calcio KCa3.1, junto con el canal de calcio ORAI1 se agrupan en el sitio de la sinapsis inmunológica durante la presentación del antígeno. Estos canales de potasio regulan el potencial de membrana y si se bloquean, se inhibe la entrada de calcio y por consecuencia hay una reducción en la activación de los linfocitos T (Figura 6) [14, 22, 23].

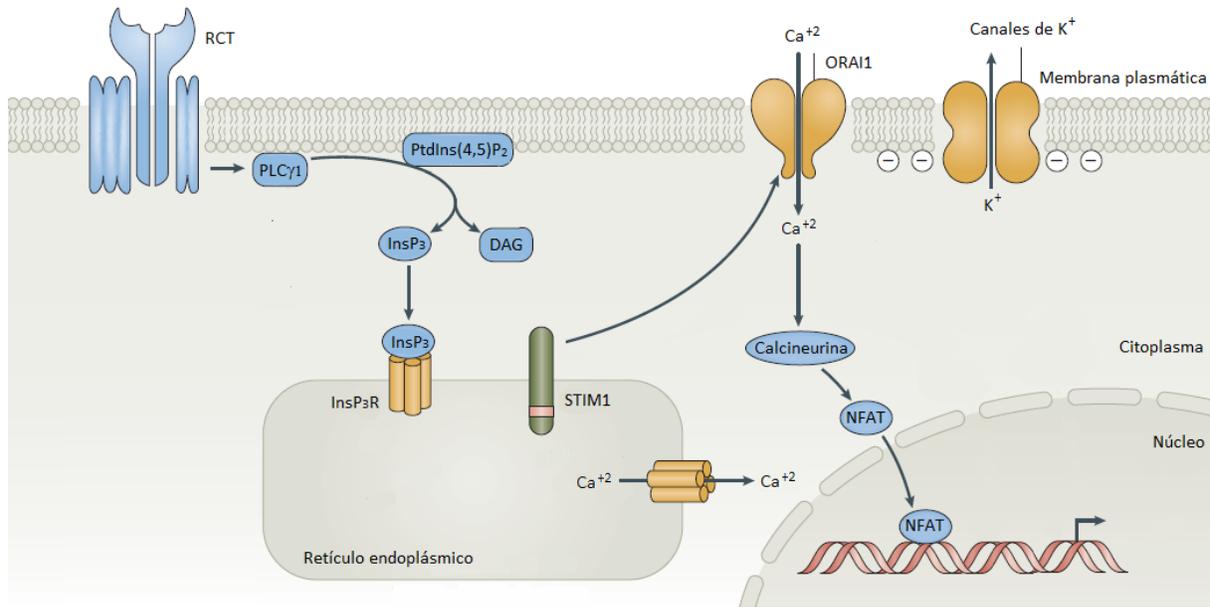


Figura 6. Señalización mediada por calcio en linfocitos T. Cuando los linfocitos T reconocen un antígeno a través del RCT, la enzima PLC γ 1 se activa e hidroliza el fosfolípido de membrana PtdIns(4,5)P $_2$ y genera InsP $_3$ y DAG. El InsP $_3$ difunde en el citosol y se une su receptor InsP $_3$ R en el retículo endoplásmico, estimulando la liberación de calcio de los depósitos intracelulares. El agotamiento de calcio de las pozas internas se detecta por la proteína STIM1, que interactúa con los canales iónicos ORAI1 en la membrana plasmática, generando su apertura y permitiendo el influjo de calcio extracelular. El calcio libre se une a la proteína calmodulina y el complejo calcio-calmodulina activa la enzima calcineurina que desfosforila factores de transcripción de la familia NFAT, lo que permite su translocación al núcleo, y estimulan la expresión de citocinas efectoras. Los canales de potasio son fundamentales en este proceso, pues mediante el eflujo catiónico generan el potencial electroquímico requerido para promover la entrada de calcio. Modificado de [21].

Las distintas poblaciones de linfocitos T expresan de manera diferencial estas clases de canales de potasio. Los linfocitos T en reposo expresan aproximadamente 250 canales Kv1.3 y 5–35 canales KCa3.1 en su membrana plasmática. Tras la activación de linfocitos T vírgenes y linfocitos T $_{CM}$, la expresión del canal KCa3.1 aumenta, mientras que el número de canales Kv1.3 permanece casi constante. En contraste, tras la activación de linfocitos T $_{EM}$, la expresión del canal Kv1.3 aumenta de manera importante, casi sin modificarse el número de canales KCa3.1 (Figura 7). Así, en los linfocitos T vírgenes y T $_{CM}$ activados, el canal de potasio KCa3.1 es el principal encargado de regular el potencial de membrana, mientras que en linfocitos T $_{EM}$ el canal Kv1.3 juega este papel [14, 16, 20].

Es por ello que bloqueadores específicos de los canales Kv1.3, causan una supresión persistente en las células T $_{EM}$, mientras que otras clases de linfocitos T escapan a ésta. Esto hace de los

bloqueadores de canales de potasio Kv1.3 potenciales inmunosupresores terapéuticos donde la selectividad es importante para evitar efectos secundarios no deseados [14, 20, 22, 24].

Por esta razón, es importante la comprensión los eventos moleculares involucrados en la activación y proliferación de los linfocitos T para entender el mecanismo de estas enfermedades y desarrollar tratamientos más efectivos para combatirlos [18].

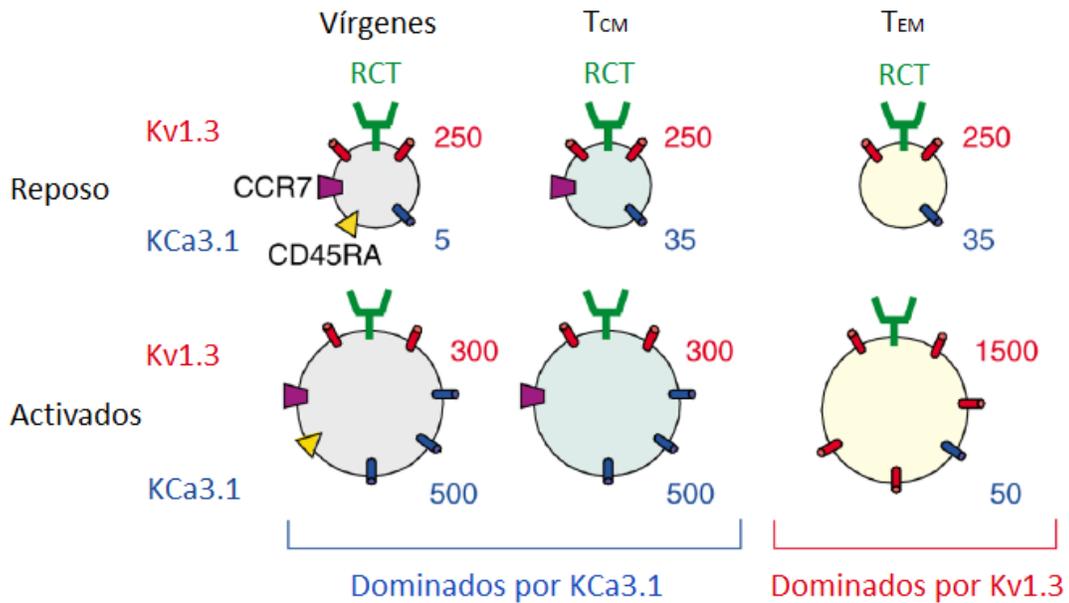


Figura 7. Expresión diferencial de los canales de potasio Kv1.3 y KCa3.1 en linfocitos T en reposo y linfocitos T activados. Los linfocitos T en reposo expresan alrededor de 250 canales Kv1.3 y 5–35 canales KCa3.1 en su membrana plasmática. Tras la activación de linfocitos T vírgenes y linfocitos T_{CM}, la expresión del canal KCa3.1 aumenta, mientras que el número de canales Kv1.3 permanece casi constante. En contraste, tras la activación de linfocitos T_{EM}, la expresión del canal Kv1.3 aumenta de manera importante, casi sin modificarse el número de canales KCa3.1. Así, en los linfocitos T vírgenes y T_{CM} activados, el canal de potasio KCa3.1 es el principal encargado de regular el potencial de membrana, mientras que en linfocitos T_{EM} el canal Kv1.3 juega este papel. Las proteínas de membrana CCR7 y CD45RA pueden utilizarse para distinguir las distintas poblaciones de linfocitos T. Modificado de [14].

III. ANTECEDENTES

Existen diversas toxinas de animales que presentan una alta afinidad por los canales de potasio dependientes de voltaje Kv1.3. Dentro de las toxinas identificadas en este grupo se incluyen algunas toxinas de alacrán (margatoxina de *Centruroides margaritatus*, noxiustoxina de *Centruroides noxius*, kaliotoxina de *Androctonus mauretanicus mauretanicus*, caribdotoxina de *Leiurus quinquestriatus hebraeus* entre otras) y la toxina ShK, aislada de la anémona del mar Caribe *Stichodactyla helianthus*. Sin embargo, algunos canales de potasio importantes para la actividad de neuronas y células musculares (Kv1.1, Kv1.2, Kv1.6, Kv1.7, etc) también se bloquean por estas toxinas [22, 24].

En los últimos años, se han estudiado la toxina ShK y sus derivados generados por síntesis química debido a su potencial uso como inmunomoduladores. La toxina ShK nativa es un péptido de 35 aminoácidos, estabilizado por tres puentes disulfuro (Figura 8) [14, 20].

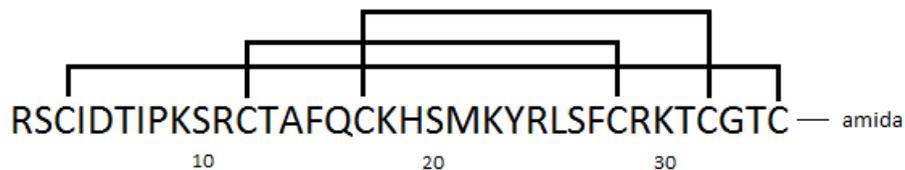


Figura 8. Secuencia de aminoácidos de la toxina ShK. Se indican los puentes disulfuro entre cisteínas. Secuencia tomada de [20].

Esta toxina bloquea el canal Kv1.3 a concentraciones picomolares ($K_d = 10$ pM). Sin embargo es poco selectiva, pues bloquea también los canales Kv1.1 ($K_d = 28$ pM) y Kv1.6 ($K_d = 200$ pM) a bajas concentraciones. La administración de la toxina en ratones por vía intraperitoneal induce hipersensibilidad al sonido y a la presión, salivación, lagrimeo, sudoración, pérdida de la coordinación motora, parálisis y muerte. Por esta razón se ha hecho un esfuerzo por encontrar bloqueadores más selectivos del canal Kv1.3 [20].

Entre la gran cantidad de derivados de la toxina ShK generados por síntesis química, resalta el compuesto ShK-186. Éste tiene una L-fosfotirosina enlazada a través de un grupo aminoetiloxietiloxiacetil al nitrógeno α -amino terminal de la toxina ShK. Además, su extremo carboxilo terminal se encuentra amidado, protegiéndolo de la degradación por carboxipeptidasas. Este derivado bloquea el canal Kv1.3 a concentraciones picomolares ($K_d = 69$ pM) y es por lo menos 100 veces más selectivo hacia el canal Kv1.3 que hacia otros canales de potasio [20].

En ensayos *in vitro*, el derivado ShK-186 es más efectivo suprimiendo la proliferación (incorporación de [3 H]timidina) y la producción de IL-2 e IFN γ en linfocitos T_{EM} que en linfocitos T vírgenes y T_{CM} (Figura 9) [20].

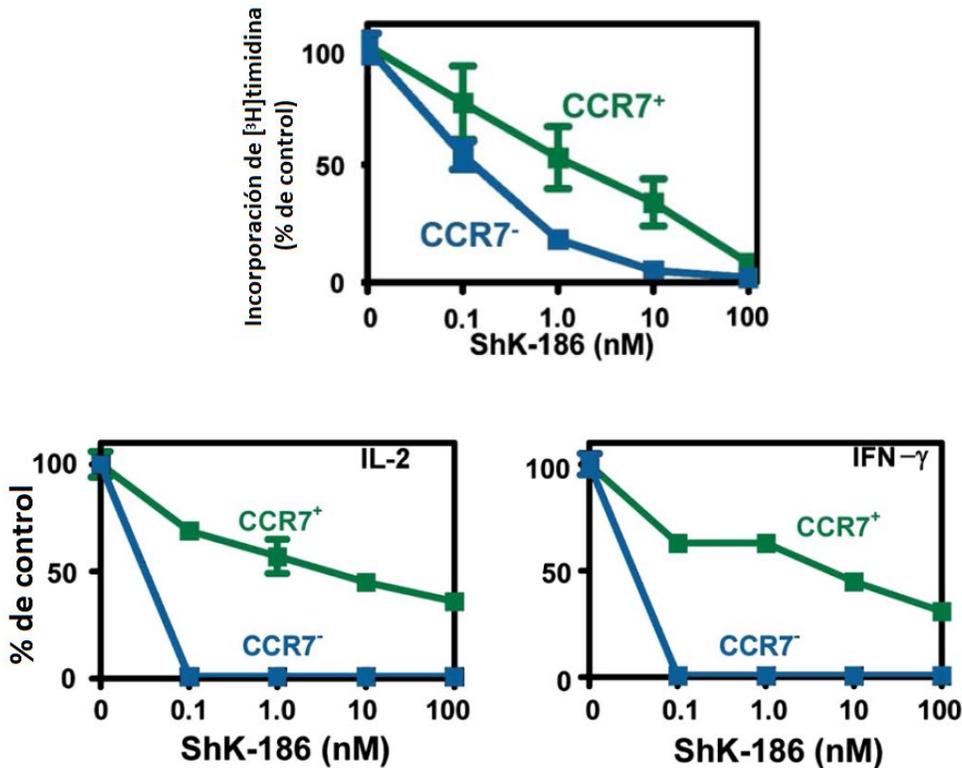


Figura 9. Efecto del compuesto ShK-186 en la proliferación (incorporación de [³H]timidina) y la producción de IL-2 e IFN γ en linfocitos T_{EM} (CCR7⁻) y en linfocitos T vírgenes y T_{CM} (CCR7⁺) activados con un anticuerpo monoclonal anti-CD3. Se observa una mayor sensibilidad de los linfocitos T_{EM} hacia la toxina. Modificado de [20].

Además, se ha demostrado en estudios *in vivo* en ratas que el compuesto ShK-186 reduce la severidad de reacciones de hipersensibilidad retardada, encefalomiелitis autoinmune experimental, artritis inducida por pristano y dermatitis por contacto [20].

Recientemente en el laboratorio del Dr. Lourival Possani se llevó a cabo el análisis proteómico de más de 200 péptidos del veneno del alacrán *Vaejovis mexicanus smithi*, una especie nativa del estado de Morelos (México) y que no es peligrosa para el ser humano.

En este análisis se identificó la toxina de canales de potasio Vm24, péptido de 36 aminoácidos con una masa molecular de 3864 Da. El análisis de su secuencia de aminoácidos identificó a la Vm24 como el primer miembro de una nueva subfamilia de toxinas bloqueadoras de canales de potasio [25, 26].

Este péptido, al igual que la toxina ShK y otras toxinas de alacrán, presenta su extremo carboxilo terminal amidado (Figura 10) [20].



Figura 10. Secuencia de aminoácidos de la toxina Vm24. Se indican los puentes disulfuro entre cisteínas. Modificado de [25].

En cuanto a su estructura tridimensional, la toxina Vm24 presenta un motivo estructural CS- α/β formado por una α -hélice corta unida por cuatro puentes disulfuro a una hoja- β plegada de tres cadenas antiparalelas (Figura 11) [4, 25].

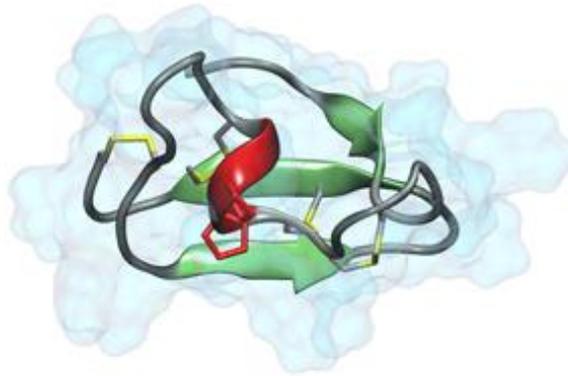


Figura 11. Estructura tridimensional de la toxina Vm24. Los puentes disulfuro se muestran en amarillo, la hélice- α en rojo, las cadenas- β en verde, y el mapa de potencial electrostático en azul. Tomado de [25].

El estudio de la toxina Vm24 sobre los canales de potasio Kv1.3 expresados en linfocitos T, mostró una inhibición completa de la corriente, con una afinidad de la toxina por el canal (K_d) de 2.9 μ M (Figura 12) [24].

Se sabe que las toxinas animales bloqueadoras de canales de potasio, interactúan con los canales Kv1.x, KCa1.1, y KCa3.1 con un farmacóforo denominado “diada funcional”, formado por una lisina bloqueadora (que interactúa con residuos ácidos del filtro de selectividad del canal) y un residuo aromático localizado aproximadamente a 7 Å de la lisina. La estructura tridimensional de la toxina Vm24 muestra un arreglo de este tipo, con la lisina 25 y la tirosina 34 situadas a una distancia de 6 Å, por lo que se cree que la interacción con el canal Kv1.3 se da de esta manera [25].

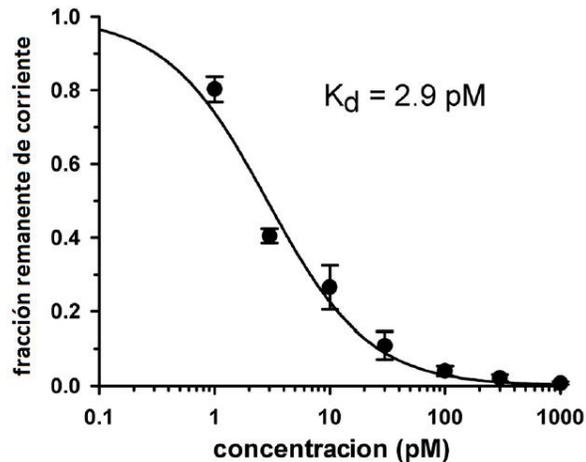


Figura 12. Curva dosis-respuesta del bloqueo de canales Kv1.3 por la toxina Vm24. Las mediciones se realizaron mediante patch clamp en su modalidad de célula completa. La curva se obtuvo graficando la fracción remanente de corriente en función de la concentración de la toxina. Se determinó una constante de disociación (K_d) del complejo canal-toxina de 2.9 pM. Modificada de [24].

Esta toxina es por lo menos 1500 veces más selectiva hacia el canal Kv1.3 que hacia otros canales de potasio (orden de selectividad: Kv1.3 \gg Kv1.2 > KCa3.1 > Kv1.1 \gg Kv1.4 \approx Kv1.5 \approx Kv2.1 \approx Kv11.1 \approx KCa1.1 \approx KCa2.3 \approx Nav1.5) (Figura 13) [24].

Entre los péptidos bloqueadores de canales Kv1.3, tanto naturales como sus variantes generadas por ingeniería genética y síntesis química, la toxina Vm24 es el péptido más potente y selectivo hacia este canal que se conoce en la actualidad [14, 24].

En ensayos *in vitro*, se demostró la función inmunomoduladora de la toxina Vm24, que es capaz de inhibir la señalización celular mediada por calcio y la proliferación y activación de linfocitos T a concentraciones que bloquean el canal Kv1.3 [24].

Finalmente, en ensayos *in vivo* en ratas se observó que la toxina Vm24 reduce las reacciones de hipersensibilidad retardada mediadas por linfocitos T_{EM}. Todas estas propiedades farmacológicas hacen a la Vm24 un buen candidato para el tratamiento de ciertas enfermedades autoinmunes [24].

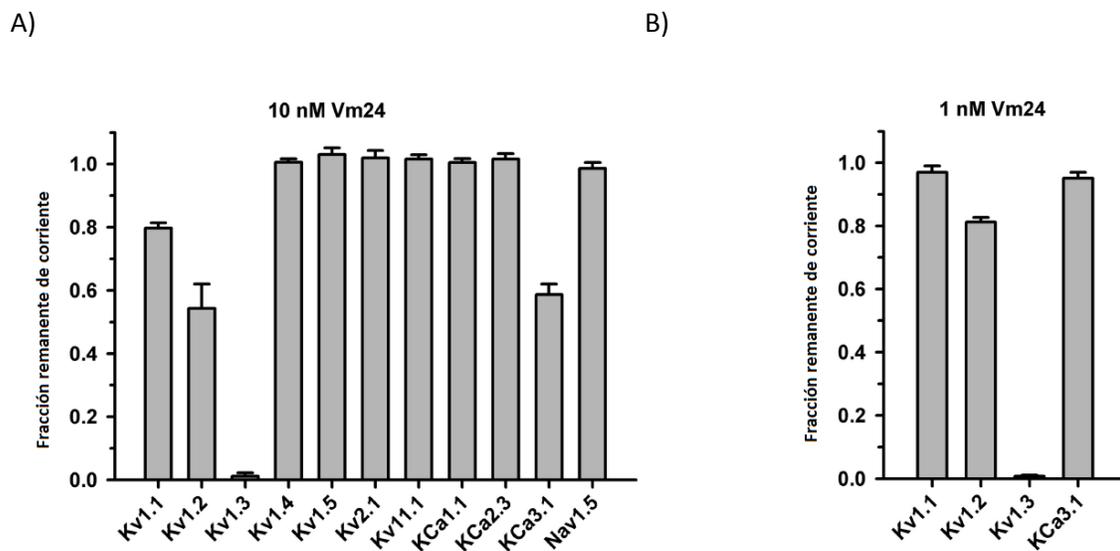


Figura 13. Selectividad de la toxina Vm24 por el canal Kv1.3. A) Se muestra la fracción de corriente remanente de distintos canales iónicos perfundidos con una concentración de 10 nM de Vm24. B) Los canales parcialmente bloqueados a la concentración de 10 nM, se ensayaron a una concentración de 1 nM de la toxina, viéndose solo bloqueado totalmente el canal Kv1.3. Reproducido de [24].

IV. HIPÓTESIS

La toxina Vm24 bloqueará de manera potente y selectiva los canales de potasio Kv1.3, importantes para la señalización por calcio en linfocitos T_{EM}, disminuyendo así su activación y proliferación.

V. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto inmunomodulador de la toxina Vm24 en linfocitos T_{EM} CD4⁺ para tener un modelo que permita el estudio de procesos moleculares asociados al bloqueo del canal Kv1.3 en esta población celular.

VI. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar el efecto de la toxina Vm24 sobre la corriente de los canales de Kv1.3 de linfocitos T_{EM} CD4⁺.
2. Evaluar el efecto de la toxina Vm24 en la activación de linfocitos T_{EM} CD4⁺.
3. Evaluar el efecto de la toxina Vm24 en la proliferación de linfocitos T_{EM} CD4⁺.

VII. METODOLOGÍA

7.1 Purificación de linfocitos T_{EM} CD4⁺

Se obtuvieron concentrados leucocitarios de donadores sanos del Centro Estatal de la Transfusión Sanguínea del estado de Morelos. Este procedimiento fue aprobado por el Comité de Bioética del Instituto de Biotecnología.

Las células mononucleares se separaron por centrifugación en un gradiente de densidad en Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare Life Sciences). Las células obtenidas se lavaron tres veces con PBS y se resuspendieron en medio RPMI-1640 suplementado (adicionado con 10% de suero fetal bovino, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomycin y 2 mM de L-glutamina). Las células se incubaron en placas de poliestireno de 100 mm (8 x 10⁷ células/placa) a 37 °C en 5% de CO₂ durante la noche para promover la adhesión de monocitos, plaquetas y células dendríticas.

Las células no adherentes (enriquecidas en linfocitos) se recuperaron y resuspendieron en medio de arresto celular (RPMI-1640 adicionado con 2% de suero fetal bovino, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomycin y 2 mM de L-glutamina) y se incubaron a 37 °C en 5% de CO₂ durante 24 horas. Estas células pueden utilizarse directamente para ensayos de activación y proliferación o para llevar a cabo la purificación de linfocitos T_{EM} CD4⁺.

La purificación de linfocitos T_{EM} CD4⁺ se realizó por separación magnética (selección negativa) a partir de las células mononucleares obtenidas. Se utilizó el CD4⁺ Effector Memory T Cell Isolation Kit, human (MACS Miltenyi Biotec).

Las células no T_{EM} CD4⁺ se marcaron con un coctel de anticuerpos monoclonales (anti-CD8, CD14, CD15, CD16, CD19, CD34, CD36, CD45RA, CD56, CD123, CD235a, RCTγ/δ, CCR7) conjugados con biotina o alofocianina (APC).

Posteriormente se incubó la preparación con anticuerpos secundarios antibiotina y anti-APC conjugados con microperlas magnéticas. La suspensión celular se transfirió a una columna LD (MACS Miltenyi Biotec) colocada en un imán permanente MidiMACS Separator (MACS Miltenyi Biotec) en donde las células marcadas se retuvieron. Los linfocitos T_{EM} CD4⁺ no marcados se recuperaron por elución y su pureza se determinó por citometría de flujo con los anticuerpos de ratón anti-CD3 humano-PE (Caltag), anti-CD4 humano-TC (Invitrogen), anti-CD45RO humano-PE y anti-CD197 (CCR7) humano-APC (BioLegend).

7.2 Registro electrofisiológico

El bloqueo de los canales de potasio Kv1.3 por la toxina Vm24 se evaluó en linfocitos T_{EM} CD4⁺ purificados. Los registros de corriente de célula completa se efectuaron mediante patch clamp en la modalidad de fijación de voltaje.

La solución de baño para los ensayos contiene 145 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 1 mM de MgCl₂, 2.5 mM de CaCl₂, 5.5 mM de glucosa y 10 mM de HEPES (pH 7.35).

La solución de llenado de electrodo contiene 140 mM de KF, 2 mM de MgCl₂, 1 mM de CaCl₂, 10 mM de HEPES y 11 mM EGTA (pH 7.22).

El experimento se realizó por triplicado. Para el registro de corriente de los canales Kv1.3, se aplicó un pulso despolarizante de +50 mV durante 15 milisegundos, desde un potencial de mantenimiento de -120 mV. El protocolo se repite cada 15 segundos. La toxina Vm24 se perfundió a los linfocitos T_{EM} CD4⁺ a una concentración de 1 nM.

7.3 Estimulación celular y evaluación de la activación y proliferación

Estos ensayos se realizaron con células mononucleares no adherentes, analizando las poblaciones celulares de interés marcadas con anticuerpos específicos y con linfocitos T_{EM} CD4⁺ purificados. Las réplicas se realizaron en todos los casos con células de al menos tres donadores sanos.

La activación de las células se evaluó con la expresión del marcador de superficie CD25 (cadena alfa del receptor de IL-2) tras 24 horas de estimulación. Para esto, se utilizó un anticuerpo de ratón anti-CD25 humano-Alexa Fluor 700 (BioLegend).

La proliferación celular se evaluó con el ensayo de dilución de CFSE (carboxifluoresceína succinimidil éster), 120 horas después de la estimulación. Las células (2 – 20 x 10⁶ células/mL) se marcaron antes de la estimulación con CFSE en la oscuridad por 10 minutos a 37 °C y se lavaron con RPMI-1640 suplementado para eliminar el exceso de colorante antes de cultivarse.

Las células utilizadas para los ensayos se resuspendieron en medio RPMI-1640 suplementado y se colocaron en placas de poliestireno de 48 pozos a una densidad de 500,000 células/mL y se incubaron a 37 °C en 5% de CO₂ por los tiempos indicados.

Para la activación de los linfocitos T se utilizaron los de anticuerpos monoclonales anti-CD3 humano (IgG2a de ratón, clona OKT3, American Type Culture Collection) y anti-CD28 humano (IgG1 de ratón, clona CD28.2, Biolegend).

En caso de utilizar células mononucleares no adherentes para los ensayos, los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 se adicionaron al medio y las placas se incubaron a temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente se añaden inmunoglobulinas de conejo anti-IgG de ratón para entrecruzar los anticuerpos primarios.

En el caso de los linfocitos T_{EM} CD4⁺ purificados fue necesario adherir los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 a la superficie de las placas de cultivo para permitir su activación. Los anticuerpos se incubaron en las placas a las concentraciones indicadas por 2 horas a 37 °C en PBS. En el momento de la estimulación, se lavaron los pozos tres veces con PBS y se añadió la suspensión de linfocitos T_{EM} CD4⁺ purificados.

En todos los casos la toxina Vm24 se añadió a la suspensión celular un minuto antes del comienzo de la estimulación.

Para las tinciones con anticuerpos fluorescentes, las células se lavaron con 3 mL de solución FACS (PBS con 2% de suero fetal bovino y 0.1% de azida de sodio), se centrifugaron a 300 g por 10 minutos y se descartó el sobrenadante.

Los receptores para Fc de las células se bloquearon con 100 µL de suero humano al 10% por 30 minutos a 4 °C.

Se realizó otro lavado y las células se resuspendieron en 50 µL de solución FACS y se marcaron con los anticuerpos fluorescentes apropiados durante 30 minutos a 4 °C. Se lavaron las células para eliminar el exceso de anticuerpos y se realizó la adquisición de 10,000 eventos en un citómetro de flujo FACSCanto II (BD Biosciences) con software FACSDiva versión 6.0 (BD Biosciences). Los datos se analizaron con el software FlowJo (Tree Star Inc).

7.4 Cambios en el perfil de secreción de citocinas

Se utilizó el Human Cytokine Antibody Array C3 (RayBiotech) para evaluar los cambios en el perfil de secreción de citocinas de células mononucleares estimuladas, en ausencia o presencia de la toxina Vm24. Este arreglo permite la detección simultánea de 42 citocinas (ENA-78, G-CSF, GM-CSF, GRO, GRO α , I-309, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 p40/p70, IL-13, IL-15, IFN γ , MCP-1, MCP-2, MCP-3, M-CSF, MDC, MIG, MIP-1 δ , RANTES, SCF, SDF-1, TARC, TGF- β 1, TNF α , TNF β , EGF, IGF-1, ANG, OSM, THPO, VEGF, PDGF-BB y leptina).

Los arreglos con los anticuerpos de captura de citocinas se incubaron durante 12 horas a 4 °C con el medio de cultivo de células mononucleares estimuladas por 24 horas con anticuerpos anti-CD3 (100 ng/mL), anti-CD28 (500 ng/mL) y anticuerpos policlonales de conejo anti-IgG de ratón (1 µg/mL), en ausencia o presencia de la toxina Vm24.

A continuación, los arreglos se incubaron con el coctel de anticuerpos de detección y posteriormente con estreptavidina-peroxidasa de rábano y se revelaron según las instrucciones del fabricante.

La adquisición de las imágenes se llevó a cabo en un fotodocumentador Molecular Imager Gel Doc XR+ (Bio-Rad) y el análisis densitométrico en el software ImageJ (National Institutes of Health).

VIII. RESULTADOS

8.1 Purificación de linfocitos T_{EM} CD4⁺

Se obtuvieron entre 8.6 y 49.1 x 10⁶ linfocitos T_{EM} CD4⁺ por concentrado leucocitario (Tabla 2). Cada concentrado leucocitario deriva de una unidad de sangre total (450 mL de sangre venosa periférica).

Tabla 2. Rendimiento de la purificación de linfocitos T_{EM} CD4⁺ a partir de células mononucleares no adherentes obtenidas de concentrados leucocitarios.

Sujeto	Células de partida (x 10 ⁶)	Células obtenidas (x 10 ⁶)	Rendimiento (%)
1	512.4	49.1	9.6
2	516.8	42.9	8.3
3	730.1	38.0	5.2
4	491.4	20.9	4.2
5	600.6	22.2	3.6
6	508.8	19.6	3.8
7	600.6	8.6	1.4

En todos los casos la viabilidad de las células obtenidas fue mayor al 95%. La cantidad de linfocitos T_{EM} CD4⁺ varía considerablemente entre individuos debido a factores como la edad y la exposición previa a antígenos [15]. Sin embargo, la pureza de los linfocitos T_{EM} CD4⁺ obtenidos, determinada por citometría de flujo fue en todos los casos mayor al 95%.

Los linfocitos T_{EM} CD4⁺ son positivos para los marcadores de superficie CD3, CD4 y CD45RO y son negativos para el marcador CCR7 (Figura 14) [14, 15].

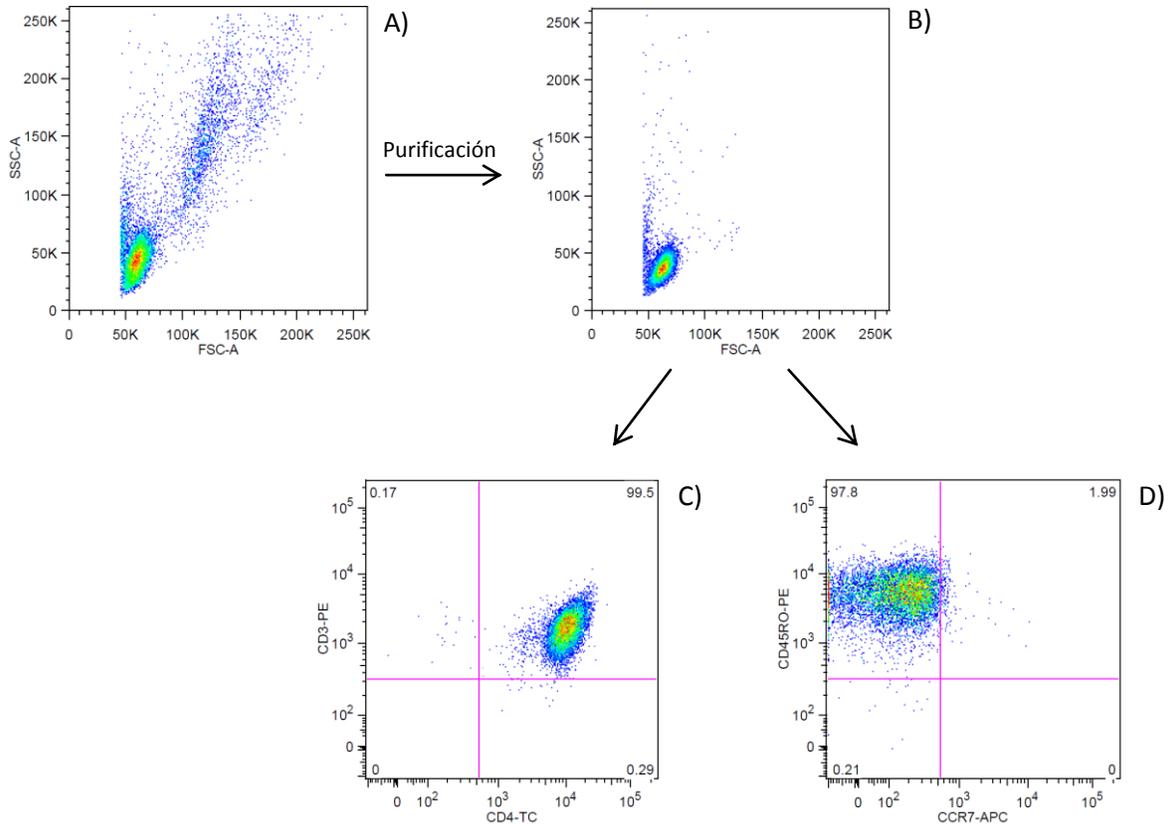


Figura 14. Fenotipo de los linfocitos T_{EM} $CD4^+$ purificados. Se muestra la distribución de tamaño (FSC-A) y granularidad citoplasmática (SSC-A) de A) células mononucleares no adherentes y B) linfocitos T_{EM} $CD4^+$ purificados a partir de estas. Tras la purificación se obtiene una población con tamaño y granularidad citoplasmática homogénea. Las células purificadas se tiñeron con anticuerpos monoclonales fluorescentes para la determinación de su fenotipo. C, D) Más del 95% de las células son positivas para los marcadores de superficie CD3, CD4 y CD45RO y negativas para CCR7.

8.2 Registro electrofisiológico

La actividad de la toxina Vm24 se evaluó en los canales Kv1.3 de linfocitos T_{EM} $CD4^+$ mediante patch clamp en modalidad de célula completa. Se utilizó una concentración 1 nM de la toxina, pues se ha reportado que esta concentración es capaz de bloquear la corriente de los canales Kv1.3 sin afectar la función de otros canales de potasio presentes en linfocitos T [24].

En el ensayo realizado, la toxina inhibió completamente la corriente de los canales Kv1.3 en los linfocitos T_{EM} $CD4^+$ (Figura 15). Tras el periodo de lavado de la toxina, no se recuperó la corriente de los canales Kv1.3, indicando una lenta velocidad de disociación del complejo canal-toxina.

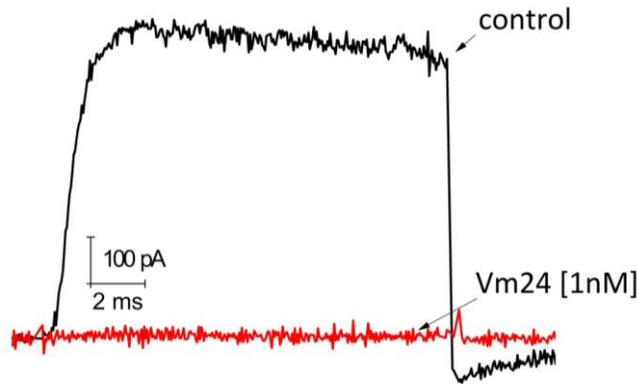


Figura 15. Registro de corriente de los canales Kv1.3 en linfocitos T_{EM} $CD4^+$ purificados. La corriente originada por un pulso despolarizante de +50 mV desde un potencial de mantenimiento de -120 mV se abate completamente cuando se administra la toxina Vm24 a una concentración 1 nM. Registros realizados por la Dra. Rita Restano Cassulini.

8.3 Estimulación celular y evaluación de la activación y proliferación

Inicialmente se probó la toxina Vm24 en células mononucleares no adherentes, analizando la activación y proliferación de las poblaciones celulares de interés, identificadas con anticuerpos específicos. En este caso se utilizaron anticuerpos contra los marcadores de superficie CD4 y CCR7 para seleccionar los fenotipos de interés: linfocitos T_{EM} $CD4^+$ ($CD4^+$ y $CCR7^-$) y linfocitos T vírgenes y T_{CM} $CD4^+$ ($CD4^+$ y $CCR7^+$) (Figura 16).

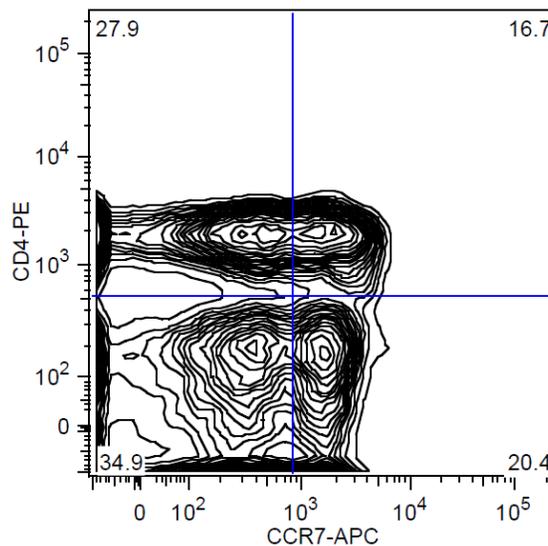


Figura 16. Identificación de las poblaciones celulares de interés con los marcadores de superficie CD4 y CCR7. Los linfocitos T_{EM} $CD4^+$ se ubican en el cuadrante superior izquierdo ($CD4^+$, $CCR7^-$) y los linfocitos T vírgenes y T_{CM} $CD4^+$ están en el cuadrante superior derecho ($CD4^+$, $CCR7^+$).

La estimulación de los linfocitos T se realizó a través del complejo receptor de células T, con un anticuerpo anti-CD3 (IgG2a de ratón, clona OKT3) en ausencia o presencia de coestimulación con un anticuerpo anti-CD28 (IgG1 de ratón, clona CD28.2). Los anticuerpos primarios se entrecruzaron con inmunoglobulinas policlonales de conejo anti-IgG de ratón para incrementar la fuerza del estímulo activador. Se decidió evaluar la toxina en presencia de coestimulación, pues se ha observado que las señales coestimuladoras pueden reducir el efecto inmunomodulador de los bloqueadores de canales Kv1.3 [27].

En todos los ensayos se evaluó la toxina Vm24 a una concentración 1 nM. A esta concentración se sabe que la toxina Vm24 bloquea completamente los canales Kv1.3, sin afectar la función de los otros canales de potasio presentes en los linfocitos T (canales KCa3.1) [24].

Respecto a la proliferación celular, evaluada por dilución de CFSE, se observó que la presencia de una señal de coestimulación a través de CD28 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de anti-CD3, 500 ng/mL de anti-CD28 y 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de anti-IgG), causó la proliferación de $90 \pm 1\%$ de la población de linfocitos $T_{EM} CD4^+$. Bajo estas condiciones, la toxina Vm24 no generó un efecto inhibitorio en la proliferación (Figura 17).

En ausencia de coestimulación (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de anti-CD3 y 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de anti-IgG), $72 \pm 6\%$ de los linfocitos $T_{EM} CD4^+$ proliferaron y la toxina Vm24 disminuyó la proliferación de estas células en un $22 \pm 3\%$ (Figura 17).

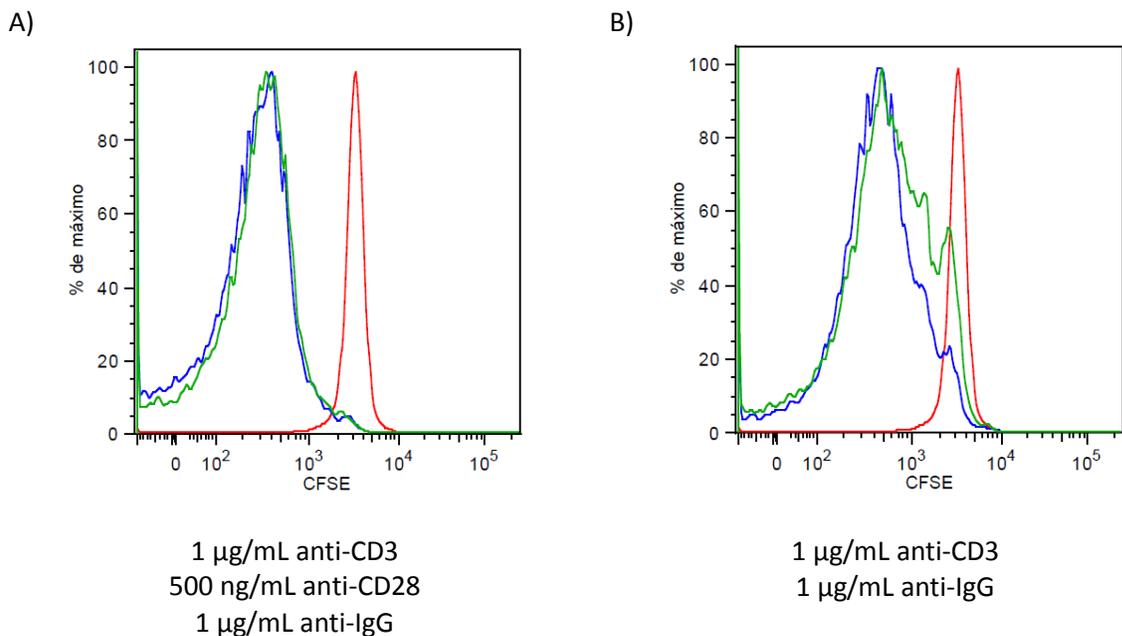


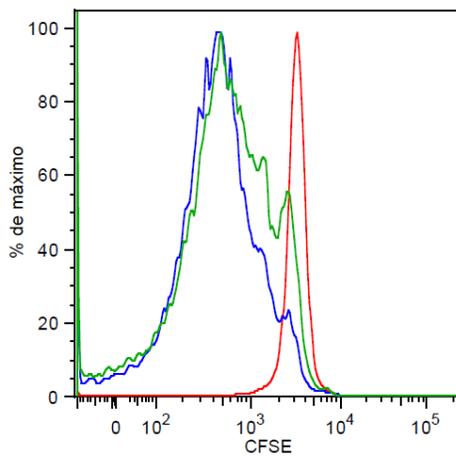
Figura 17. Ensayo de proliferación (dilución de CFSE) de linfocitos $T_{EM} CD4^+$ tras 120 horas de estimulación. Se identificó la población de linfocitos $T_{EM} CD4^+$ ($CD4^+$, $CCR7^-$) a partir de células mononucleares no adherentes mediante los anticuerpos fluorescentes correspondientes. En rojo se observa el control negativo de proliferación (células sin estimular). En azul y verde se muestran los patrones de proliferación de las células estimuladas con los anticuerpos indicados en ausencia

y presencia de una concentración 1 nM de la toxina Vm24 respectivamente. A) En presencia de una señal de coestimulación a través de CD28, la toxina Vm24 no generó un efecto inhibitorio en la proliferación de los linfocitos T_{EM} CD4⁺. B) En ausencia de coestimulación, la toxina Vm24 disminuyó la proliferación de los linfocitos T_{EM} CD4⁺ en un 22 ± 3 %.

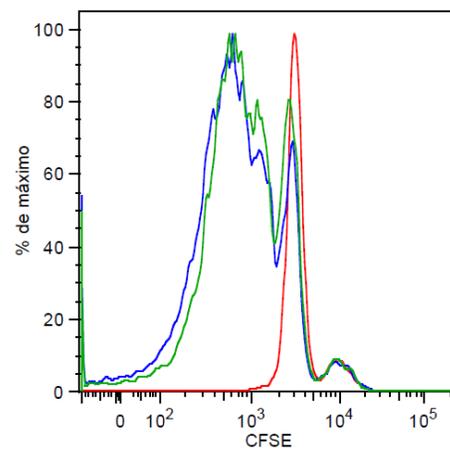
En este ensayo también se observa que la toxina Vm24 tiene un efecto inhibitorio de la proliferación más marcado en linfocitos T_{EM} CD4⁺ (22 ± 3 %) que en linfocitos T vírgenes y T_{CM} CD4⁺ (8 ± 2 %). Este puede deberse a que los linfocitos T vírgenes y T_{CM} son capaces de aumentar la expresión del canal de potasio KCa3.1 tras la estimulación, compensando así el bloqueo del canal Kv1.3 (Figura 18) [18].

A) Linfocitos T_{EM} CD4⁺ (CD4⁺, CCR7⁻)

B) Linfocitos T vírgenes y T_{CM} CD4⁺ (CD4⁺, CCR7⁺)



1 µg/mL anti-CD3
1 µg/mL anti-IgG



1 µg/mL anti-CD3
1 µg/mL anti-IgG

Figura 18. Ensayo de proliferación (dilución de CFSE) de A) linfocitos T_{EM} CD4⁺ (CD4⁺, CCR7⁻) y B) linfocitos T vírgenes y T_{CM} CD4⁺ (CD4⁺, CCR7⁺) tras 120 horas de estimulación. Se identificaron las poblaciones de interés a partir de células mononucleares no adherentes mediante los anticuerpos fluorescentes correspondientes. En rojo se observa el control negativo de proliferación (células sin estimular). En azul y verde se muestran los patrones de proliferación de las células estimuladas con los anticuerpos indicados en ausencia y presencia de una concentración 1 nM de la toxina Vm24 respectivamente. La toxina Vm24 tiene un efecto inhibitorio de la proliferación más marcado en linfocitos T_{EM} CD4⁺ (22 ± 3 %) que en linfocitos T vírgenes y T_{CM} CD4⁺ (8 ± 4 %).

También se evaluó la capacidad de la toxina Vm24 para inhibir la expresión del marcador de activación CD25 (cadena alfa del receptor de IL-2) en las poblaciones de interés tras 24 horas de estimulación. La toxina Vm24 disminuye el número de células que expresan CD25 de manera similar en linfocitos T_{EM} CD4⁺ (38 ± 3 %) y en linfocitos T vírgenes y T_{CM} CD4⁺ (37 ± 6 %). Además, el número de moléculas de CD25 por célula (índice medio de fluorescencia) también se reduce de

forma comparable en linfocitos T_{EM} CD4⁺ (56 ± 7 %) y en linfocitos T vírgenes y T_{CM} CD4⁺ (52 ± 5 %) (Figura 19).

A) Linfocitos T_{EM} CD4⁺ (CD4⁺, CCR7⁻)

B) Linfocitos T vírgenes y T_{CM} CD4⁺ (CD4⁺, CCR7⁺)

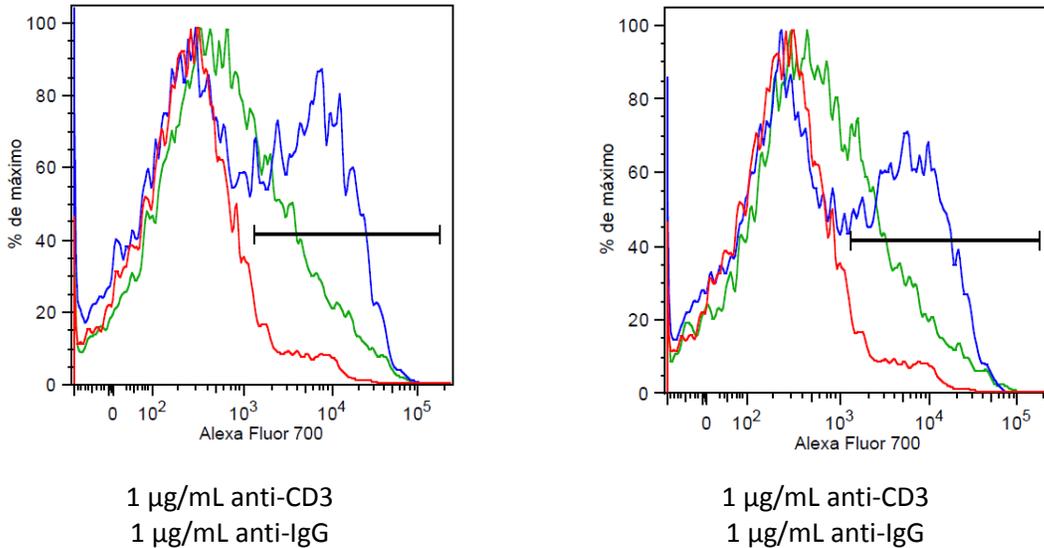


Figura 19. Ensayo de activación (expresión de CD25) en A) linfocitos T_{EM} CD4⁺ (CD4⁺, CCR7⁻) y B) linfocitos T vírgenes y T_{CM} CD4⁺ (CD4⁺, CCR7⁺) tras 24 horas de estimulación. Los niveles de expresión de CD25 se determinaron por citometría de flujo, utilizando un anticuerpo anti-CD25-Alexa Fluor 700. Se identificaron las poblaciones de interés a partir de células mononucleares no adherentes mediante los anticuerpos fluorescentes correspondientes. En rojo se observa el control negativo de activación (células sin estimular). En azul y verde se muestran los patrones de expresión de CD25 de las células estimuladas con los anticuerpos indicados en ausencia y presencia de una concentración 1 nM de la toxina Vm24 respectivamente. La toxina Vm24 disminuye el número de células que expresan CD25 de manera similar en linfocitos T_{EM} CD4⁺ (38 ± 3 %) y en linfocitos T vírgenes y T_{CM} CD4⁺ (37 ± 6 %). Además, el número de moléculas de CD25 por célula (índice medio de fluorescencia) también se reduce de forma comparable en linfocitos T_{EM} CD4⁺ (56 ± 7 %) y en linfocitos T vírgenes y T_{CM} CD4⁺ (52 ± 5 %).

A continuación se probó la toxina Vm24 en linfocitos T_{EM} CD4⁺ purificados con el fin de tener un modelo que permita el estudio de procesos moleculares asociados al bloqueo del canal Kv1.3 en esta población celular.

Para la estimulación de los linfocitos purificados, fue necesario adherir el anticuerpo anti-CD3 a la placa de cultivo para favorecer el entrecruzamiento de estas moléculas en la superficie celular y generar una señal de activación adecuada [28]. De esta forma se construyó una curva dosis-respuesta con el anticuerpo anti-CD3 a diferentes densidades sobre las placas de cultivo, evaluando la expresión de CD25. La curva se realizó en ausencia o presencia de una concentración 1 nM de Vm24.

En estos ensayos se observa que a una densidad de anti-CD3 de 2105 ng/cm² se alcanza un máximo de activación de los linfocitos T_{EM} CD4⁺. Además, la toxina Vm24 disminuye el número de células que expresan CD25 y el número de moléculas de CD25 por célula (índice medio de fluorescencia) a todas las densidades de anti-CD3 ensayadas (Figura 20).

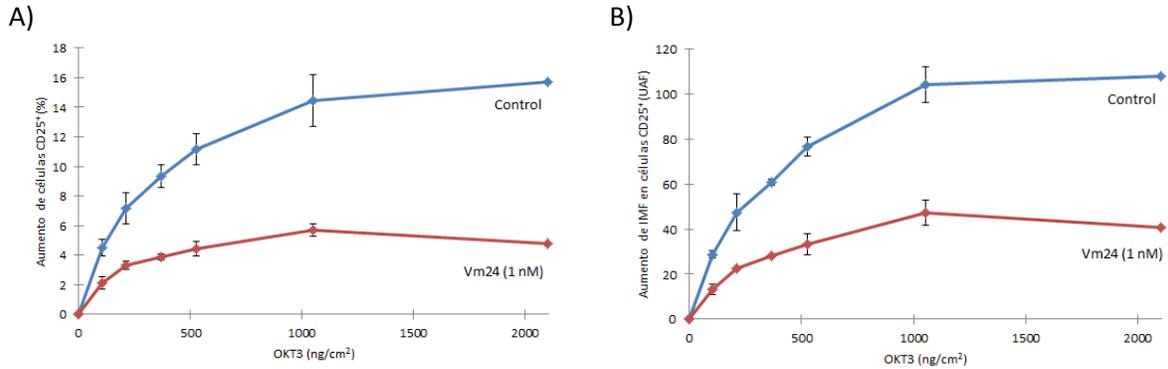


Figura 20. Curva dosis-respuesta de anti-CD3, evaluando la expresión de CD25 en linfocitos T_{EM} CD4⁺ tras 24 horas de estimulación. La curva se realizó en ausencia o presencia de una concentración 1 nM de Vm24. Los niveles de expresión de CD25 se determinaron por citometría de flujo, utilizando un anticuerpo anti-CD25-Alexa Fluor 700. A una densidad de anti-CD3 de 2105 ng/cm² se alcanza un máximo en la expresión de CD25. La toxina Vm24 A) disminuye el número de células que expresan CD25 y B) el número de moléculas de CD25 por célula (índice medio de fluorescencia) a todas las densidades de anti-CD3 ensayadas. IMF: Índice medio de fluorescencia; UAF: Unidades arbitrarias de fluorescencia

Finalmente, se evaluó la capacidad de la toxina Vm24 para inhibir la expresión de CD25 en muestras de linfocitos T_{EM} CD4⁺ de 7 donadores sanos, estimulados con anti-CD3 a una densidad de 2105 ng/cm² (densidad a la que se observa un máximo en la expresión de CD25). La toxina disminuyó el número de células que expresan CD25 en un 35 ± 10 % y el número de moléculas de CD25 por célula (índice medio de fluorescencia) en un 48 ± 10 % (Figura 21).

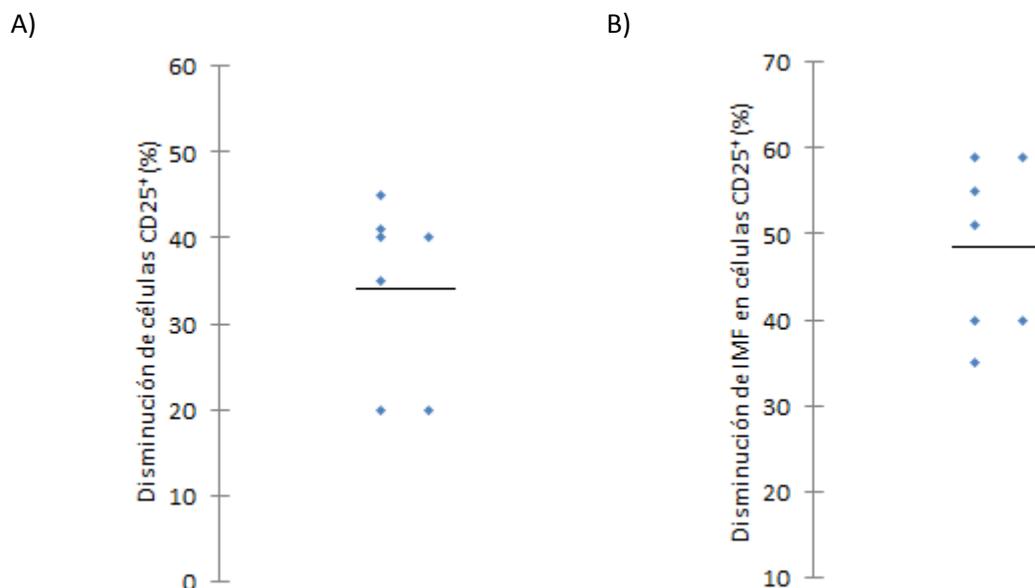


Figura 21. Disminución de la expresión de CD25 por la toxina Vm24 en muestras de linfocitos T_{EM} CD4⁺ activados de 7 donadores sanos. Las células se estimularon con anti-CD3 a una densidad de 2105 ng/cm². Los puntos muestran la disminución de la expresión de CD25 de cada sujeto y la línea la media. La toxina A) disminuyó el número de células que expresan CD25 en un 35 ± 10 % y B) el número de moléculas de CD25 por célula (índice medio de fluorescencia) en un 48 ± 10 %. IMF: Índice medio de fluorescencia

8.4 Cambios en el perfil de secreción de citocinas

Se evaluó el perfil de secreción de citocinas de células mononucleares no adherentes tratadas con Vm24, pues estas proteínas modulan varias funciones del sistema inmune como la comunicación intercelular, proliferación, diferenciación, quimiotaxis y secreción de anticuerpos que pudieran verse afectadas por la toxina [15].

El tratamiento con Vm24 de células mononucleares activadas con anti-CD3 y anti-CD28 produjo una disminución en el medio de cultivo de las citocinas GM-CSF, GRO, IL-5 e IL-10 y un aumento de IL-2 (Figura 22).

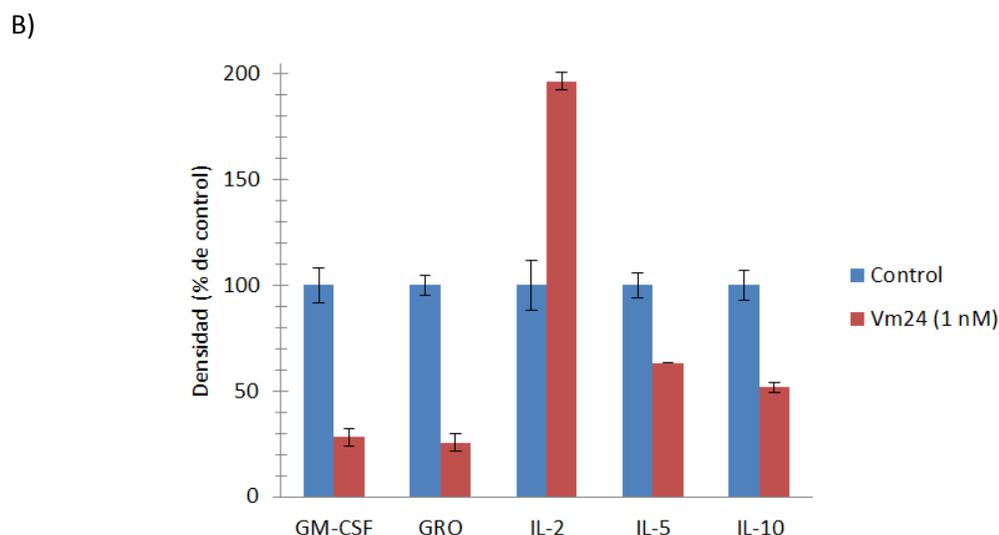
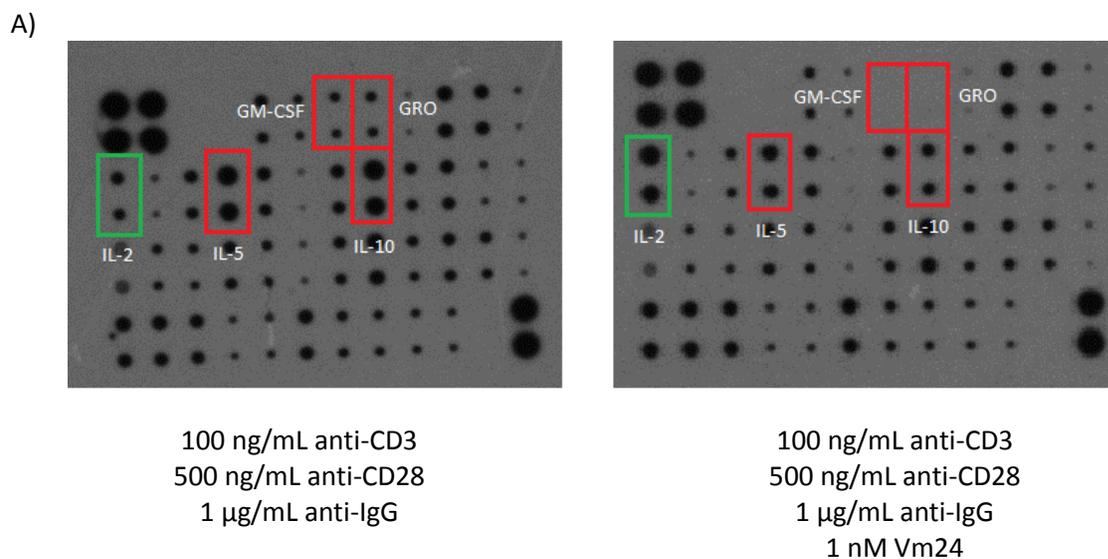


Figura 22. A) Perfil de secreción de citocinas de células mononucleares estimuladas durante 24 horas con los anticuerpos indicados, en ausencia o presencia de una concentración 1 nM de la toxina Vm24. Se utilizó el Human Cytokine Antibody Array C3 (RayBiotech) para la detección simultánea de 42 citocinas. Se encierran en rojo las citocinas cuya presencia disminuyó en presencia de la toxina (GM-CSF, GRO, IL-5, IL-10) y en verde la citocina en la que se observó un aumento (IL-2). B) Análisis densitométrico de las citocinas expresadas diferencialmente en presencia de la toxina Vm24.

La toxina Vm24 resultó efectiva en disminuir la producción de GM-CSF y GRO. GM-CSF es un factor de crecimiento que estimula células troncales de la médula ósea para producir monocitos, neutrófilos, eosinófilos y basófilos que salen a la circulación y migran a los tejidos. GRO es una citocina quimioatrayente de neutrófilos a los sitios de inflamación, por lo que la disminución de

ambas puede contribuir a disminuir el daño tisular que generan las enzimas hidrolíticas, intermediarios reactivos de oxígeno y citocinas proinflamatorias liberadas por estas células [15].

IL-5 es importante para la diferenciación de linfocitos B y la secreción de inmunoglobulinas, además de ser clave en la activación de eosinófilos, por lo que estos procesos se pueden ver afectados por la toxina Vm24 [15].

Por su parte, IL-10 es una citocina antiinflamatoria que disminuye la expresión de diversas citocinas como IFN γ , TNF y GM-CSF. De este modo, la toxina Vm24 puede afectar de manera indirecta la secreción de estas citocinas proinflamatorias [15, 27].

En cuanto a IL-2, se observó un aumento de esta citocina en el medio de cultivo en presencia de la toxina. Sin embargo, se ha reportado previamente que los bloqueadores de canales Kv1.3 disminuyen su expresión. El efecto observado probablemente se debe a que la estimulación de los linfocitos T aumenta la expresión de CD25 (cadena alfa del receptor de alta afinidad de IL-2) y la mayor parte de IL-2 producida en ese momento pudiera encontrarse unida al receptor y no libre en el medio. Sin embargo, la presencia de la toxina Vm24 inhibe la expresión de CD25 y pudiera detectarse más IL-2 libre en el medio [15, 27].

IX. DISCUSIÓN

Las enfermedades autoinmunes representan un importante problema de salud pública que afecta a más de 125 millones de personas alrededor del mundo. Los individuos sanos no desarrollan este tipo de enfermedades por mecanismos como la eliminación de linfocitos T autorreactivos en el timo o por inhibición de su activación en la periferia mediante anergia clonal y células T reguladoras. Sin embargo, cuando los linfocitos T autorreactivos escapan de esta regulación, la presencia del autoantígeno en el cuerpo causa su activación persistente y diferenciación a un fenotipo de linfocitos T_{EM} . Estas células son capaces de migrar a los sitios inflamados y secretar rápidamente grandes cantidades de citocinas proinflamatorias como $IFN\gamma$ y TNF [15, 16, 17, 20].

Los resultados de este estudio muestran que la toxina Vm24 inhibe de forma parcial la activación de linfocitos $T_{EM} CD_4^+$, que están implicados en la patogénesis de enfermedades autoinmunes como esclerosis múltiple, diabetes mellitus tipo I, artritis reumatoide y psoriasis. Además la toxina probablemente module el tráfico de estas células a los tejidos inflamados, pues se ha reportado un papel clave del canal Kv1.3 para la migración y adhesión celular [14, 20].

Es importante resaltar que la toxina Vm24 no tuvo un efecto significativo inhibiendo la activación y proliferación de linfocitos $T_{EM} CD_4^+$ al presentarse una señal coestimuladora a través de CD28 (500 ng/mL de anti-CD28). La coestimulación puede superar el efecto inhibitorio de la toxina, pues se ha visto que aumenta la respuesta transcripcional de las señales del RCT, facilitando la activación de la PLC γ 1, aumentando el influjo de calcio y disminuyendo la exportación nuclear de NFAT. Esto puede resultar ventajoso en el tratamiento, pues la toxina afectaría preferencialmente a linfocitos T_{EM} activados directamente en los focos de inflamación por parte de macrófagos tisulares que expresan un número reducido de moléculas coestimuladoras, a diferencia de los linfocitos T vírgenes, que se activan en los órganos linfoides secundarios por medio de células dendríticas que expresan abundantes moléculas de coestimulación en su superficie [15, 20, 21].

El tratamiento con moléculas bloqueadoras de canales Kv1.3 evita una inmunosupresión generalizada, permitiendo a los linfocitos T vírgenes responder a nuevos antígenos y a los linfocitos T_{CM} estimular células dendríticas y linfocitos B eficientemente, lo que es fundamental para la generación de anticuerpos protectores de alta afinidad [14, 15, 16, 17].

Se ha demostrado recientemente que los bloqueadores de canales Kv1.3 afectan también la función de linfocitos B de memoria tardíos ($CD27^+$, IgD^-) implicados en enfermedades autoinmunes como tiroiditis de Hashimoto, síndrome de Sjögren y lupus eritematoso sistémico, ya que su activación es dependiente del canal Kv1.3. Sin embargo, la función de linfocitos B vírgenes ($CD27^-$, IgD^+) y de memoria tempranos ($CD27^+$, IgD^+) no se ve afectada, lo que abre un nuevo panorama de estudio para el uso terapéutico de estas moléculas [20].

Aunque los bloqueadores de canales Kv1.3 tienen la desventaja de inhibir la activación de células T_{EM} específicas para antígenos de vacunas y los linfocitos B de memoria tardíos generadores de anticuerpos protectores, el tratamiento con estas moléculas es menos radical que las terapias

actuales, que indiscriminadamente suprimen la respuesta inmune. Además el tratamiento es reversible, pudiendo utilizarse el bloqueador cuando sea necesario y suspenderlo en caso de infecciones persistente, a diferencia de los agentes quimioterapéuticos y anticuerpos monoclonales, que pueden tardar meses en eliminarse completamente [18, 20, 24].

Actualmente, el único bloqueador de canales Kv1.3 que ha pasado a estudios de fase clínica es la molécula ShK-186, derivada de la toxina de anémona ShK. Sin embargo, la toxina Vm24 tiene la ventaja de una mayor selectividad hacia el canal Kv1.3, lo que mejora el índice de seguridad en condiciones donde se ve comprometida la barrera hematoencefálica (como la esclerosis múltiple), en donde la presencia de altas concentraciones de bloqueadores inespecíficos (por ejemplo de canales Kv1.1 neuronales) en el sistema nervioso central puede traer neurotoxicidad grave [18, 20].

Se espera que el presente trabajo sirva como base para estudios posteriores de biología de sistemas, en donde se identifiquen otros mecanismos moleculares afectados por el bloqueo de este canal, con el fin de mejorar nuestro entendimiento de la respuesta inmune y buscar enfoques racionales para el tratamiento de enfermedades autoinmunes.

X. CONCLUSIONES

La toxina Vm24, a concentraciones que bloquean completamente los canales Kv1.3, inhibe parcialmente la activación y proliferación de linfocitos T_{EM} CD4⁺ estimulados a través del receptor de células T. Sin embargo, Vm24 no tuvo un efecto significativo inhibiendo la activación y proliferación de linfocitos T_{EM} CD4⁺ cuando una señal coestimuladora se aplicó a través de CD28 (500 ng/mL de anti-CD28).

Además, la toxina generó un cambio en el perfil de secreción de citocinas de células mononucleares activadas, disminuyendo la secreción de GM-CSF, GRO, IL-5, IL-10 y aumentando aparentemente la de IL-2.

XI. REFERENCIAS

1. Cassel D, Menez A, Gordon D. (2001). Toxin Action: Molecular Mechanisms. Encyclopedia of Life Sciences.
2. Francke OF. (2014). Biodiversidad de Arthropoda (Chelicerata: Arachnida ex Acari) en México. Revista Mexicana de Biodiversidad. 85 (Suppl. 1): 408–418.
3. Petricevich VL. (2010). Scorpion Venom and the Inflammatory Response. Mediators of Inflammation.
4. Rodríguez de la Vega RC, Vidal N, Possani LD. (2013). Scorpion Peptides. En Kastin AJ. Handbook of Biologically Active Peptides (423-429). San Diego. Elsevier.
5. Koppenhöfer E, Schmidt H. (1968). Incomplete sodium inactivation in nodes of Ranvier treated with scorpion venom. Experientia. 1: 41-42.
6. Bosmans F, Tytgat J. (2007). Voltage-gated sodium channel modulation by scorpion α -toxins. Toxicon. 49(2): 142–158.
7. Pedraza-Escalona M, Possani LD. (2013). Scorpion beta-toxins and voltage-gated sodium channels: interactions and effects. Frontiers in Bioscience. 18: 572-587.
8. Carbone E, Wanke E, Prestipino G, Possani LD, Maelicke A. (1982). Selective blockage of voltage-dependent K^+ channels by a novel scorpion toxin. Nature. 296(5852): 90-91.
9. Pedarzani P, D'hoedt D, Doorty KB, Wadsworth JDF, Joseph JS, Jeyaseelan K, Kini RM, Gadre SV, Sapatnekar SM, Stocker M, Strong PN. (2002). Tamapin, a Venom Peptide from the Indian Red Scorpion (*Mesobuthus tamulus*) That Targets Small Conductance Ca^{2+} -activated K^+ Channels and Afterhyperpolarization Currents in Central Neurons. The Journal of Biological Chemistry. 277(48): 46101–46109.
10. Catterall WA, Cestèle S, Yarov-Yarovoy V, Yu FH, Konoki K, Scheuer T. (2007). Voltage-gated ion channels and gating modifier toxin. Toxicon. 49(2): 124-141.
11. Lyons SA, O'Neal J, Sontheimer H. (2002). Chlorotoxin, a scorpion-derived peptide, specifically binds to gliomas and tumors of neuroectodermal origin. Glia. 39(2): 162-173.
12. Deshane J, Garner CC, Sontheimer H. (2003). Chlorotoxin inhibits glioma cell invasion via matrix metalloproteinase-2. The Journal of Biological Chemistry. 278(6): 4135-4144.
13. Quintero-Hernández V, Jiménez-Vargas JM, Gurrola GB, Valdivia HH, Possani LD. (2013). Scorpion venom components that affect ion-channels function. Toxicon. 76: 328-342.
14. Chandy KG, Wulff H, Beeton C, Pennington M, Gutman GA, Cahalan MD. (2004). K^+ channels as targets for specific immunomodulation. Trends in Pharmacological Sciences. 25(5): 280–289.

15. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. (2012). *Inmunología celular y molecular*. Barcelona. 2012. Elsevier.
16. Sallusto F, Lenig D, Förster R, Lipp M, Lanzavecchia A. (1999). Two subsets of memory lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*. 401: 708-712.
17. Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. (2004). Central Memory and Effector Memory T Cell Subsets: Function, Generation and Maintenance. *Annual Review of Immunology*. 22: 745-763.
18. Wulff H, Calabresi PA, Allie R, Yun S, Pennington M, Beeton C, Chandy G. (2004). The voltage-gated Kv1.3 K⁺ channel in effector memory T cells as new target for MS. *The Journal of Clinical Investigation*. 111: 1703-1713.
19. Beeton C, Wulff H, Standifer NE, Azam P, Mullen KM, Pennington MW, Kolski-Andreaco A, Wei E, Grino A, Counts DR, Wang PH, LeeHealey CJ, Andrews BS, Sankaranarayanan A, Homerick D, Roeck WW, Tehranzadeh J, Stanhope KL, Zimin P, Havel PJ, Griffey S, Knaus HG, Nepom GT, Gutman GA, Calabresi PA, Chandy KG. (2006). Kv1.3 channels are a therapeutic target for T cell-mediated autoimmune diseases. *PNAS*. 103(46): 17414–17419.
20. Chi V, Pennington MW, Norton RS, Tarcha EJ, Londono LM, Sims-Fahey B, Upadhyay SK, Lakey JT, Iadonato S, Wulff H, Beeton C, Chandy KG. (2012). Development of a sea anemone toxin as an immunomodulator for therapy of autoimmune diseases. *Toxicon*. 59: 529-546.
21. Feske S. (2007). Calcium signalling in lymphocyte activation and disease. *Nature Reviews Immunology*. 7: 690-702.
22. Beeton C, Pennington MW, Wulff H, Singh S, Nugent D, Crossley G, Khaytin I, Calabresi PA, Chen CY, Gutman GA, Chandy G. (2005). Targeting Effector Memory T Cells with a Selective Peptide Inhibitor of Kv1.3 Channels for Therapy of Autoimmune Diseases. *Molecular Pharmacology*. 67: 1369-1381.
23. Gutman GA, Chandy KG, Grissmer S, Lazdunski M, McKinnon D, Pardo LA, Robertson GA, Rudy B, Sanguinetti MC, Stühmer W, Wang X. (2005). International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and Molecular Relationships of Voltage-Gated Potassium Channels. *Pharmacological Reviews*. 57: 473–508.
24. Varga Z, Gurrola-Briones G, Papp F, Rodríguez de la Vega RC, Pedraza-Alva G, Tajhya RB, Gaspar R, Cardenas L, Rosenstein Y, Beeton, C, Possani LD, Panyi G. (2012). Vm24, a Natural Immunosuppressive Peptide, Potently and Selectively Blocks Kv1.3 Potassium Channels of Human T Cells. *Molecular Pharmacology*. 82: 372–382.
25. Gurrola GB, Hernández-López RA, Rodríguez de la Vega RC, Varga Z, Batista CVF, Salas-Castillo SP, Panyi G, Del Río-Portilla F, Possani LD. (2012). Structure, Function, and Chemical Synthesis of

Vaejovis mexicanus Peptide 24: A Novel Potent Blocker of Kv1.3 Potassium Channels of Human T Lymphocytes. *Biochemistry*. 51(19): 4049–4061.

26. Patente: L. D. Possani P., G. Gurrola-Briones, S. P. Salas-Castillo, C. V. Ferreira B., Z. S. Varga, G. Panyi y R. Gaspar. 2009. Vm23 and Vm24, two scorpion peptides that block human-T-lymphocyte potassium channels (sub-type Kv1.3) with high selectivity and decrease the in vivo DTH-responses in rats. UNAM. Europa 07734817.5, Estados Unidos 12/599,978, China 200780053305.7, Canadá CA 2686216, Australia 2007353147, Israel 202113, Euroasia 200901530, Corea 10-2009-7026000, Brasil (pendiente), Cuba 2009-0194, Japón (pendiente), India 7396/DELNP/2009, México MX/a/2009/01209, Israel 202113, Corea 10-2009-7026000 y Singapur 200907395-8 (en trámite).

27. Hu L, Pennington M, Jiang Q, Whartenby KA, Calabresi PA. (2007). Characterization of the Functional Properties of the Voltage-Gated Potassium Channel Kv1.3 in Human CD₄⁺ T Lymphocytes. *The Journal of Immunology*. 179: 4563-4570.

28. Li Y, Kurlander RJ. (2010). Comparison of anti-CD3 and anti-CD28-coated beads with soluble anti-CD3 for expanding human T cells: Differing impact on CD8 T cell phenotype and responsiveness to restimulation. *Journal of Translational Medicine*, 8: 104.