

**EVALUACIÓN DEL EFECTO INMUNOMODULADOR DEL VENENO DE *Tityus sp*  
(*Tityus (Atreus) n. sp. aff. Metuendus*) SOBRE CÉLULAS MONONUCLEARES DE  
SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES CON DIAGNÓSTICO DE ARTRITIS  
REUMATOIDE (ESTUDIO PILOTO)**



**YISEL DEL MAR MORALES URMENDIZ  
CINDY GABRIELA RIVERA TOBAR**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA  
POPAYÁN, CAUCA**

**2022**

**EVALUACIÓN DEL EFECTO INMUNOMODULADOR DEL VENENO DE *Tityus sp*  
(*Tityus (Atreus) n. sp. aff. Metuendus*) SOBRE CÉLULAS MONONUCLEARES DE  
SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES CON DIAGNÓSTICO DE ARTRITIS  
REUMATOIDE (ESTUDIO PILOTO)**



**YISEL DEL MAR MORALES URMENDIZ**

**CINDY GABRIELA RIVERA TOBAR**

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar por el título de  
Biólogo**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA**

**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN**

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA**

**POPAYÁN, CAUCA**

**2022**

**Nota de aceptación**

**Aprobado**

---

---

---

---

Rosa Amalia Dueñas C.

---

**Rosa Amalia Dueñas Cuellar (Directora)**

Victoria Eugenia Niño Castaño

---

**Victoria Eugenia Niño Castaño (Co-directora)**

  
(jurado)

  
(jurado)

**Popayán, 06 junio de 2022**

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios, por permitirnos sentir su amor en cada paso que hemos dado, por guiarnos en la oscuridad y por darnos la oportunidad de seguir nuestros sueños y hacer todo por cumplirlos.

A nuestros padres Ruben Darío Rivera, Mireya Stella Tobar, Luz Ayda Urmendiz Y Edilberto Morales, por brindarnos apoyo, cariño y amor, y porque para ellos son todos nuestros triunfos, en la tierra y en el cielo.

A Cristian Rivera y Alejandro Zúñiga, por su apoyo, su compañía y su amor.

A la Doctora Rosa Amalia Dueñas Cuellar, por su compromiso, su ayuda y su dedicación, por ser un ejemplo profesional y, sobre todo, por siempre exigirnos ser mejores.

A la Doctora Victoria Eugenia Niño, por creer en nuestra capacidad de trabajo y estar dispuesta a compartir su conocimiento e ideas con nosotras.

Al profesor José Toribio Beltrán a Jimmy Alexander Guerrero, por su disposición y apoyo en nuestra formación.

A nuestras pacientes, por su empatía, su fortaleza y su disposición para ayudarnos.

A aquellos que nos ayudaron en las colectas, en especial Víctor García y Camilo Alegría.

Al laboratorio de inmunología y biología molecular de la Facultad de salud de la Universidad del Cauca, principalmente a la doctora Gloria Ávila, a Mirtha Olave, Juliana Fernández, Angie K. Rivera, Dayani Gutierrez y Yulieth Bermúdez, por su apoyo permanente, su capacitación y, sobre todo, su paciencia.

Al CIBUC bioterio, a sus monitores de trabajo y a don Libardo, por su compromiso con la investigación, por abrirnos las puertas y brindarnos todas las herramientas de trabajo necesarias.

Al grupo de Investigaciones Herpetológicas y Toxinológicas (GIHT) y el grupo de investigaciones en Inmunología y Enfermedades Infecciosas de la Universidad del

Cauca, por liderar propuestas de investigación de alta calidad y ofrecernos tanto apoyo a lo largo del desarrollo del proyecto.

A nuestros amigos, Camila Tovar, Alejandra Polanco, Daniela Guevara, Luis Alberto Suarez, Victor García, Valentina Alegría, Yulisa Moreno, Laura Castillo, Yesid Medina, Ingrid Ángel, Carolina Ibarra y Ángela Sofía Bilbao, por enseñarnos sobre la incondicionalidad, por su abrazo oportuno y su compañía a lo largo de nuestra vida.

A la doctora Ana Isabel Ospina por ayuda durante el proceso de captación de pacientes, su paciencia y su trabajo.

A Diego Felipe Manquillo y Marcela Alejandra Vallejo, por su participación en la ejecución del proyecto.

A nuestras pacientes, por su fortaleza, su empatía y, sobretodo, su colaboración.

A la Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad del Cauca por el financiamiento de este proyecto a partir de la Convocatoria interna de apoyo a proyectos de Semilleros de Investigación "Cultivando Semillas 2018".

1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. JUSTIFICACIÓN .....	4
3. OBJETIVOS.....	6
3.1. Objetivo General.....	6
3.2. Objetivos Específicos .....	6
4. MARCO TEÓRICO .....	7
4.1. Artritis Reumatoide .....	7
4.1.1. Etiología y Factores de Riesgo .....	8
4.1.2. Fisiopatología de la Artritis Reumatoide .....	8
4.1.3. Modulación de la Respuesta Inmune.....	10
4.1.4. Manifestaciones Clínicas de la Artritis Reumatoide .....	11
4.1.5. Signos y Síntomas Constitucionales.....	11
4.1.6. Manifestaciones Extraarticulares .....	12
4.1.7. Criterios de Clasificación y Diagnóstico de la Artritis Reumatoide .....	12
4.1.8. Estrategias Terapéuticas .....	13
4.1.9. Efectos Adversos Asociados al Uso de FAME o DMARD.....	14
4.2. Escorpiones y Componentes de Veneno .....	16
4.2.1. Generalidades de los Escorpiones .....	16
4.2.2. Componentes de Veneno de Escorpión.....	17
4.2.3. Propiedades Farmacológicas Relacionadas con Toxinas.....	17
4.2.4. Toxinas Inmunomoduladoras.....	18
4.3. Canales Iónicos.....	19
4.3.1. Canales Iónicos para Potasio .....	20
4.3.2. Canal Kv.1.3 en Linfocitos Humanos .....	21

4.3.3. Uso de Toxinas Escorpiónicos para la Modulación de la Respuesta Inmune  
22

5. ANTECEDENTES .....	24
6. MATERIALES Y MÉTODOS .....	28
6.1. Tipo de Estudio.....	28
6.2. Actividades Objetivo 1 .....	28
6.2.1. Colecta y Manteamiento de Escorpiones.....	28
6.2.2. Extracción del Veneno .....	28
6.2.3. Cuantificación y Dilución del Veneno .....	29
6.2.4. Preparación de las concentraciones de veneno.....	30
6.2.5. Obtención de las muestras de sangre para determinar concentraciones subletales del veneno Tityus sp.....	31
6.2.6. Aislamiento de Células Mononucleares de Sangre Periférica (CMSP). ....	31
6.2.7. Conteo de Células Mononucleares. ....	32
6.2.8. Ensayo de Citotoxicidad del Veneno de Tityus sp por Método de Resazurina (Alamar Blue). ....	33
6.2.9. Establecimiento de las concentraciones subletales del veneno Tityus sp.	34
6.3. Actividades Objetivo 2 .....	34
6.3.1. Captación de Pacientes con Artritis Reumatoide .....	34
6.3.2. Pruebas para Evaluar la Capacidad Inmunomoduladora del Veneno de Tityus sp.....	36
6.3.3. Estimulación Policlonal de Células Mononucleares y Evaluación del Efecto del Venenos. ....	37
6.4. Actividades Objetivo 3 .....	39
6.4.1. Detección de citoquinas en sobrenadantes de cultivo mediante el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA).....	39

6.4.2. Análisis Estadístico .....	41
6.5. Aval Ético .....	41
6.6. Financiación .....	42
7. RESULTADOS .....	43
7.1. Cuantificación de Proteínas.....	43
7.2. Concentraciones Subletales del Veneno de <i>Tityus sp</i> .....	44
7.3. Análisis Sociodemográfico de las Pacientes con Diagnóstico de AR y Controles	45
7.4. El veneno de <i>Tityus sp</i> Indujo Disminución de la Proliferación de CMSP de	
Personas con Diagnóstico de AR y Sanas en Subpoblaciones CD3+, CD3+CD4+,	
CD3CD8+ .....	48
7.5. El veneno de <i>Tityus sp</i> No Indujo Cambios Significativos En la Activación de	
CMSP de Pacientes con AR y Sanas Para las Subpoblaciones CD4+HLADR+,	
CD4+CD69+, CD8+ HLADR+, CD8+CD69+.....	51
7.6. Efecto del Veneno de <i>Tityus sp</i> en la Producción de Citoquinas.....	53
8. DISCUSIÓN .....	56
9. CONCLUSIONES.....	61
10. RECOMENDACIONES.....	63
11. BIBLIOGRAFIA.....	64

## LISTA DE TABLAS

Título de tabla	Página
<b>Tabla 1.</b> Toxinas escorpiónicas relacionadas al desarrollo de fármacos.	27

<b>Tabla 2.</b>	Promedio de las absorbancias a 280nm y resultado Y (concentración del veneno) en la curva de calibración de Pearson.	48
<b>Tabla 3.</b>	Análisis bivariado de las variables sociodemográficas de pacientes con diagnóstico de AR y controles sanos.	51
<b>Tabla 4.</b>	Hallazgos clínicos relacionados al número de articulaciones grandes comprometidas en las pacientes AR.	39

## TABLA DE CONTENIDO

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Título de Figura</b>	<b>Página</b>
Figura 1.	Esquema de la fisiopatología de la artritis reumatoide (AR)	9
Figura 2.	Algoritmo propuesto para alcanzar y mantener el objetivo de tratamiento en la artritis reumatoide. Tomado de: Diagnosis and Management of Rheumatoid Arthritis: A Review	14
Figura 3.	Extracción por electroestimulación en el último segmento metasomal del escorpión Tityus sp.	26
Figura 4.	Esquema gráfico de la dilución seriada realizada para la obtención de las 10 concentraciones de veneno tityus sp.	28
Figura 5.	Curva de calibración concentración de BSA para la cuantificación del veneno de Tityus sp.	40
Figura 6.	Efecto del veneno de Tityus sp (VTsp) sobre la viabilidad celular de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) en cultivo de 72h, mediante el ensayo fluorimétrico de resazurina (AlamarBlue).	41

Figura 7.	Diagrama de puntos (Dot plot) representativo de citometría para el porcentaje de proliferación en poblaciones celulares. CD3+, CD3+CD4+, CD3CD8+; e histograma de proliferación general en CMSP, marcadas con CFSE con presencia/ausencia de veneno Tityus sp 252, 126 y 63 µg/mL.	45
Figura 8.	Poblaciones celulares CD3+ (A), CD3+CD4+(B), CD3CD8+ (C), marcadas con CFSE y el porcentaje de proliferación con presencia/ausencia de veneno Tityus sp 252, 126 y 63 µg/mL y células sin tratamiento.	46
Figura 9.	Diagrama de puntos (Dot plot) representativo de citometría para el porcentaje de activación para las subpoblaciones celulares CD4+HLADR+ (A), CD4+CD69+ (B), CD8+HLADR+ (C), CD8+CD69+ (D)+ en CMSP cultivadas en presencia/ausencia de veneno Tityus sp 252, 126 y 63 µg/mL.	48
Figura 10.	Porcentaje de activación para las subpoblaciones celulares CD4+HLADR+ (A), CD4+CD69+ (B), CD8+ HLADR+ (C), CD8+CD69+ (D), estimuladas con PHA (2.5 µg/mL) y cultivadas en presencia/ausencia de veneno Tityus sp a concentraciones de 252, 126 y 63 µg/mL.	49

Figura 11.

Concentración de citoquinas IL-6 (A), TNF- $\alpha$  (B), IL1- $\beta$  (C), IL-10 (D) expresadas por células mononucleares de pacientes con diagnóstico de AR y pacientes sanas en sobrenadantes de cultivo, tratadas con PHA (2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y cultivadas en presencia/ausencia de veneno Tityus sp a concentraciones de 252, 126 y 63  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , durante 72h, medida mediante el Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA)

51

## RESUMEN

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune, inflamatoria crónica y progresiva, asociada con altos costos directos e indirectos, una alta tasa de discapacidad física y una disminución de la capacidad laboral. Aunque su etiología es desconocida, los mecanismos fisiopatológicos de la AR surgen como producto a un ambiente proinflamatorio basado en la interacción de mediadores y citoquinas proinflamatorias. Existe evidencia de que los venenos de escorpión son capaces de modular la respuesta inmune, mediante mecanismos celulares importantes en el desarrollo de la enfermedad.

**Objetivo:** En el presente estudio, se evaluó el efecto inmunomodulador del veneno total de *Tityus sp* sobre células mononucleares de sangre periférica de pacientes con diagnóstico de artritis reumatoide (AR) e individuos sanos. **Metodología:** Se realizó un estudio experimental, analítico, tipo caso-control con una población de 10 pacientes con diagnóstico actualizado de artritis reumatoide y 10 pacientes sanos apareados por sexo y edad. Se determinaron las concentraciones sub-letales de trabajo del veneno total de *Tityus sp*; una vez seleccionadas las dosis, se evaluó la capacidad inmunomoduladora del veneno total de *Tityus sp* para proliferación, mediante tinción con CFSE, activación en linfocitos T CD4+ y T CD8+, y la producción de las citoquinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 y TNF- $\alpha$  en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de pacientes con AR y controles, mediante las técnicas de citometría de flujo y ELISA respectivamente. **Resultados:** se encontró que el veneno produjo una disminución de la proliferación de CMSP de personas con diagnóstico de AR y sanas en subpoblaciones CD3+, CD3+CD4+, CD3+CD8+ para la concentración de 252  $\mu$ M /mL y 126  $\mu$ M /mL versus control. Además, el veneno no indujo cambios significativos en la activación celular para las diferentes subpoblaciones trabajadas. Finalmente, la concentración de IL-10 para las células sin tratamiento versus concentración de 252 y 126  $\mu$ g/mL de veneno tuvo una diferencia significativa, tanto para paciente como control, mientras que para IL-6 hubo una diferencia significativa para el diagnóstico de AR. **Conclusión:** Los resultados encontrados indican que el veneno de *Tityus sp* es una potencial fuente de moléculas inmunomoduladoras en linfocitos T, tanto de pacientes con AR, como de controles, principalmente en la proliferación y en citoquinas como IL-10. También es necesario continuar con más estudios de caracterización de este veneno.

## 1. INTRODUCCIÓN

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune, inflamatoria, sistémica crónica, caracterizada por la inflamación sinovial persistente de las articulaciones, que conduce a la destrucción progresiva del cartílago articular y al hueso subyacente (1,2). La AR afecta del 0,5-1% de la población mundial, entre los 40-50 años de edad y es cuatro veces más frecuente en mujeres. Esta enfermedad se asocia con morbilidad significativa, discapacidad severa y mortalidad prematura (2,3). La AR tiene un impacto negativo significativo en la calidad de vida de las personas que la padecen; en los casos más severos, los pacientes se ven incapaces de realizar actividades cotidianas, viéndose obligados a abandonar sus labores diarias, sin mencionar los altos costos psicológicos y socioeconómicos que conlleva (4,5). En Colombia, la prevalencia global se estima en 0.9/100 habitantes, y para el Dpto del Cauca la Cuenta de Alto Costo, en 2017, reportó una prevalencia de 0,12%, de la cual el 85% de los casos fueron mujeres y el 15% hombres (Fondo Colombiano de Enfermedades de Alto Costo 2018).

La etiología de la AR aún no es clara, sin embargo, actualmente se sabe que los mecanismos patológicos de la inflamación sinovial son consecuencia de la interacción compleja entre factores genéticos, ambientales e inmunitarios que originan la desregulación del sistema inmunitario y la degradación de la autotolerancia inmunitaria (7,8). En la fase preclínica de la enfermedad, la presentación de autoantígenos y la activación compleja de células T y B, con la consecuente liberación de mediadores y citocinas pro-inflamatorias (incluido el factor de necrosis tumoral (TNF)  $\alpha$ , interleucina (IL) -1, IL-6, IL-17) juegan un papel crucial en la fisiopatología de la AR, ya que estimulan la inflamación y la degradación del hueso y el cartílago (9,10). Aunque la artritis reumatoide se considera convencionalmente como una enfermedad mediada por células T auxiliares tipo 1 (Th1), la atención se ha centrado cada vez más en el papel de las células T auxiliares tipo 17 (Th17), un subconjunto que produce interleucina-17A, 17F, 21 y 22 y factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (11,12). La desregulación en la producción interleucina-17 de las células Th17 y estimula la diferenciación de los osteoclastos e induce la degradación directa del cartílago in vivo y ex vivo (13)

Los tratamientos actuales para estabilizar a los pacientes con AR involucran control sintomático y modificación de la enfermedad, y pueden dividirse en tres categorías generales: antiinflamatorios no esteroideos (NSAID, *del inglés*: nonsteroidal anti-inflammatory drugs); glucocorticoides, como la prednisona y la metilprednisolona; y fármacos habituales como los fármaco antirreumático modificador de la enfermedad DMARD (*del inglés*: Disease-modifying antirheumatic drugs) y así como los fármacos denominados como medicamentos de terapia Biológicos (14,15). A pesar que los DMARD sintéticos convencionales son los más utilizados en el tratamiento de la AR para lentificar su progresión estructural, pueden inducir diversos efectos adversos como alteraciones conductuales, los gastrointestinales y la hipertransaminasemia en el caso del metrotexato (16), toxicidad gastrointestinal, hematológica, renal medular y hepática para la leflunomida, cloroquina, hidroxicloloroquina, sulfasalazina, D-Penicilamina, azatioprina y ciclosporina (17,18).

Cuando no existe mejoría al implementar los DMARD convencionales, se considera la terapia biológica, que se basa en la implementación de anticuerpos dirigidos contra moléculas implicadas en la inflamación (citocinas), como los inhibidores TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 (19) y/o moléculas expresadas en la superficie de células inmunes, como CD52 (alemtuzumab) (20), CD25 (basiliximab) (21) y CD20 (rituximab)(22). Todos los tratamientos actuales para tratar la AR sólo retardan la progresión de la enfermedad y precisan acompañamiento médico exhaustivo para evitar complicaciones alternas al padecimiento (AR), por lo que se hace evidente la necesidad de terapéuticos que permitan generar cura o retraso de la enfermedad, sin secuelas tóxicas ni afectaciones invasivas.

En este sentido, componentes bioactivos de venenos de origen animal han demostrado ser herramientas valiosas para el desarrollo de nuevos fármacos, entre ellos el veneno de escorpión (23). Se sabe que uno de los componentes farmacológicos activos más importantes del veneno de escorpión son los péptidos que pueden actuar bloqueando canales iónicos, como los canales de iones calcio (Ca<sup>2+</sup>) y potasio (K<sup>+</sup>) importantes durante la activación de las células T (24,25). Estos canales iónicos son importantes en la señalización celular, comunicación celular y la regulación del potencial

de la membrana celular por tanto se encuentran como objetivos prometedores para nuevos medicamentos (26,27)

Basado en lo anterior, la hipótesis de este estudio se basa en si el veneno del escorpión *Tityus sp (Tityus (Atreus) n. sp. aff. Metuendus)* puede ejercer un efecto inmunomodulador sobre células mononucleares de sangre periférica de pacientes diagnosticados con artritis reumatoide que contribuya con la disminución de la respuesta inflamatoria.

## 2. JUSTIFICACIÓN

El sistema inmune es el responsable de detectar y eliminar amenazas endógenas y exógenas al cuerpo, sin embargo, cuando existe desregulación en los procesos de control del sistema inmune, se pueden desencadenar procesos auto inmunitarios (como en el desarrollo de AR), a menudo asociados a anomalías en la señalización celular de linfocitos T (28).

A pesar de existen numerosos tratamientos convencionales destinados a suprimir a los linfocitos T activados en desordenes autoinmunes, estos métodos presentan efectos secundarios graves asociados a su consumo, que pueden ir desde náusea, mareos, inactividad o diarrea, hasta problemas del hígado, los riñones o los pulmones(29). Siendo así, venenos producidos por animales y sus péptidos derivados o sintetizados están ganando reconocimiento por parte de la industria farmacéutica, gracias a su selectividad mejorada y toxicidad disminuida (30). Tal es el caso de los venenos de escorpión, que han demostrado tener componentes bioactivos con actividades inmunomoduladoras significativas, capaces de estimular las funciones inmunes, tanto en modelos *in vivo* como *in vitro* (27). Por ejemplo, la Kaliotoxina, una toxina aislada del escorpión *Androctonus mauretanicus*, es capaz de inhibir la activación de los canales de potasio Kv1.3 (31).

Estos inhibidores obtenidos a partir de venenos escorpiónicos, han demostrado ser eficaces en modelos animales de artritis, diabetes autoinmune, trasplantes, dermatitis alérgica y psoriasis, lo cual establece la posibilidad de que las toxinas pueden funcionar, por su actividad inmunosupresora, en el tratamiento de padecimientos autoinmunes en humanos (32,33).

El presente trabajo, realizó un estudio de la capacidad inmunomoduladora del veneno total del escorpión *Tityus sp. (Atreus) n. sp. aff. Metuendus (Tityus sp)*, una especie endémica de Colombia, reportada en el casco urbano del municipio de Popayán, en el departamento del Cauca, de la cual se conocen datos concernientes a la composición química y actividad biológica del veneno. Estudios a partir de una biblioteca de cDNA de la glándula de veneno, revelaron que este está compuesto, entre otras, por toxinas específicas para canales de potasio clasificadas en tres subfamilias: subfamilia  $\alpha$ -KTx15,  $\alpha$ -12 y  $\alpha$ -KTx18, adicionalmente, a partir del veneno extraído, fueron

secuenciadas cuatro toxinas capaces de disminuir la corriente de K<sup>+</sup> en células de ganglio dorsal de Ratas *in vitro* (34).

Santoyo y colaboradores (2016) afirman que, si bien los mecanismos moleculares de la AR incluyen ciertos tipos celulares y la expresión de un amplio número de citocinas proinflamatorias en los tejidos y sus alrededores, algunas otras moléculas podrían tener un papel importante en la patogénesis de la enfermedad(35). Uno de los recientes candidatos como blanco terapéutico en la patología de la AR, es el canal Kv1.3, teniendo en cuenta que esta proteína regula el flujo de iones potasio y activa rutas de señalización en diversos tipos celulares, incluyendo los linfocitos T. Estas células son elementos clave en el desarrollo de la artritis reumatoide, ya que inducen la síntesis de citocinas proinflamatorias en tejidos afectados(35).

Con base en la información arrojada por Morales Duque en el 2013, la hipótesis planteada en este estudio buscó determinar si este veneno puede modular de manera eficiente la respuesta inmune de las células; lo anterior, basado en el hecho de que modulación de la respuesta es ejercida mediante el canal Kv1.3, dado que este último se expresa altamente en células T de memoria (T<sub>EM</sub>) CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> involucrados en la coordinación de la respuesta inmune así como en la autotolerancia inmunitaria. Además, alteraciones en su fisiología desempeñan un papel importante en la progresión de ciertas enfermedades autoinmunes, alergias, desarrollo de tumores e inflamación crónica. Por ello, encontrar moléculas que modulen las funciones de estas células, ya sea aumentando o atenuando sus funciones efectoras, resulta importante en el tratamiento de diversas patologías(32,35,36).

Así, este proyecto se realizó con la intención de comprender los mecanismos inmunológicos básicos implicados en la, proliferación, estado de activación y presencia de citoquinas, después del tratamiento con concentraciones subletales del veneno de escorpión. Se encontró que el veneno total de *Tityus sp* si induce un efecto inmunomodulador de las en CMSP, relacionado con la concentración de veneno mas no el diagnóstico de la enfermedad.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo General

Evaluar el efecto inmunomodulador del veneno del escorpión *Tityus sp* sobre células mononucleares de sangre periférica de pacientes con diagnóstico de artritis reumatoide e individuos sanos.

#### 3.2. Objetivos Específicos

- Determinar la concentración mínima citotóxica y la actividad citotóxica del veneno del escorpión *Tityus sp.* sobre células mononucleares de sangre periférica de individuos sanos.
- Evaluar el efecto de dosis sub-letales del veneno del escorpión *Tityus sp.* sobre la capacidad de proliferación y activación de linfocitos TCD4<sup>+</sup> y TCD8<sup>+</sup> aislados de células mononucleares de sangre periférica de pacientes con diagnóstico de artritis reumatoide e individuos sanos.
- Determinar el efecto de dosis sub-letales del veneno del escorpión *Tityus sp.* sobre los niveles de las citoquinas IL-6, TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$ , IL-10 expresados por células mononucleares de sangre periférica de pacientes con diagnóstico de artritis reumatoide e individuos sanos.

## 4. MARCO TEÓRICO

### 4.1. Artritis Reumatoide

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad inflamatoria, crónica, degenerativa y sistémica que afecta principalmente las membranas sinoviales de las articulaciones causando dolor, hinchazón, entumecimiento y en algunos casos, discapacidad severa (11). El proceso de inflamación sinovial persistente puede provocar daño progresivo de las articulaciones, así como destrucción de hueso y cartílago, culminando con deformidad en las extremidades implicadas (37). Estas manifestaciones generalmente impactan de manera negativa a las personas que padecen la enfermedad, por lo que su capacidad laboral, sus interacciones sociales y por consiguiente, su calidad de vida se ven perjudicados, sin mencionar los altos costos que se generan al sistema de salud (4,38).

La AR tiene una distribución global y abarca aproximadamente al 1% de la población adulta, siendo más frecuente en mayores entre los 40-60 años, aunque pueden presentarse casos de AR juvenil. Además, suele presentarse mayormente en mujeres, en relación 2-3:1 con hombres. Con respecto a Colombia, Fernández-Ávila y colaboradores (2019), reportaron una prevalencia del 0,52% según lo registrado por el Sistema Integrado de la Protección Social (durante el periodo comprendido entre 2012-2016), con una relación mujer: hombre de 4.2:1 y con mayor prevalencia para el grupo etario de 70-74 años, mientras para el Dpto. del Cauca se reportó una prevalencia de 0,44% (39).

Por otro lado, las tasas de incidencia aumentan con la edad y parecen alcanzar una meseta a partir de los 60 años (37), así como también las tasas de mortalidad suelen verse más elevadas en pacientes con AR que en la población general. Por consiguiente, la esperanza de vida de los pacientes pasa a ser de tres a diez años menor que en una persona sana, de acuerdo con la gravedad de la enfermedad, edad de inicio y comorbilidades presentes (40).

#### **4.1.1. Etiología y Factores de Riesgo**

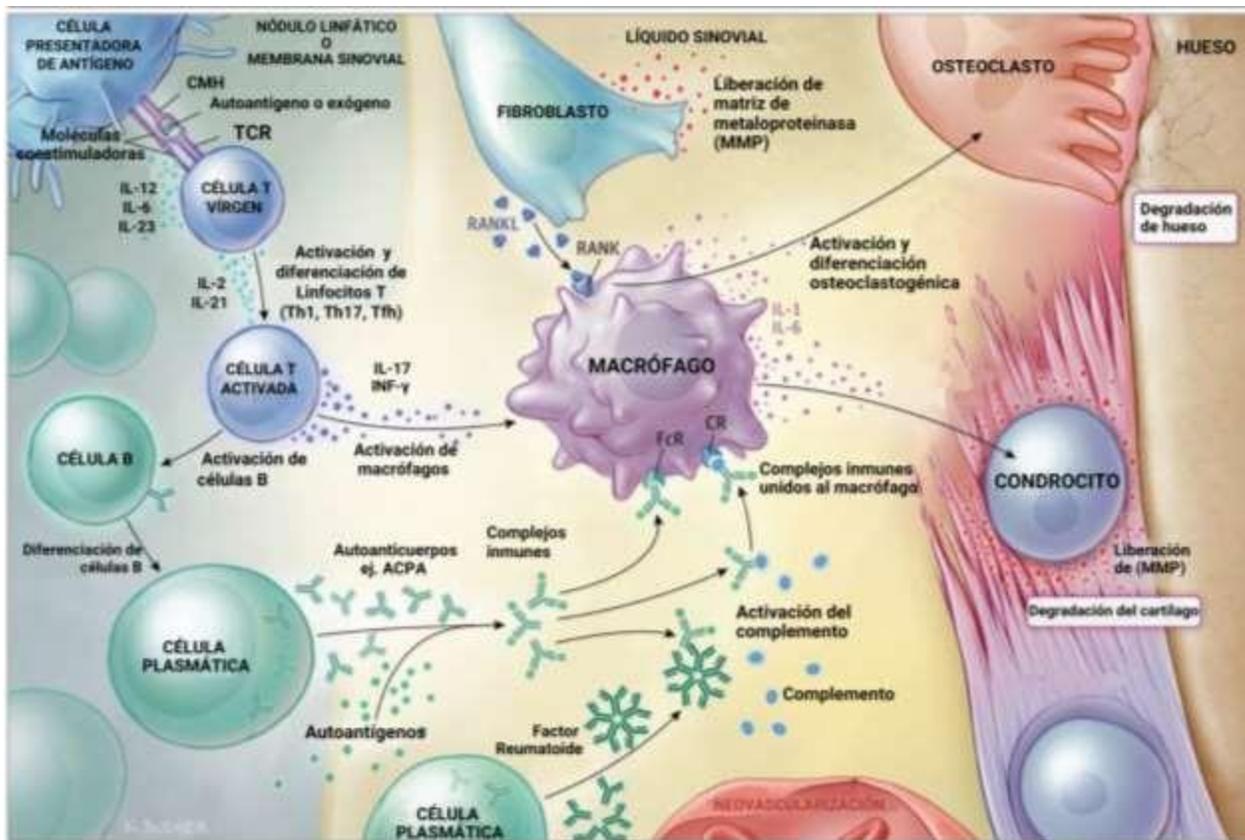
La AR se considera una enfermedad de etiología desconocida, sin embargo, se han asociado diferentes factores de riesgo, considerándola una enfermedad multifactorial (15). Uno de los factores mayormente implicado en el desarrollo de AR es el genético; se ha estudiado que algunos polimorfismos presentes en genes que codifican para HLA-DR (porción del complejo mayor de histocompatibilidad), como HLADR1- HLADR4 contribuyen en la producción de anticuerpos contra proteínas anti-citrulinadas (ACPA, del inglés, *anti-citrullinated protein antibodies*); estas proteínas son importantes dado a que se generan mediante la adición de citrulina en residuos de arginina, pasando de peptidil-arginina a peptidil-citrulina, que por el cambio de de cargas (de positiva a neutra) hace que no puedan ser reconocidas como propias por el sistema inmune e inicie el proceso autoinmune (41). Otra molécula asociada a la aparición de AR es la proteína Tirosina fosfatasa no receptora tipo 22 (PTPN22), debido a la aparición de polimorfismos asociados a pacientes con AR y ACPA positivos entre varias etnias (42).

Por otro lado, existe evidencia de que factores infecciosos como el virus de Epstein Barr (EBV), retrovirus, virus de la Hepatitis C y otros agentes como *Helicobacter pylori*, *Porphiromonas gingivalis*, *Agregatibacter actinomycetecomitans* podrían ser desencadenantes de la autoinmidad en la AR, debido a que sus productos metabólicos pueden inducir la citrulinación de proteínas y provocar la liberación de APCA (43,44). Otro factor es el hormonal, donde se ha asociado el aumento de estrógenos en pacientes con AR (45). Y factores ambientales, como exposición a agentes nocivos como: el humo del cigarrillo, polvo de sílice y nanomateriales derivados del carbono, que pueden provocar una respuesta inflamatoria (15).

#### **4.1.2. Fisiopatología de la Artritis Reumatoide**

El tejido base del proceso inflamatorio en la AR es la membrana sinovial, por lo tanto, luego de inducirse la respuesta autoinmune, con la presentación de antígenos hacia proteínas propias, se inicia el proceso de inflamatorio articular (1). Hay tres

procesos patológicos en la articulación que son independientes pero que interactúan entre sí; en primer lugar, la inflamación crónica caracterizada por un infiltrado de células principalmente mononucleares, incluidos linfocitos, monocitos y células dendríticas. En segundo lugar, la hiperplasia de la membrana sinovial, por el incremento de fibroblastos sinoviales, y además su transformación en órgano linfoide secundario con la presencia, en muchos casos, de centros germinales donde se producen más auto-anticuerpos (FR y ACPA). Por último el aumento de la actividad osteoclastogénica debido a la constante producción de citoquinas y quimiocinas proinflamatorias que contribuyen al reclutamiento de nuevas células y al daño progresivo de las articulaciones (Figura 1) (14,46) .



**Figura 1.** De izquierda a derecha: la célula presentadora de antígenos presenta un autoantígeno a la célula T virgen mediante una molécula de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) (por medio del epítipo compartido), con el apoyo de las moléculas coestimuladoras, rompiendo la auto tolerancia periférica. Aquí, la célula T se activa y se diferencia en célula auxiliar folicular (THF) TH1, TH17, iniciando la liberación de citoquinas quienes a su vez activan macrófagos y también proporcionan ayuda en la activación de células B. Esta última se diferencia en una célula plasmática e inicia la producción de auto-anticuerpos (ej. ACPA). Los auto-anticuerpos se unen a los antígenos correspondientes formando complejos inmunológicos en la membrana sinovial en donde se acumulan. Estos complejos inducen la formación de anticuerpos-IgG (Factor reumatoide) mediante su porción Fc, provocando la activación del

complemento. Estos inmunocomplejos pueden unirse a macrófagos y otras células para activarlas y secretar citoquinas proinflamatorias y otros mediadores de inflamación (TNF, IL-6, INF- $\gamma$  o IL-17) y además de la activación de macrófagos por linfocinas. Por otro lado, los fibroblastos sinoviales, quienes expresan el receptor activador del factor nuclear kappa B (RANK) ligando (RANKL), en presencia de citoquinas proinflamatorias, pueden activar los macrófagos los cuales se diferencian en osteoclastos, a través de pre-osteoclastos, produciéndose la resorción ósea y a unión de cartílago y hueso. A su vez las citoquinas también activan a los condrocitos quienes secretan enzimas y degradan el cartílago (Tomado de: Tomado de: *Diagnosis and Management of Rheumatoid Arthritis: A Review* (47)

### **4.1.3. Modulación de la Respuesta Inmune**

Aunque la AR se considera convencionalmente como una enfermedad mediada por células T colaboradoras tipo Th1, la atención se ha centrado en el papel de las Th17 (11), ya que citocinas como TGF- $\beta$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-21 y IL-23 producidas por células dendríticas y macrófagos, presentes en el tejido sinovial, promueven la diferenciación Th17 y suprimen la diferenciación de las células T reguladoras, desplazando la homeostasis de las células T hacia la inflamación (7,48).

En AR las células Th17 se han asociado a procesos inflamatorios crónicos promovidos fundamentalmente por el efecto pro-inflamatorio de la citoquina IL-17, encontrada con un incremento de expresión principalmente en zonas afectadas (49); además esta citoquina potencia la actividad de IL-1 y TNF- $\alpha$  (factor de necrosis tumoral  $\alpha$ ), estimula la diferenciación de los osteoclastos y promueve la destrucción de cartílago y hueso (50). El TNF- $\alpha$  también participa en la activación de neutrófilos, linfocitos T, estimula la producción de citocinas y co-estimula la producción de anticuerpos (51). La IL-6 fue identificada como un factor producido por los linfocitos T y al igual que la IL-1 contribuye al desarrollo de osteoporosis y destrucción articular en AR mediante la proliferación de los fibroblastos sinoviales y de la diferenciación de los osteoclastos

Por último, el proceso inflamatorio crónico implica diversos mecanismos incluyendo la producción de auto-anticuerpos, la activación de linfocitos T y la secreción de factores solubles pro-inflamatorios y efectores como son IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , entre otros, (52).

#### **4.1.4. Manifestaciones Clínicas de la Artritis Reumatoide**

En un caso típico de artritis reumatoide se observa un desarrollo de signos y síntomas de manera lenta que puede durar semanas o meses. A menudo, el paciente nota primero rigidez en una o más articulaciones, generalmente acompañado de dolor al moverse y de sensibilidad en la articulación como consecuencia de la inflamación de las articulaciones, tendones y bolsas sinoviales (53). El paciente suele señalar rigidez matinal temprana en las articulaciones, que dura más de 1 h y que desaparece con la actividad física (54).

Además, de modo característico, en la AR las primeras articulaciones afectadas son las pequeñas de las manos y pies; principalmente las articulaciones interfalángicas proximales (PIP) y metacarpofalángicas (MCP) de las manos, las muñecas y las articulaciones pequeñas de los pies, incluidas las articulaciones metatarsfalángicas (MTP), que comúnmente posee una distribución simétrica (54). De igual manera, los hombros, codos, rodillas y tobillos también pueden verse afectados en muchos pacientes (55).

Por otro lado, las manifestaciones avanzadas de la AR pueden interferir en el funcionamiento físico, la productividad laboral y la calidad de vida de los pacientes. Cuando la enfermedad no ha sido tratada, la acumulación de daño articular llega al punto de ser irreversible provocando discapacidad; el 80% de estos pacientes tendrán articulaciones desalineadas y el 40% no será capaz de laborar en los 10 años posteriores al inicio de la enfermedad (47).

#### **4.1.5. Signos y Síntomas Constitucionales**

Los síntomas constitucionales pueden preceder el inicio de la AR e incluso pueden significar un mayor riesgo en el curso de la enfermedad. Aquí se incluye, la pérdida de peso, fiebre, fatiga profunda y malestar, debilidad muscular generalizada, bajo estado de ánimo, depresión, rigidez matutina prolongada y, la forma más extrema, caquexia reumatoide (caracterizado principalmente por la pérdida de masa muscular esquelética,

de fuerza y de rendimiento físico). Estas características son más difíciles de definir y su inclusión en las manifestaciones de la AR puede variar (56).

#### **4.1.6. Manifestaciones Extraarticulares**

Cuando los pacientes con AR no son tratados a tiempo pueden presentar manifestaciones extra articulares, que por lo general obedecen a diferentes antecedentes; tabaquismo, traumas físicos, inicios de discapacidad física y positividad para criterios serológicos como el factor reumatoide o anticuerpos contra proteínas anti-citrulinadas (ACPA) (57,58). Así, entre las manifestaciones extraarticulares más frecuentes se encuentran los nódulos subcutáneos, vasculitis, síndrome de Sjogren secundario, nódulos pulmonares, pericarditis y pleuritis, nefritis, glomerulonefritis y anemia (59–61).

#### **4.1.7. Criterios de Clasificación y Diagnóstico de la Artritis Reumatoide**

Los criterios actuales para el diagnóstico y la clasificación de la Artritis reumatoide se aplicarán a una determinada población diana que debe tener las siguientes características:

Presentar al menos una articulación con sinovitis aguda (al menos una articulación inflamada) y que dicha sinovitis no pueda ser explicada por el padecimiento de otra enfermedad.

Tener una puntuación mayor o igual a 6 en el sistema de puntuación presentado en el Anexo 3, que considera la distribución de la afectación articular, serología del Factor Reumatoide (FR) y/o ACPA, aumento de los reactantes de fase aguda y la duración igual o superior a 6 semanas.

#### **4.1.8. Estrategias Terapéuticas**

La artritis reumatoide actualmente no tiene cura, sin embargo, las manifestaciones más comunes son tratadas mediante el uso de fármacos dirigidos al control sintomático a corto plazo y el inicio simultáneo de una estrategia de fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (FAME o DMARD por sus siglas en inglés) (62). Los DMARD son una familia de medicamentos se define como un medicamento que interfiere con los signos y síntomas de la AR, mejora la función física e inhibe la progresión del daño articular. Pueden, además, producir un alivio general de la sintomatología, y son utilizados como tratamiento para diversas enfermedades autoinmunes (29).

Debido a la gravedad en la sintomatología presente en un paciente con AR avanzada, el diagnóstico temprano juega un papel importante para evitar el progreso desmedido de la misma, por lo que es vital empezar con el control eficaz y consistente de los síntomas. Esto es posible debido al desarrollo de tratamientos como los fármacos antiinflamatorios no esteroideos, glucocorticoides y FAME, ya sean convencionales, sintéticos dirigidos y/o biológicos (51,62). En este sentido, en 2010, el comité internacional NICE (por sus siglas: *The National Institute for Health and Care Excellence*), desarrolló la estrategia Treat-to-Target (T2T) para tratar de manera eficaz a los pacientes. Esta iniciativa consiste en tratar y adaptar la terapia, según sea necesario, para obtener una mejora en un índice de actividad de la enfermedad de al menos el 50% en 3 meses y así tener más del 50% de probabilidad de alcanzar una baja actividad de la enfermedad o remisión a los 6 meses (63) (ver figura 2)

Primera línea de tratamiento	<b>Estrategia estándar</b> Fase inicial csDMARD (metotrexato) + glucocorticoides a corto plazo	<b>Estrategia alternativa</b> Si el metotrexato es contraindicado, usar otro DMARDcs (leflunomida o sulfasalazina)	<b>Resultados y acciones posteriores</b>		
			<b>Objetivo alcanzado</b> Continúa con tratamiento de primera línea	<b>Objetivo sostenido</b> Pasar a la fase de remisión	<b>Objetivo fallido</b> Pasar a la segunda fase del tratamiento
Segunda línea de tratamiento	<b>Estrategia estándar</b> Continuar con csDMARD y adicione un bDMARD (en combinación DMARDcs + DMARDb) o continúe con csDMARD y adicione DMARDsd (en combinación csDMARD + DMARDsd)	<b>Estrategia alternativa</b> Si no se presenta un factor de mal pronóstico, cambie a otro DMARDsc en monoterapia o adicione otro DMARDsc	<b>Resultados y acciones posteriores</b>		
			<b>Objetivo alcanzado</b> Continúa con tratamiento de segunda línea	<b>Objetivo sostenido</b> Pasar a la fase de remisión	<b>Objetivo fallido</b> Pasar a la tercera fase del tratamiento.
Tercera línea de tratamiento	<b>Estrategia estándar</b> Usar cualquier otro DMARDb o DMARDsd en combinación con DMARDsc utilizado	<b>Estrategia alternativa</b> No aplica	<b>Resultados y acciones posteriores</b>		
			<b>Objetivo alcanzado</b> Continúa con tratamiento de tercera línea	<b>Objetivo sostenido</b> Pasar a la fase de remisión	<b>Objetivo fallido</b> Repetir la tercera línea de tratamiento con otras drogas hasta que se logre el objetivo
Fase de remisión	<b>Estrategia estándar</b> Considere disminuir la terapia existente reduciendo las dosis o extendiendo los intervalos entre tratamientos	<b>Estrategia alternativa</b> Continuar la terapia según las preferencias del paciente o del médico	<b>Resultados y acciones posteriores</b>		
			<b>Objetivo alcanzado</b> No aplica; pacientes que ya lograron el objetivo	<b>Objetivo sostenido</b> Continuar reduciendo y revisando el estándar de la fase de remisión y la estrategia alternativa	<b>Objetivo fallido</b> Reintentar la estrategia previamente efectiva

**Figura 2.** Algoritmo propuesto para alcanzar y mantener el objetivo de tratamiento en la artritis reumatoide. Tomado de: Diagnosis and Management of Rheumatoid Arthritis: A Review (47).

#### 4.1.9. Efectos Adversos Asociados al Uso de FAME o DMARD

El MTX es considerado como la piedra angular del tratamiento de la AR, ya sea como tratamiento único, o en combinación con otros DMARD, sin embargo, se ha vinculado con la aparición de efectos secundarios que se asocian con una tasa de interrupción del 16% (64). En ese sentido, el MTX requiere un control regular para optimizar la dosificación y evaluar sus efectos inmunosupresores y hepatotóxicos mediante análisis de sangre frecuentes.

Los efectos secundarios con el uso de MTX dependen de las dosis, el modo de aplicación y la duración del tratamiento. Los efectos secundarios comunes de MTX en dosis bajas son anomalías hematológicas (trombocitopenia y leucopenia), estomatitis, problemas gastrointestinales (p. Ej., Anorexia, heces blandas, náuseas o malestar estomacal), elevación de las enzimas hepáticas o síntomas del sistema nervioso central como fatiga o dolor de cabeza. Se ha reportado pocos casos de nefropatía e insuficiencia renal en altas dosis (65).

Para el caso de otras terapias convencionales como Leflunomida, se ha observado que la tasa de interrupción del tratamiento debido a efectos secundarios es similar que con metotrexato (66). Dentro de estos se encuentran cambios en la función hepática (pueden ser reversibles al reducir la dosis o con la suspensión del medicamento), sin embargo, la hepatotoxicidad puede ser grave. Por otra parte, la Sulfasalazina puede provocar efectos adversos en monoterapia o terapia combinada en los primeros meses de tratamiento, dentro de estas se incluyen efectos idiosincrásicos (Relacionados con la hipersensibilidad/inmunitarios) y relacionados con la dosis, que suelen ser frecuentes bajo este tratamiento, especialmente los relacionados a problemas gastrointestinales, sistema nervioso central, cutáneos y hematológicos (17). Por tanto, cuando se presenta alguno de estos efectos es necesaria la suspensión inmediata del fármaco y los pacientes no deben ser expuestos al mismo fármaco de nuevo.

Por otro lado, en los fármacos biológicos modificadores de la enfermedad se han observado efectos adversos relacionados con infecciones graves. Los inhibidores de TNF-  $\alpha$  como el Infliximab (IFX), Adalimumab (ADA) y Certulizumab (CZP), se han asociado a infecciones graves, riesgo de linfoma, infecciones latentes e insuficiencia cardíaca, mientras que el Etanercept (ETN) tiene un perfil de toxicidad similar a IFX y ADA (67,68). De igual manera para las terapias dirigidas a células B como el Rituximab se reportaron infecciones, neutropenia y aparición tardía y reacciones mucocutáneas (69).

## 4.2. Escorpiones y Componentes de Veneno

### 4.2.1. Generalidades de los Escorpiones

Los escorpiones son animales pertenecientes al Filo Arthropoda, sub-filo Chelicerata, clase Arachnida y orden Scorpiones (Brusca y Brusca, 2003). Actualmente han sido descritas 22 familias y aproximadamente 1.500 especies distribuidas en todo el mundo. En Colombia se encuentran cuatro familias, con un total de 55 especies: Chactidae (3 géneros, 16 especies), Diplocentridae (un género, dos especies), Liochelidae (antes Ischnuridae: un género, una especie) Buthidae (4 géneros, 36 especies) (72), siendo esta última, la familia con los venenos más estudiados. En el país se encuentran con 4 géneros, para esta familia (*Ananteris*, *Centruroides*, *Rhopalurus* y *Tityus*), de los cuales los generos *Centruroides* y *Tityus* son los de mayor importancia médica. La familia Buthidae se caracteriza por su alto número de especies, la potencia y neurotoxicidad de un veneno compuesto por proteínas y péptidos, con efecto neurotóxico en membranas excitables y en terminaciones pos ganglionares simpáticas y parasimpáticas, causando alteraciones fisiológicas que pueden ser letales en humanos y mamíferos (73); y finalmente, su potencial farmacológico e importancia clínica exhibida por numerosas especies altamente representativas de esta familia,

*Tityus sp.* es una especie no descrita que se encuentra en la ciudad de Popayán, Colombia, perteneciente al género *Tityus*. Se caracteriza por tener hasta 65 mm de longitud, coloración negra, con algunos individuos rojizos, y un marcado dimorfismo sexual con hembras de cuerpo más robusto y machos de palpos robustos (34).

Estos animales poseen un plan corporal muy conservado, compuesto de un tronco y una región anterior o abdomen (73,74). La región anterior o abdomen está conformada por segmentos de quitina y sus últimos segmentos dan lugar al metasoma, también conocido como cola, que termina en el telson, zona donde se encuentran las glándulas productoras de veneno y el aguijón que utilizan para inocularlo (74).

#### **4.2.2. Componentes de Veneno de Escorpión**

El veneno escorpiónico está compuesto por enzimas, nucleótidos, lípidos, aminas biogénicas, péptidos y polipéptidos, que han sido descritos como las principales causas de la actividad neurotóxica causada por el envenenamiento escorpiónico. Estos compuestos varían en relación con la especie de escorpión, cambios ambientales y ubicación geográfica entre otras características (75,76).

Es importante resaltar que la letalidad del veneno de escorpión radica en la presencia de toxinas dirigidas a sitios específicos de la célula, como receptores proteicos o canales iónicos, modificando así el comportamiento de los mecanismos de selección iónica imprescindibles para la fisiología celular. Estas alteraciones se presentan debido a que las toxinas de escorpiones afectan la permeabilidad a iones de las células excitables; sobre esto, se han descrito diversas familias de toxinas que interactúan con los canales iónicos, entre las que se destacan: neurotoxinas moduladoras de canales de Na<sup>+</sup>, neurotoxinas bloqueadoras de canales de K<sup>+</sup>, neurotoxinas para canales de Cl<sup>-</sup> y neurotoxinas para canales de Ca<sup>2+</sup> (76).

#### **4.2.3. Propiedades Farmacológicas Relacionadas con Toxinas**

Desde el siglo XVIII, las toxinas animales se han considerado herramientas importantes para la investigación farmacológica en la terapia clínica. La alta especificidad y potencia de toxinas ha permitido el uso de toxinas como sondas moleculares para descifrar funciones fisiológicas y mecanismos de la enfermedad (77). De la misma forma, diferentes componentes de veneno de escorpión se han descrito como candidatos potenciales para el desarrollo de fármacos con actividad específica, entre las que se incluyen actividades antimicrobianas, antiviricas, antimalaria, inmunosupresoras y anticancerígenas (25). Algunos medicamentos aprobados en las últimas décadas se basan en toxinas o sus compuestos, siendo opciones terapéuticas nuevas y eficientes (78), (ver tabla 1).

**Tabla 1.** Toxinas escorpiónicas relacionadas al desarrollo de fármacos.

<b>Toxina/sustancia</b>	<b>Especie de origen</b>	<b>Efecto</b>	<b>Fármaco</b>
<b>Clorotixina Sintética</b>	Escorpión ( <i>Leiurus quinquestriatus</i> )	Glioma	Estudios Clínicos
<b>Iberiotoxina</b>	Escorpión ( <i>Buthus tamulus</i> )	Inhibidor de canales de K <sup>+</sup> activados por Ca <sup>+</sup>	Estudios preclínicos
<b>Caribdotoxina</b>	Escorpión ( <i>Leiurus quinquestriatus</i> )	Bloquea canales de K <sup>+</sup> activados por Ca <sup>+</sup>	Estudios preclínicos

Nota: Tomado y modificado de Galíndez-C, 2018 (78)

Teniendo en cuenta el objetivo de esta investigación, se dará énfasis en las propiedades inmunomoduladoras relacionadas a venenos de escorpión.

#### **4.2.4. Toxinas Inmunomoduladoras**

Se ha demostrado que hay toxinas biológicamente activos presentes en venenos de escorpión que desempeñan roles vitales en la respuesta inmune al desencadenar la liberación de mediadores de la respuesta anti y pro-inflamatoria (73), además de inducir procesos de proliferación, diferenciación y secreción de citoquinas en linfocitos T (79).

Existen toxinas capaces de inducir un incremento en los niveles plasmáticos de diversas citoquinas, como la IL-1, IL-6, IL-8, IFN- $\gamma$  entre otras, producidos por las células inmunitarias (80), además de evidenciar capacidad inmunomoduladora en las linfocitos T, las cuales disminuyen la expresión de moléculas de activación como CD69, CD25 y HLA-DR y la capacidad de proliferación (81); Tal es el caso de la toxina Ts1 y Ts6 del veneno de *Tityus serrulatus*, que estimula la producción de Óxido Nítico (NO), IL-6 y factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) en macrófagos, mientras que la toxina Ts2 inhibe la producción de NO, IL-6 y TNF- $\alpha$ , y estimula la producción de IL-10, sugiriendo una

actividad anti-inflamatoria para esta toxina (82). La toxina Cn5 de *C. noxius* aumenta los niveles de citoquinas intermediarias en la diferenciación de linfocitos T cooperadores (IL-1, IL-6 e IL-12) y presenta efecto significativo en la secreción de IL-2, factor de crecimiento de linfocitos T, promoviendo mecanismos de diferenciación, a través de la secreción de citoquinas específicas, sin alterar el proceso de proliferación en linfocitos T(32).

Asimismo, se ha reportado que los venenos de escorpión y sus derivados aumentan la secreción de citoquinas intermediarias en la diferenciación de linfocitos T (CD4+), como IL-12 en células mononucleares (83). La IL-12 es una citocina esencial en el proceso de diferenciación de linfocitos Th1, ya que promueve la secreción de IFN- $\gamma$  por parte de células NK y, a su vez, amplifica las señales que intervienen en la diferenciación del perfil Th1, por lo que son importantes en los procesos de proliferación, activación y diferenciación (84).

#### **4.3. Canales iónicos**

Los canales iónicos (CI), son estructuras proteicas presentes en la membrana de todas las células animales, integrados por cadenas largas de residuos de aminoácidos, que en conjunto forman estructuras, cuya función es permitir el libre paso a moléculas de tamaño y carga adecuadas a través de la membrana celular (85). De esta manera, la importancia fisiológica de los canales iónicos recae en la regulación de diversos procesos. Los canales iónicos cumplen numerosas funciones, tales como traducción de señales, propagación de la señal eléctrica, homeostasis iónica, regulación del volumen celular, diferenciación y proliferación celular, apoptosis y transporte trans-epitelial (85–87).

Los CI poseen características particulares que los hacen altamente especializados, como la velocidad para transportar iones, las proteínas que conforman la estructura del canal se abren o cierran para permitir o impedir el flujo de iones en ambos sentidos, elevada selectividad hacia algún tipo de ion en específico dada su carga eléctrica y su tamaño (88). Esta última característica, hace que sólo se permita el paso

de partículas inorgánicas, de esta manera, existen CI para Sodio (Na<sup>+</sup>), Potasio (K<sup>+</sup>), Cloro (Cl<sup>-</sup>) y Calcio (Ca<sup>2+</sup>) (85,87,88).

Se ha evidenciado que la actividad inmunomoduladora de los venenos de escorpión, se asocia principalmente por su acción sobre canales iónicos presentes en las células inmunes, entre estos, en relación con enfermedades autoinmunes, se resalta el papel de la modulación de los canales iónicos para Potasio, tal como se describe a continuación.

#### **4.3.1. Canales Iónicos para Potasio dependientes de voltaje**

Los canales de potasio dependientes de voltaje (Kv) son parte de una familia de proteínas de membranas diversa y ubicuas, codificadas por más de 75 genes diferentes. La familia Kv se encuentra subdividida en 12 grupos catalogados desde Kv1 hasta Kv12, implicados en la regulación del potencial de membrana al controlar la tasa de salida de potasio de la célula, por lo que modulan un gran número de procesos celulares, tales como el funcionamiento de tejidos excitables; regulación de la duración y frecuencia de los potenciales de acción que permiten el flujo de K<sup>+</sup> que repolariza la membrana de la célula; regulación de la respuesta inmune, el volumen celular, la secreción de hormonas y otros procesos relevantes para la homeostasis del cuerpo (89). Sumado a esto la familia Kv juega un papel importante en una gran variedad de funciones fisiológicas como el crecimiento celular, la regulación del crecimiento celular y la activación de células T (90).

Dentro de las familias de Kv, los Kv1 son los de mayor abundancia en las células inmunes tales como los linfocitos, En este sentido, teniendo en cuenta que la activación y proliferación de las células T depende de un flujo entrante y equilibrado de calcio para una eficiente señalización de transducción y transcripción de genes, el canal Kv1.3 contribuye con el control de la señalización al proveer una fuerza eléctrica impulsora para la entrada de Ca<sup>2+</sup> (Santoyo-Sánchez, et al., 2016). Los canales relevantes en la activación de los linfocitos T son Kv1.3, KCa3.1, Orai1+ molécula de interacción estromal 1 (STIM1), canal de Ca<sup>2+</sup> que activa la liberación de Ca<sup>2+</sup> (CRAC), TRPM7 e hinchazón de Cl<sup>-</sup>, los cuales comprenden una red que realiza funciones vitales para la homeostasis

celular en curso y para la activación de las células T, ofreciendo posibles objetivos para la inmunomodulación (91).

#### **4.3.2. Canal Kv.1.3 en Linfocitos Humanos**

Comes y colaboradores en el 2013 describieron a Kv1.3, como uno de los subgrupos que pertenece a la familia Kv1 de los canales de potasio, que participa en la diferenciación de tejidos y en el crecimiento celular, así como en la señalización de las células T efectoras de memoria en humanos, además, presenta una alta tasa de expresión en linfocitos, hígado, músculo esquelético, testículos y osteoclastos. Este canal presenta una tasa elevada de expresión en los linfocitos(93).

Los autores explican que, durante la proliferación de linfocitos, la acción combinada de Kv1.3 y KCa1 proporciona suficiente hiperpolarización para permitir la entrada de  $Ca^{2+}$  necesaria para la proliferación. El cambio negativo resultante en el potencial de membrana genera la fuerza impulsora necesaria para la entrada de  $Ca^{2+}$  a través de los canales de  $Ca^{2+}$  (CRAC) desde el espacio extracelular y su liberación de los depósitos internos(92,94). Por lo tanto, mientras que la tasa de proliferación celular es óptima dentro de una ventana de volumen celular y parece estar controlada por puntos de control de tamaño celular alto y bajo, los cambios en el potencial de membrana y el volumen celular son necesarios para la progresión del ciclo celular, los cuales requieren la acción de los canales de  $K^{+}$  (92,95).

Por su parte, se ha demostrado que Kv1.3 cumple una función importante durante la activación de los linfocitos T (92,96) asociada a un aumento en la conductancia de  $K^{+}$  regulada por voltaje, además que, una inhibición selectiva de los canales Kv1.3 previene la activación celular y se ha demostrado que exhibe efectos inmunosupresores.

La actividad del canal es controlada de una manera compleja por cambios en el potencial de membrana y por procesos de fosforilación de treonina, serina y tirosina (Santoyo-Sánchez, et al., 2016). La serotonina y la insulina pueden regular a la baja la actividad del canal Kv1.3. Por ello, el canal Kv1.3 tiene una relación estrecha con el desarrollo enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide, la diabetes mellitus de tipo I e hipersensibilidad de tipo retardado (97).

Los canales Kv1.3 se activan mediante el proceso de despolarización de la membrana y su acción causa una hiperpolarización de ésta haciendo que la incorporación de  $Ca^{2+}$  sea más fuerte desde el espacio extracelular a través de CRAC. Este canal no es el único que actúa en la sinapsis inmunológica, sin embargo su bloqueo puede causar la inactivación de los linfocitos T, por lo que resulta ser un blanco de bastante interés farmacológico (99).

#### **4.3.3. Uso de Toxinas Escorpiónicos para la Modulación de la Respuesta Inmune**

El atractivo por Kv1.3 como blanco terapéutico se debe a la búsqueda y desarrollo de bloqueadores de Kv1.3 que suprimen la activación de las células CCR7-TEM, como consecuencia de una estimulación antígena durante el desarrollo de la enfermedad(35). CCR7 y sus ligandos, CCL19 y CCL21, son responsables de dirigir la migración de células T y células dendríticas hacia los ganglios linfáticos, donde estas células juegan un papel importante en el inicio de la respuesta inmune. CCR7 es un requisito previo para que las células inmunitarias se alojen en los órganos linfoides secundarios. Además, se ha acumulado evidencia en los últimos años que indica que la señalización mediada por CCR7 influye en numerosas funciones(98). En las células T, CCR7 es responsable de una variedad de eventos de proactivación, como la velocidad migratoria o el factor coestimulador en el cebado de los subtipos de células T(98,99). Por lo tanto, el canal Kv1.3 muestra una mayor especificidad a este tipo de célula.

La toxina HsTX1, del escorpión *Heterometrus spinnifer*, es un potente bloqueador de los canales Kv1.3 (100). En ese sentido, Rashiy y colaboradores en el 2014, desarrollaron un análogo sintético de la HstX1, llamado R14A, el cuál exhibió una selectividad 2,000

veces mayor para el canal Kv1.3, expresado altamente en ciertos linfocitos T reguladores, relacionados con el desarrollo de patologías autoinmunes (35). Además, se demostró que R14A puede ser sistémicamente administrable a través de las vías de la mucosa bucal y pulmonar, lo que hace que este péptido sea atractivo en un entorno clínico debido a que demostró ser eficaz en la reducción de la proliferación de linfocitos T efectores de memoria, tanto en ratas como en células humanas, y poseer capacidad para limitar la inflamación en un modelo animal de autoinmunidad (102,103)

El bloqueo selectivo del canal de potasio Kv1.3, se ha considerado como un estándar de referencia para el desarrollo de terapias potenciales en el tratamiento de patologías asociadas a la autoinmunidad, teniendo en cuenta que Kv1.3 regula el flujo de iones potasio y activa rutas de señalización en diversos tipos celulares, incluyendo los linfocitos T; estos últimos, son elementos clave en el desarrollo de la artritis reumatoide, ya que inducen la síntesis de citocinas proinflamatorias en tejidos afectados (35,101).

## 5. ANTECEDENTES

Los linfocitos infiltrantes del tejido sinovial de los pacientes con AR tienen alta expresión de canales dependiente de potasio y de acuerdo con los abordajes terapéuticos para la enfermedad, estos pueden ser un blanco de tratamiento. En este sentido, se han realizado trabajos dirigidos a evaluar el efecto del veneno de escorpiones sobre modelos *in vivo* e *in vitro* de AR.

Hashemlou y colaboradores en el 2009, demostraron que el veneno del escorpión *Mesobuthus eupeus* podría ser eficaz como agente anti-artritis en el modelo animal de inflamación aguda, mediante un estudio *in vivo* realizado en veinticinco ratas Wistar macho divididos en 5 grupos, a los cuales se les indujo artritis con adyuvante de Freund, excepto en el grupo 1, el grupo 2 después de la inducción de la artritis no se administró ningún tratamiento, el grupo 3 recibió betametasona como medicamento antiinflamatorio, en el grupo 4 como tratamiento (5 µg/rata) y el grupo 5 recibió veneno bruto (10 µg/rata) como tratamiento. Después del tratamiento de las ratas, los cambios en el tamaño de la región de la articulación tibio-tarsiana en los grupos 4 y 5 que recibieron veneno de escorpión crudo y el grupo 3 con tratamiento con betametasona después del desarrollo de artritis disminuyeron en comparación con aquellas no tratadas.

Al final del experimento, se llevó a cabo la recolección de sangre para el conteo de glóbulos blancos; las ratas no tratadas y las ratas tratadas con Betametasona tuvieron un aumento significativo en el recuento de glóbulos blancos, sin embargo, en las ratas tratadas con veneno, el aumento de glóbulos blancos no fue significativo. En condiciones de artritis, hay un aumento leve a moderado en el recuento de glóbulos blancos debido a la liberación de la respuesta inflamatoria IL-1β. La IL-1β aumenta la producción del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos(107). En este estudio, la migración de leucocitos al área inflamada es suprimida por el veneno de escorpión crudo como se ve por la disminución en el recuento total de glóbulos blancos (108).

Morales Duque en el 2013 investigó y acuñó nuevas toxinas para canales iónicos de K<sup>+</sup> (KTxs) encontradas en el escorpión colombiano *Tityus sp.* mediante dos estrategias: la transcriptómica y la proteómica. Su metodología se basó en la

construcción de una librería de ADNc de la glándula de veneno de escorpión y, a partir del veneno, se caracterizaron KTx mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF y técnica tipo ESI. Los péptidos aislados se ensayaron con la técnica electrofisiológica de pinzamiento de parche (célula entera). De esta manera, sus resultados arrojaron cuatro precursores probables de KTx: tres subfamilias similares a  $\alpha$ -KTx15, una  $\alpha$ -KTx12 y una  $\alpha$ -KTx18. Además, se secuenciaron cuatro KTx similares a veneno de escorpión con masas moleculares de 2430, 3590, 3640 y 4171 Da, revelando así una estrategia molecular variada para la producción de compuestos neuroactivos (34).

Toldi y colaboradores en el año 2013 determinaron los efectos de la inhibición de los canales de potasio Kv1.3 e IKCa1 sobre la entrada de calcio de los linfocitos T periféricos humanos en la AR. En el estudio, evaluaron la cinética de entrada de calcio después de la activación en células CD4, Th1, Th2 y CD8 por citometría de flujo mediante muestras de sangre periférica de 10 individuos sanos y 9 pacientes con artritis reumatoide (AR) recientemente diagnosticada que no recibieron tratamiento antirreumático, evaluando el calcio en la cinética de flujo después de la activación. Aquí, el pico de entrada de calcio en linfocitos aislados de pacientes con AR se alcanza más rápidamente, lo que indica que responden más rápidamente a la estimulación en comparación con los controles. En individuos sanos, la inhibición del canal IKCa1 disminuyó la entrada de calcio en las células Th2 y CD4 en menor medida que en las células Th1 y CD8.

El estudio concluye en que la inhibición específica del canal Kv1.3 actúa diferencialmente sobre la cinética de entrada de calcio en los principales subgrupos de linfocitos de sangre periférica de pacientes con AR. Th2 y, en particular, las células CD8 se inhibieron de forma más dominante que las células Th1 y CD4. Una razón para la especificidad limitada de la inhibición de Kv1.3 en los linfocitos periféricos podría ser la distribución diferencial de las células T autorreactivas asociadas a la enfermedad en pacientes con AR en el líquido sinovial y la circulación (109).

Casella Martins y colaboradores en el 2015 evaluaron si el veneno del escorpión *Tityus serrulatus* afectaba la expresión de marcadores fenotípicos (CD3, CD4 y CD8) y de activación (CD69, CD25 y HLA-DR), la proliferación celular y la producción de citocinas

en células mononucleares de sangre periférica (CMSP), teniendo en cuenta que el veneno de este escorpión contiene varias toxinas capaces de actuar sobre los canales de K<sup>+</sup> de la membrana. Para ello, se aislaron las CMSP de la sangre venosa de 20 voluntarios adultos sanos (7 hombres y 13 mujeres, de 20 a 40 años) mediante el método de centrifugación de densidad discontinua. Las células se cultivaron en medio completo RPMI con 2 µg/mL de fitohemaglutinina (PHA) y/o TsV a concentraciones de 25, 50 y 100 µg/mL. Además, se evaluó la citotoxicidad del veneno mediante el método MTT descrito por Mosmann y, finalmente, se realizó la inmunofenotipificación de subconjuntos de linfocitos, marcadores de activación y la cuantificación de citoquinas mediante citometría de flujo laminar. Los autores afirmaron que el veneno de *Ts* inhibió la proliferación de linfocitos estimulada por fitohemaglutinina, particularmente en el subconjunto de linfocitos T CD8<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>, además, TsV provocó la producción y liberación de IL-6, una citoquina proinflamatoria que juega un papel importante en las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas, concluyendo así que TsV posee un gran potencial molecular con acción inmunomoduladora sobre los linfocitos T humanos(81).

Por otro lado, Tanner y colaboradores en el 2018 determinaron que la iberitoxina (IbTX), del escorpión *Buthus tamulus* redujo significativamente la gravedad de la AR en modelos animales, sin inducir efectos secundarios importantes. En este estudio se utilizaron ensayos funcionales y de abrazadera de parche para determinar si IbTX podría regular los fibroblastos (FLS) a través de la orientación de KCa1.1 y se probó la eficacia de IbTX para mejorar la enfermedad en dos modelos de ratas con AR, analizando si podría causar efectos secundarios que incluyen incontinencia o temblores en ratas, en comparación con las tratadas con paxillina, un bloqueador de molécula pequeña KCa1.1. El estudio arrojó que IbTX redujo significativamente la gravedad de la enfermedad en dos modelos de ratas con AR. A diferencia de la paxillina, IbTX no indujo temblores ni incontinencia en ratas. En general, IbTX inhibió los canales KCa1.1 en FLS y trató modelos de AR en ratas sin inducir efectos secundarios asociados con el bloqueo inespecífico de KCa1.1 y podría convertirse en una base estable para el desarrollo de un nuevo tratamiento para la AR (110).

Así mismo, en el 2019, Tanner y colaboradores, investigaron los roles de KCa1.1 y Kv1.3 en la regulación de las interacciones entre las células tipo fibroblastos sinoviales (FLS) y células T de memoria (TEM) determinaron si las terapias combinadas de bloqueadores selectivos de KCa1.1 y Kv1.3 son más eficaces que las monoterapias para mejorar la enfermedad en modelos de rata de RA. Se realizaron ensayos funcionales in vitro para evaluar los efectos de los inhibidores selectivos de los canales KCa1.1 y Kv1.3 en las interacciones de FLS aislado de ratas con artritis inducida por colágeno (CIA) con células TEM singénicas y, mediante citometría de flujo se determinaron los efectos de los bloqueadores de KCa1.1 en la expresión de proteínas utilizadas para la presentación de antígenos en CIA-FLS.

Mediante los modelos de artritis inducida por pristano y CIA se determinó la eficacia de las terapias combinadas de bloqueadores KCa1.1 y Kv1.3 para reducir la gravedad de la enfermedad en comparación con las monoterapias. El estudio muestra que las interacciones de FLS de ratas con CIA y de células TEM de rata están reguladas por KCa1.1 y Kv1.3. La inhibición de KCa1.1 en fibroblastos reduce la capacidad de FLS para estimular la proliferación y migración de células TEM, y la inhibición de Kv1.3 en células TEM reduce la capacidad de las células TEM para mejorar la expresión de FLS de KCa1.1 y la proteína de clase II del complejo principal de histocompatibilidad, así como como estimula su invasión (111).

## **6. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1. Tipo de Estudio**

Se realizó un estudio experimental, analítico, tipo caso-control.

### **6.2. Actividades Objetivo 1**

#### **6.2.1. Colecta y Manteamiento de Escorpiones**

Se realizó recolección de aproximadamente 50 escorpiones de la especie *Tityus* sp en el sector histórico Arcada de la herrería de la ciudad de Popayán, en 5 salidas de colecta. Una vez colectados, fueron ingresados al Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Cauca (CIBUC), donde se mantuvieron en terrarios de plástico con sustrato de piedra e hidratación y se alimentaron cada 15 días con insectos. Se cumplió con el decreto 1376 del 2013 para la colecta científica de animales de la biodiversidad colombiana, amparados en el permiso de Colecta de la Universidad del Cauca y el Aval de ético docente ID-4783 (Anexo 1).

#### **6.2.2. Extracción del Veneno**

El veneno fue extraído por electroestimulación del último segmento metasomal (Telson) de cada espécimen, mediante el estimulador (Lafayette instruments) a corriente directa de 30 V. Ubicando de dos a tres segmentos finales cercanos al telson se proporcionaron 3 impulsos eléctricos de manera continua a cada escorpión; las gotas de veneno generadas se colectaron en un tubo de 1.5mL (Eppendorf, USA).



**Figura 3.** Extracción por electroestimulación en el último segmento metasomal del escorpión *Tityus sp.*

Con el fin de conservar el veneno, se realizó liofilización, la cual se llevó a cabo en el equipo liofilizador (FreeZone 2.5 - LABCONCO, USA), con el fin de poder almacenar el veneno mayor periodo de tiempo sin que se comprometieran sus propiedades biológicas. Una vez liofilizado se almacenó a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### **6.2.3. Cuantificación y Dilución del Veneno**

**6.2.3.1. Preparación del Veneno.** Se agregó 200uL de PBS 1X (Gibco/Invitrogen Van Allen Way Carlsbad, CA, USA) a cada tubo de veneno liofilizado para diluirlo, luego se llevó al vórtex (heidolph, USA) hasta que se disolvió completamente. Posteriormente, se trasladaron todos los volúmenes de veneno disuelto a un tubo (Falcon BD Franklin Lakes, NJ USA) de 15 ml estéril.

**6.2.3.2. Cuantificación de proteínas.** Para cuantificar la concentración del veneno diluido se realizó lectura a 280/260nm de un volumen de 2 uL del veneno total, por duplicado, en un equipo espectrofotómetro de microplaca (Multiskan SkyHigh Photometer - Thermo Fisher Scientific), utilizando como patrón de calibración una curva de albumina de suero bovino (BSA) (Gibco/Invitrogen Van Allen Way Carlsbad, CA, USA). Para la obtención de la curva se realizaron diluciones seriadas de BSA con PBS 1X en las siguientes concentraciones: 10mg/ml, 5mg/ml, 2,5mg/ml, 1,25mg/ml, 0,625mg/ml, 0,3125mg/ml.

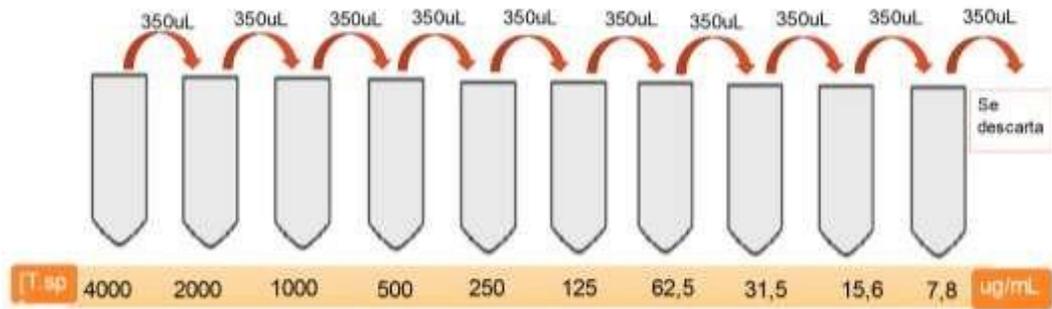
Una vez obtenidos los valores de las absorbancias para el veneno y para cada concentración de BSA, se aplicó la siguiente fórmula para el cálculo de la concentración de proteínas:

$$Prot \left[ \frac{mg}{mL} \right] = ((1,55)(valor \ de \ A280)) - (0,75)(valor \ de \ A260)$$

Posteriormente, con los valores de la concentración de proteínas obtenidas de las diferentes concentraciones de BSA y del veneno se trazó la curva de calibración de Pearson, de la cual se obtuvo la ecuación  $y=mx+b$ , para obtener los valores de  $R^2$  de cada muestra. Una vez obtenida el valor de proteínas del veneno, se realizaron 12 alícuotas de 100uL de la concentración obtenida en tubos de 1,5 mL (Eppendorf) y se almacenaron a  $-70^{\circ}C$  hasta su uso.

#### **6.2.4. Preparación de las concentraciones de veneno**

Para el desarrollo de la prueba de citotoxicidad por el método de resazurina se prepararon 10 concentraciones de veneno *Tityus sp* mediante el procedimiento de dilución seriada a partir de  $2000 \mu g/mL$  hasta llegar a la concentración de  $7.8 \mu g/mL$  (Figura 4). Esta concentración inicial fue escogida con base en el antecedente publicado por Cassella-Martins y colaboradores en 2015 con veneno de *T. serrulatus* (81).



**Figura 4.** Esquema gráfico de la dilución seriada realizada para la obtención de las 10 concentraciones de veneno *tityus sp.*

### **6.2.5. Obtención de las muestras de sangre para determinar concentraciones subletales del veneno *Tityus sp.***

Para determinar las concentraciones subletales del veneno *Tityus sp* en células mononucleares de sangre periférica humanas mediante la prueba de citotoxicidad, se utilizó sangre periférica de 2 donantes sanas, de género femenino, mayores de edad, quienes firmaron consentimiento informado (Anexo 2). Como criterios de inclusión se solicitó no presentar sintomatología referente alguna enfermedad aguda o crónica, no ingerir medicamentos inmunosupresores o antiinflamatorios, ni estar en estado de embarazo. Las muestras de sangre fueron obtenidas en tubos vacutainer con heparina mediante venopunción directa por personal capacitado y en condiciones de asepsia, mediante el sistema Venoject (Terumo Europe N.V Eschborn Germany) utilizando agujas múltiples y tubos Vacutainer® (tubos vacutainer tapa verde BD Franklin Lakes, NJ USA).

### **6.2.6. Aislamiento de Células Mononucleares de Sangre Periférica (CMSP).**

La sangre obtenida fue diluida en relación 1:1 con PBS 1X en un tubo Falcon de 15mL (Falcon BD Franklin Lakes, NJ USA), luego se depositó suavemente por las paredes de un tubo Falcon 50mL en presencia de Ficoll-Hypaque (Hystopaque®-1077; Sigma Aldrich, USA) en relación 1:3 con el volumen de sangre. Seguido, se centrifugaron los tubos por 30 minutos a temperatura de ambiente y a 2250rpm en centrifuga refrigerada

(LABNET Woodbridge, NJ, USA). Posteriormente se aisló la capa de células mononucleares utilizando una pipeta Pasteur en un tubo Falcon de 15mL (Fisher Scientific, Pittsburg, PA, USA). Se realizaron dos lavados con 10mL de PBS 1x y se centrifugó por 10 minutos, a temperatura ambiente y 1750rpm. Seguido, se realizó un lavado adicional con 10mL de medio RPMI 1640 simple (BioWhittaker, USA), se centrifugó a 1750rpm durante 5 min a temperatura de 10°C en la centrífuga (LABNET Woodbridge, NJ, USA). Por último, se re-suspendió el pellet de células en 3mL de medio RPMI 1640 (GIBCO, USA), suplementado con 10% de suero bovino fetal (GIBCO, USA) y 1% de Penicilina/Streptomocina (BioWhittaker, USA). Este protocolo se utilizó para todas las actividades estudiadas, prueba de citotoxicidad (numeral 6.2.7.1), prueba de proliferación y activación (numeral 6.3.2).

#### **6.2.7. Conteo de Células Mononucleares.**

Una vez aisladas las células se procedió a realizar el conteo de células viables por medio de la tinción con azul de Tripano (Sigma Immunochemicals, St. Louis, MO, USA). Brevemente, se tomó 90µl de azul de tripano al 0.4% en agua destilada y 10 µl de la suspensión celular anteriormente obtenida, en una proporción de 1:10. Se transfirió 10µl de la mezcla al hematocitómetro (Fisher Scientific) y en el microscopio de luz (Nikon Eclipse E 200 Melville, NY, USA), se realizó el conteo por cuadrantes. Para el cálculo del número de células por mililitro se utilizó la siguiente fórmula:

$$Células\ por\ mL = \frac{conteo\ de\ mononucleares \times 10^4 \times 10^1}{4}$$

10<sup>4</sup> = Factor de conversión del volumen a 1mL

10<sup>1</sup> = Factor de dilución de la muestra

Así como también, el porcentaje de viabilidad celular se estableció mediante la siguiente fórmula:

$$Viabilidad\ celular = \frac{numero\ de\ células\ vivas}{Número\ total\ de\ células\ adquiridas} \times 100\%$$

### **6.2.8. Ensayo de Citotoxicidad del Veneno de *Tityus sp* por Método de Resazurina (Alamar Blue).**

Para cuantificar el efecto citotóxico del veneno de *Tityus sp* se utilizó la prueba fluorométrica de resazurina. A saber, se sembraron un total de  $6 \times 10^6$  células en placas de 96 pozos, fondo plano, a una concentración de 150.000/200uL de medio RPMI 1640 completo (Biowhittaker East Rutherford, NJ, USA), suplementado con 10% de suero bovino fetal (GIBCO, USA), 1% de Penicilina/Streptomocina, 25mM de L-glutamina (Biowhittaker, USA). Posteriormente las células fueron estimuladas con 2.5  $\mu\text{g/mL}$  de Fitohemaglutinina (PHA) (Sigma-Aldrich, USA) y tratadas con cada una de las concentraciones de veneno *Tityus sp*: 2000, 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,2, 15,6, 7,8 y 3,9  $\mu\text{g/mL}$ . Como control negativo se utilizó células sin tratamiento, como control positivo se trataron células con Tritón 1X (Sigma-Aldrich, USA), y como control del background se utilizó medio completo. cada variable se evaluó por triplicado.

Posteriormente, se incubó durante 72 h a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> y 98% de humedad (Revco habitat modelo Rco 3500 Thermo Fisher Scientific Inc. Barrington. IL. USA). Después de 56 h de cultivo se agregó 22uL de resazurina marca AlmarBlue (Invitrogen, USA) al 10% v/v, a cada pozo, y se incubó durante 16 h más, dado que se tuvo un cambio de coloración a rosado fluorescente (indicador de actividad metabólica) después de 16 hras de adicionado el Alamar Blue. Finalmente, al cumplir 72 h de cultivo se midió la absorbancia a 570nm y 630 nm en espectrofotómetro de microplaca. Con los valores de las absorbancias, se calculó la diferencia en porcentaje de reducción de resazurina con la siguiente fórmula:

$$\begin{aligned} & \text{Porcentaje de la diferencia entre células tratadas y control} \\ & = \frac{(O_2 \times A_1) - (O_1 \times A_2)}{(O_2 \times P_1) - (O_1 \times P_2)} \times 100 \end{aligned}$$

Dónde:

O1 = coeficiente de extinción molar (E) de alamar Blue a 570nm

O2 = E de la oxidación de alamarBlue a 600nm

A1 = absorbancia de los pozos de prueba a 570nm

A2 = absorbancia de los pozos de prueba a 630nm

P1 = absorbancia de los pozos control positivo (CMSP más AlamarBlue sin veneno de escorpión *Tityus sp*) a 570nm

P2 = absorbancia de los pozos control positivo (CMSP más AlamarBlue sin veneno de escorpión *Tityus sp*) a 630nm

La determinación de la concentración mínima inhibitoria ( $IC_{50}$ ) se estableció como la concentración en la que la viabilidad celular se reduce en un 50% y se calculó utilizando el software GraphPad Prism 8.

### **6.2.9. Establecimiento de las concentraciones subletales del veneno *Tityus sp*.**

A partir del valor de la  $IC_{50}$  (840.3  $\mu\text{g/mL}$ ) se tomaron tres concentraciones subletales que correspondieron el 30, 15 y 7,5% del valor de la  $IC_{50}$ ; 252, 126 y 63  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente. Dado que el estudio pretendió determinar el efecto inmunomodulador del veneno de *Tityus sp* sobre CMSP de pacientes con diagnóstico de AR y sanas, se tuvo en cuenta que la exposición a las 3 concentraciones de veneno fuera mediante concentraciones subletales; considerando su porcentaje de viabilidad mayor al 90% para CMSP, de tal manera que se pudiera garantizar la integridad celular en las 72 horas de cultivo y poder ser estudiadas.

## **6.3. Actividades Objetivo 2**

### **6.3.1. Captación de Pacientes con Artritis Reumatoide**

Se captaron 10 pacientes femeninas mayores de edad con diagnóstico confirmado de AR, atendidos por la consulta de la médica Reumatóloga Ana Isabel Ospina. Las pacientes fueron contactadas y entrevistadas por uno de los investigadores, quién se encargó de explicar los objetivos del estudio. Si las pacientes cumplían con los criterios

de inclusión y exclusión (numeral 6.3.3.1) y aceptaban participar del estudio, se les solicitaba firmar el consentimiento informado (anexo 2).

Posteriormente se procedió a la toma de muestra de sangre venosa periférica que no superó los 10 mL para el desarrollo de las actividades descritas para el objetivo 2. Adicionalmente, se diligenció una encuesta para la obtención de información sociodemográfica y clínica (Anexo 3). Finalmente, se captaron 10 mujeres sanas que fueron apareadas por edad por cada paciente con diagnóstico de AR.

**6.3.1.1. Criterios de Inclusión y de Exclusión.** Se consideró pacientes con diagnóstico reciente de AR confirmado según los criterios clasificatorios de la ACR/EULAR 2010 (del inglés, American College of Rheumatology-ACR and the European League Against Rheumatism -EULAR) (112,113), que consisten en: pacientes que presenten signos y síntomas de inflamación articular reciente (seis o más semanas), en al menos una articulación, que no pudiese explicarse mejor por otra etiología (trauma, osteoartritis); positividad para criterios serológicos como cuantificación de factor reumatoide o anticuerpos anti-péptidos citrulinados y criterios de reactantes de fase aguda como cuantificación de la proteína C reactiva y velocidad de sedimentación globular (VSG).

Por otro lado, los criterios de exclusión contemplan haber ingerido algún medicamento antiinflamatorio no esteroideos (AINES) y/o medicamentos modificadores de la enfermedad (FAME) durante los últimos 4 meses (para las que ya tenían diagnóstico confirmado) y haber recibido alguna vacuna (vacuna contra SARS-CoV-2, principalmente) por al menos 2 semanas antes de la toma de la muestra sanguínea.

**6.3.1.2. Criterios de Inclusión para Controles.** Se incluyeron 10 mujeres mayores de edad que no presentaban signos y síntomas referente alguna enfermedad aguda o crónica y que no estuviera tomando medicamentos inmunosupresores, anti-inflamatorios, o que estuvieran en estado de embarazo. Todas las mujeres estuvieron de acuerdo en participar en el estudio y todas firmaron el consentimiento informado.

### **6.3.2. Pruebas para Evaluar la Capacidad Inmunomoduladora del Veneno de *Tityus sp***

Después de determinar las concentraciones de trabajo del veneno de *Tityus sp* como 252, 126 y 63 µg/mL, las cuales son consideradas como concentraciones subletales del veneno para CMSP. Se prosiguió a evaluar su capacidad inmunomodulador en cuanto a la proliferación y activación en linfocitos T CD4+ y T CD8+ y a la producción de citoquinas en CMSP de personas con diagnóstico de AR y controles sanos.

**6.3.2.1. Prueba de Proliferación Celular.** El uso de 5(6)-éster succinimidil diacetato de carboxifluoresceína (CFSE) en combinación con los anticuerpos monoclonales anti- CD3-PE, Anti- CD4-APC y Anti-CD8-PECy7 (Biolegend, USA), hacia marcadores fenotípicos y de activación permitió la determinación de la proliferación celular y el estado de activación y la discriminación de subpoblaciones celulares, que fueron evidenciadas por medio de citometría de flujo.

**6.3.2.2. Tinción con 5(6)-éster Succinimidil Diacetato de Carboxyfluoresceína (CFSE).** Las células mononucleares obtenidas de 10 pacientes con diagnóstico de AR y pacientes sanos, previamente aisladas de sangre total fueron marcadas con CFSE. Esta solución de tinción consta de una molécula que se une de manera espontánea e irreversible a las proteínas intracelulares y de membrana por su reacción con los residuos de las cadenas de lisina y grupos amino, formando enlaces covalentes. Cuando la célula se divide, el CFSE es distribuido de manera homogénea entre las células hijas, por lo tanto, la mitad de la intensidad de fluorescencia se distribuirá en cada división sucesiva de la célula, permitiendo cuantificar la proliferación celular. Este proceso se determinó mediante citometría de flujo en el canal FL1.

Siendo así, se procedió a realizar la marcación de las CMSP con CFSE (Molecular Probes/Invitrogen Van Allen Way Carlsbad, CA, USA), usando el protocolo modificado de Lyons en 2000 (114). Se separaron  $5 \times 10^6$  células en un tubo de 15mL (Falcon BD Franklin Lakes, NJ USA) y se inició el proceso de lavado con 5mL de PBS 1X (Gibco/Invitrogen Van Allen Way Carlsbad, CA, USA), se re-suspendieron las células y se procedió a centrifugar a 1750rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente en la centrifuga

refrigerada LABNET (Woodbridge, NJ, USA). Se realizó un segundo lavado con las mismas especificaciones. Luego las células fueron re-suspendidas en 5mL de PBS 1X, volumen necesario para mantener la relación 1:1 procurando que en 1mL de PBS haya 1 millón de células. Después de resuspender bien las células en el PBS, se tiñeron con 3,1µL de CFSE a concentración de 0,062 µM y se dejaron incubando durante 15 minutos a 37°C en incubadora (LABNET Woodbridge, NJ, USA).

Pasado el tiempo de incubación, se centrifugó el tubo durante 5 minutos a temperatura de ambiente (LABNET Woodbridge, NJ, USA). Se descartó el sobrenadante y se realizaron 2 lavados; en el primero con 10 mL de PBS1X, se resuspendieron las células y se centrifugó el tubo a 1750 rpm durante 5 minutos a temperatura de ambiente y se descartó el sobrenadante; En el segundo lavado se añadió medio RPMI completo y se repitió el proceso de centrifugación. Luego de descartar el sobrenadante se agregó 10mL de medio RPMI al tubo y se dejó encubar durante 30 minutos a temperatura de 37°. Finalmente, las células fueron resuspendidas en 1mL de medio RPMI completo y se realizó el conteo de viabilidad celular para constatar el número de células necesarias para cultivo.

### **6.3.3. Estimulación Policlonal de Células Mononucleares y Evaluación del Efecto del Venenos.**

Las células previamente marcadas con CFSE y no marcadas (para prueba de activación) fueron cultivadas en platos de 96 pozos en fondo en U (Fisher Scientific) a una concentración de 150.000/200µl de medio RPMI 1640 (Biowhitaker) suplementado con 10% de suero Bovino Fetal y 1% de Penicilina/Estreptomina). Posteriormente fueron estimuladas con Fitohemaglutinina (PHA) (Sigma-Aldrich, USA) a concentración de 2.5 µg/ml, con la presencia y/o ausencia de las concentraciones de estudio del veneno de *Tityus sp*; 252, 126 y 63 µg/mL.

Los controles utilizados fueron células marcadas con CFSE sin estímulo y con estímulo (PHA), células sin estímulo y células con estímulo (PHA). La incubación del cultivo fue de 72h y se realizó a 37°C, CO<sub>2</sub> al 5% y humedad del 98% (Revco habitat

modelo Rco 3500 Thermo Fisher Scientific Inc. Barrington. IL. USA). Todos estos parámetros se tuvieron en cuenta tanto para la unidad de cultivo de proliferación, así como la unidad para la prueba de activación.

**Tabla 2.** Condiciones celulares de cultivo de CMSP para las pruebas de proliferación y activación.

<b>Condiciones de cultivo</b>	<b>Tratamiento</b>
Células + PHA + 252 µg/mL	<b>Veneno de <i>Tityus sp</i></b> <b>(µg/mL)</b>
Células + PHA + 126 µg/mL	
Células + PHA + 63 µg/mL	
Células + CFSE sin estímulo	<b>Controles de cultivo</b>
Células + CFSE +PHA	
Células sin estímulo	

**6.3.3.1. Cuantificación por citometría de flujo de proliferación de células T CD4+ y CD8+ y marcadores de activación.** Una vez cumplidas las 72 horas de estimulación y tratamiento, tal como se narra en el numeral 7.5., las células fueron recogidas en tubos de citometría (poliestireno 5mL) (Falcon, USA), se centrifugaron durante 5 minutos, a temperatura ambiente y 1750rpm (LABNET Woodbridge, NJ, USA). Luego se realizó un lavado con 200µL de PBS 1X (Gibco/Invitrogen Van Allen Way Carlsbad, CA, USA), se centrifugó durante 5 minutos a temperatura de ambiente y 1750rpm y se descartó el sobrenadante. Seguido a esto, se adicionó 100ul de PBS 1X a cada tubo y se marcaron las células con 2 µL de los anticuerpos correspondientes para evaluar la proliferación: anti- CD3-PE (50 µL, Anti- CD4-APC y Anti-CD8-PECy7 (Biolegend, USA); y para la activación: Anti-CD4-APC, Anti-CD8-PECy7 (Biolegend, USA), Anti-CD69-FITC y Anti-HLA-DR-PE (BD Bioscience, USA) a cada tubo. Se dejaron incubar por 30 minutos en oscuridad, se realizaron dos lavados con 200µL de PBS 1X, se centrifugaron (a temperatura ambiente y 1750rpm) y se re-suspendieron en 200µL para realizar la lectura por citometría de flujo..

Se adquirió un total de 20,000 eventos por tubo en el citómetro de flujo (Accuri C6 flow cytometer - BD Biosciences, USA). El gate para los linfocitos fue seleccionado de acuerdo con la distribución Foward y side scatter y el análisis fue hecho mediante Software BD Accuri C6 Software. El porcentaje de proliferación correspondió a la proporción de células que disminuyeron su intensidad de fluorescencia para el CFSE, en poblaciones CD4+ o CD8+.

## **6.4. Actividades Objetivo 3**

### ***6.4.1. Detección de citoquinas en sobrenadantes de cultivo mediante el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA)***

La técnica de inmunoabsorción ligado a enzima, ELISA (por sus siglas: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) es una técnica de inmunoabsorción que permite la identificación de un marcador de interés (anticuerpo, proteína, péptido u hormona) en

diferentes muestras biológicas, mediante el uso de antígenos y anticuerpos conjugados con una enzima, obteniendo así, una reacción cuantificable, ya sea por cambio de coloración o mediante la lectura por espectrofotometría.

En ese sentido, se realizó el ensayo de ELISA tipo sandwich para determinar los niveles de las citoquinas IL-6, TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$ , IL-10 en sobrenadantes de cultivo de las células mononucleares de sangre periférica expuestas a las dosis subletales del veneno de *tityus sp*, de pacientes con diagnóstico de AR y sanos.

**6.4.1.1. Obtención de sobrenadantes de cultivo.** Los sobrenadantes fueron colectados en microtubo de 200uL teniendo en cuenta las cuatro condiciones que se querían estudiar; concentraciones 252, 126, 63 ug/mL de veneno *tityus sp* y células no tratadas (control) (numeral 6,3,2). Los sobrenadantes fueron almacenados a -70°C hasta su uso.

#### **6.4.1.2. Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima ELISA.**

Las citoquinas IL-6, TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$ , IL-10 fueron cuantificadas mediante los kits ELISA Max<sup>TM</sup> Deluxe Set (BioLegend, USA) para cada una. Se realizó una curva de calibración para cada citoquina, siguiendo los estándares de referencia del kit, las cuales comprendieron el intervalo de 3.9-500 pg/mL, dependiendo las especificaciones para cada citoquina. Todas las muestras de sobrenadante se analizaron por duplicado.

En primer lugar, se sensibilizaron las placas de 96 pozos (BioLegend, USA) con 100uL de anticuerpo de captura (anticuerpos de captura IL-6, TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$ , IL-10 humano 1X Elisa Max) se envolvieron las placas con papel Contac y se incubaron toda la noche a 4°C. Luego de 16 horas de incubación se realizaron 4X lavados por pozo con 300ul de Buffer Wash (Tween-20 al 0.05% en PBS 1X), se realizó el bloqueo de pozos mediante 200ul de solución de bloqueo (Diluyente de ensayo A 1x) en cada pozo, se selló la placa y se incubó durante 1 h con agitación. Luego se hicieron 4 lavados y se agregó 100ul de solución de la curva (500; 250; 125; 62,5; 31,1; 15,6; 7,8 pg/mL) así como muestras de estudio (100ul de sobrenadante) y para IL-1B 50ul de Buffer de ensayo D + 50ul de la curva/muestras de estudio. Se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente y con agitación. Seguido, se hicieron 4 lavados y se agregó 100ul de anticuerpo de detección

correspondiente a cada citoquina (anticuerpos de detección IL-6, TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$ , IL-10 humano 1X Elisa Max). Se incubó a temperatura ambiente durante 1 h, con agitación. Luego se hicieron 4 lavados y se agregó 100uL de avidina -HRP a cada pozo. Se incubaron las placas durante 30 minutos a temperatura ambiente, luego se hicieron 5 lavados, con 5 seg de remojo y se adicionó 100ul de sustrato F para IL-1B o 100 ul de TMB para las tres citoquinas restantes. Se incubaron durante 15 min (IL-6 y TNF- $\alpha$ ) o 30 min (IL-10) o 20 min (IL-1B) a temperatura ambiente y en la oscuridad. Se agregó 100uL de la solución de parada (2N, H<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>). Finalmente se llevó al espectrofotómetro EPOCH 2 (Agilent Biotek, USA)

#### **6.4.2. Análisis Estadístico**

Para el análisis sociodemográfico de los pacientes AR y controles y para la elaboración de tablas, los datos colectados fueron tabulados en matrices de Excel, para ser sometidos a análisis estadístico en el software IBM SPSS Statistics 26. El análisis se realizó mediante un análisis bivariado con el fin de determinar relaciones empíricas entre variables y expresarlas mediante tablas de frecuencia y porcentaje.

Los datos obtenidos de la respuesta celular en cuanto a proliferación, activación y producción de citoquinas fueron analizados mediante el análisis de varianza (ANOVA) de dos factores, considerando valor de significancia de  $p < 0,05$ , seguido por la prueba de comparación múltiple de Tukey. Se elaboraron gráficas de barras donde se expresó la media y el  $\pm$  Error estándar de la media ( $\pm$  SEM) de cada condición mediante software de análisis estadístico GraphPad Prism 8.

#### **6.5. Aval Ético**

Este estudio contó con el aval de ética de la Universidad del Cauca para el proyecto ID-4783, y se encuentra amparado por el permiso de colecta de animales de la universidad del Cauca, cumpliendo con el decreto 1376 del 2013

## **6.6. Financiación**

Esta investigación fue financiada por la Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad del Cauca, identificada con el ID 4783, bajo la convocatoria “Cultivando semillas”.

## 7. RESULTADOS

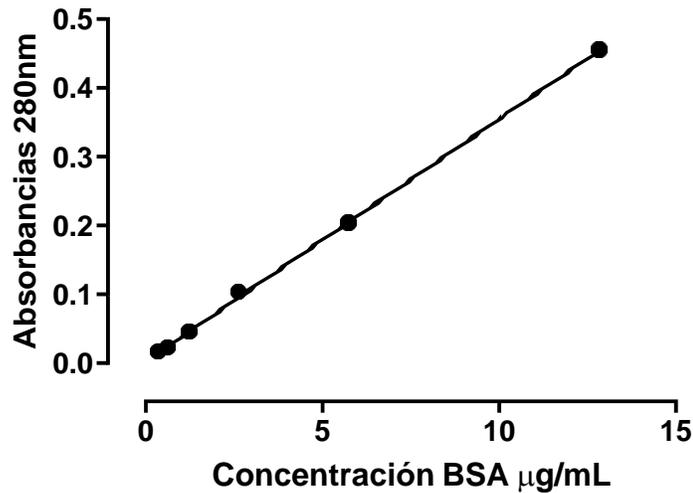
### 7.1. Cuantificación de Proteínas

El proceso de cuantificación de proteínas se realizó con el espectrofotómetro de microplaca (Multiskan SkyHigh Photometer - Thermo Fisher Scientific). Este equipo permite medir valores de absorbancia a longitudes de onda que se necesiten (260nm y 280nm), para poder establecer la cantidad de proteínas o péptidos de la sustancia (veneno de *Tityus sp*), mediante una regresión lineal. En ese sentido, luego de obtener los valores de las absorbancias para cada concentración en 260nm y 280nm, se promediaron los valores de repetición, tanto las disoluciones de BSA como las obtenidas para el veneno.

Finalmente, con las concentraciones de proteínas obtenidas de BSA y del veneno se traza la curva de calibración de Pearson (Tabla 3). Esta regresión permite obtener una ecuación  $y=mx+b$  de la cual es posible obtener unos valores de  $R^2$  el cual corresponde al coeficiente de determinación que indica la distancia a la que se encuentran los valores obtenidos frente a la línea de tendencia (Figura 2)

**Tabla 3.** Promedio de las absorbancias a 280nm y resultado Y (concentración del veneno) en la curva de calibración de Pearson.

Concentración Teórica (µg/mL)	Concentración Equipo (µg/mL)	Promedio de absorbancias 280nm
10	12,84	0,45
5	5,72	0,20
2,5	2,62	0,10
1,25	1,23	0,05
0,62	0,61	0,02
0,31	0,35	0,02
Veneno	17,00	0,60

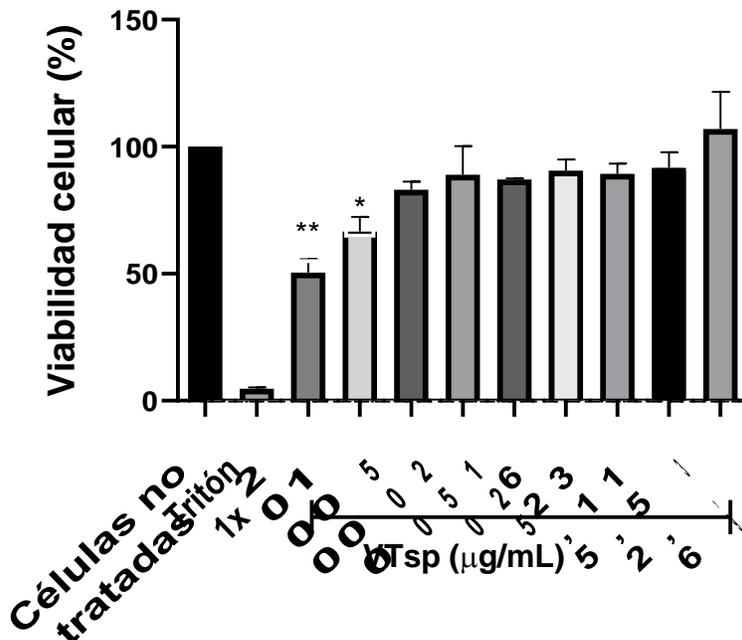


**Figura 5.** Curva de calibración concentración de BSA para la cuantificación del veneno de *Tityus sp.*

Finalmente, con los valores de la concentración de proteínas para cada una de las disoluciones de BSA, y el valor de  $R^2$  en la curva de calibración de Pearson, se obtuvo una concentración de proteínas de 17mg/mL de veneno de *Tityus sp.* Esta concentración de veneno se utilizó para hallar la dosis inhibitoria IC50 del veneno en células mononucleares de sangre periférica.

## 7.2. Concentraciones Subletales del Veneno de *Tityus sp*

Para determinar las concentraciones sub-letales de trabajo, del veneno de *Tityus sp* se realizó la prueba colorimétrica de resazurina (AlamarBlue) en cultivo de 72 h, evaluando 10 concentraciones de veneno: 2000, 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,2, 15,6, 7,8 y 3,9µg/mL; como control positivo Tritón 1X y control negativo células sin tratamiento. El porcentaje de viabilidad celular en presencia de las distintas concentraciones de veneno se redujo de manera dosis dependiente a la concentración de veneno de *Tityus sp*, siendo 2000 y 1000 µg/mL las concentraciones con mayor disminución del porcentaje de viabilidad. Se obtuvo una concentración letal inhibitoria del 50% de 840,3 µg/mL (Figura 6).



**Figura 6.** Efecto del veneno de *Tityus sp* (VTsp) sobre la viabilidad celular de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) en cultivo de 72h, mediante el ensayo fluorimétrico de resazurina (AlamarBlue). El control negativo fue Tritón 1X y el control positivo fueron las células sin tratamiento. Los resultados fueron expresados como el  $\pm$  Error estándar de la media ( $\pm$  SEM) Valores de significancia  $P < 0,05^*$  y  $p < 0,01^{**}$ .

A partir del valor de la  $IC_{50}$  (840.3  $\mu\text{g/mL}$ ) se escogieron las concentraciones correspondientes al 30,15 y 7,5% (252, 126 y 63  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente) de ese valor, teniendo en cuenta un porcentaje de viabilidad mayor al 90% que permitiese observar la actividad inmunomoduladora del veneno.

### 7.3. Análisis Sociodemográfico de las Pacientes con Diagnóstico de AR y

#### Controles

Se seleccionó una muestra de 10 pacientes con AR y 10 controles con buen estado de salud, sin antecedentes de enfermedades crónicas y apareados con los pacientes conforme al género y edad. Los pacientes seleccionados con AR fueron previamente

diagnosticados por la reumatóloga Ana Isabel Ospina, obedeciendo a los criterios de inclusión y exclusión del estudio.

En el análisis sociodemográfico se encontró que los 10 pacientes con AR en su totalidad fue representada por el género femenino (100%) con edades promedio de  $41 \pm 0,51$  años y rango de edad fue de 20-69 años. En cuanto a la procedencia, la mayoría de las pacientes AR y controles residen en el municipio de Popayán, seguido de los municipios de Cajibío, Piendamó, Bolívar, Nariño, Rosas, Sotará, Pitalito, San Sebastián, La Sierra y Caldon. (Tabla 3). Finalmente, dentro de las ocupaciones más recurrentes entre pacientes AR y controles sanos se encuentran estudiantes, ama de casa e independiente (Tabla 5).

Respecto a los hallazgos clínicos en las pacientes AR sobre compromisos articulares en articulaciones grande, el 45% de ellas refirió presentar dolor y/o hinchazón en la rodilla, seguido por hombros (40%), tobillos (40%), cadera y codos (35%) (Tabla 6), mientras que, en articulaciones pequeñas, el 50% de las pacientes manifestó compromiso en las articulaciones metacarpofalángicas, además de muñecas (45%), interfalángicas proximales (40%) y metatarsfalángicas (15%) (Tabla 6).

**Tabla 4.** Análisis bivariado de las variables sociodemográficas de pacientes con diagnóstico de AR y controles sanos.

VARIABLE	PACIENTES CON AR n=10		CONTROLES SANOS n=10	
	Frecuencia	Porcentaje	Frecuencia	Porcentaje
<b>Edad</b>				
<b>Rango</b>	20-69		21-69	
<b>Género</b>				
<b>Masculino</b>	0	0	0	0
<b>Femenino</b>	10	100	10	100
<b>PROCEDENCIA</b>				
<b>Piendamó</b>	1	10,0	1	10,0
<b>Popayán</b>	2	20,0	3	30,0
<b>Rosas</b>	1	10,0	0	0,0
<b>Sotará</b>	1	10,0	0	0,0
<b>Pitalito</b>	0	0,0	1	10,0
<b>San Sebastián</b>	1	10,0	0	0,0
<b>Cajibío</b>	1	10,0	2	20,0
<b>La Sierra</b>	1	10,0	0	0,0
<b>Bolívar</b>	0	0,0	2	20,0
<b>Nariño</b>	1	10,0	1	10,0

<b>Caldono</b>	1	10,0	0	0,0
<b>OCUPACION</b>				
<b>Independiente</b>	2	20,0	1	10,00
<b>Aseadora</b>	0	0,0	1	10,00
<b>Estudiante</b>	2	20,0	3	30,00
<b>Docente</b>	1	10,0	1	10,00
<b>Bacterióloga</b>	0	0,0	1	10,00
<b>Ama de casa</b>	3	30,0	1	10,00
<b>Psicóloga</b>	1	10,0	0	0,00
<b>Auxiliar de enfermería</b>	1	10,0	0	0,00
<b>Bióloga</b>	0	0,0	1	10,00
<b>Trabajadora social</b>	0	0,0	1	10,00

**Tabla 5.** Hallazgos clínicos relacionados al número de articulaciones grandes comprometidas en las pacientes AR.

<b>ARTICULACIONES GRANDES</b>	<b>PRESENTA AFECTACIÓN</b>		<b>NO PRESENTA AFECTACIÓN</b>		<b>TOTAL</b>	
	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>N</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
<b>HOMBROS</b>	8	40%	12	60%	20	100%
<b>CADERA</b>	7	35%	13	65%	20	100%
<b>RODILLAS</b>	9	45%	11	55%	20	100%
<b>CODOS</b>	7	35%	13	65%	20	100%
<b>TOBILLOS</b>	8	40%	12	60%	20	100%

**Tabla 6.** Hallazgos clínicos relacionados al número de articulaciones pequeñas comprometidas en las pacientes AR.

<b>ARTICULACIONES PEQUEÑAS</b>	<b>PRESENTA AFECTACIÓN</b>		<b>NO PRESENTA AFECTACIÓN</b>		<b>TOTAL</b>	
	<b>N</b>	<b>%</b>	<b>N</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
<b>METACARPOFALÁNGICAS</b>	10	50%	10	50%	20	100%
<b>INTERFALÁNGICAS PROXIMALES</b>	8	40%	12	60%	20	100%
<b>INTERFALÁNGICAS DISTALES</b>	0	0%	20	100%	20	100%
<b>METATARSOFALÁNGICAS</b>	3	15%	17	85%	20	100%
<b>MUNECAS</b>	9	45%	11	55%	20	100%

Teniendo en cuenta que uno de los criterios de selección es no haber recibido algún tratamiento convencional para la artritis en los cuatros últimos meses a la toma de

la muestra de sangre, en la encuesta se realizó la pregunta, si alguna vez tomaron

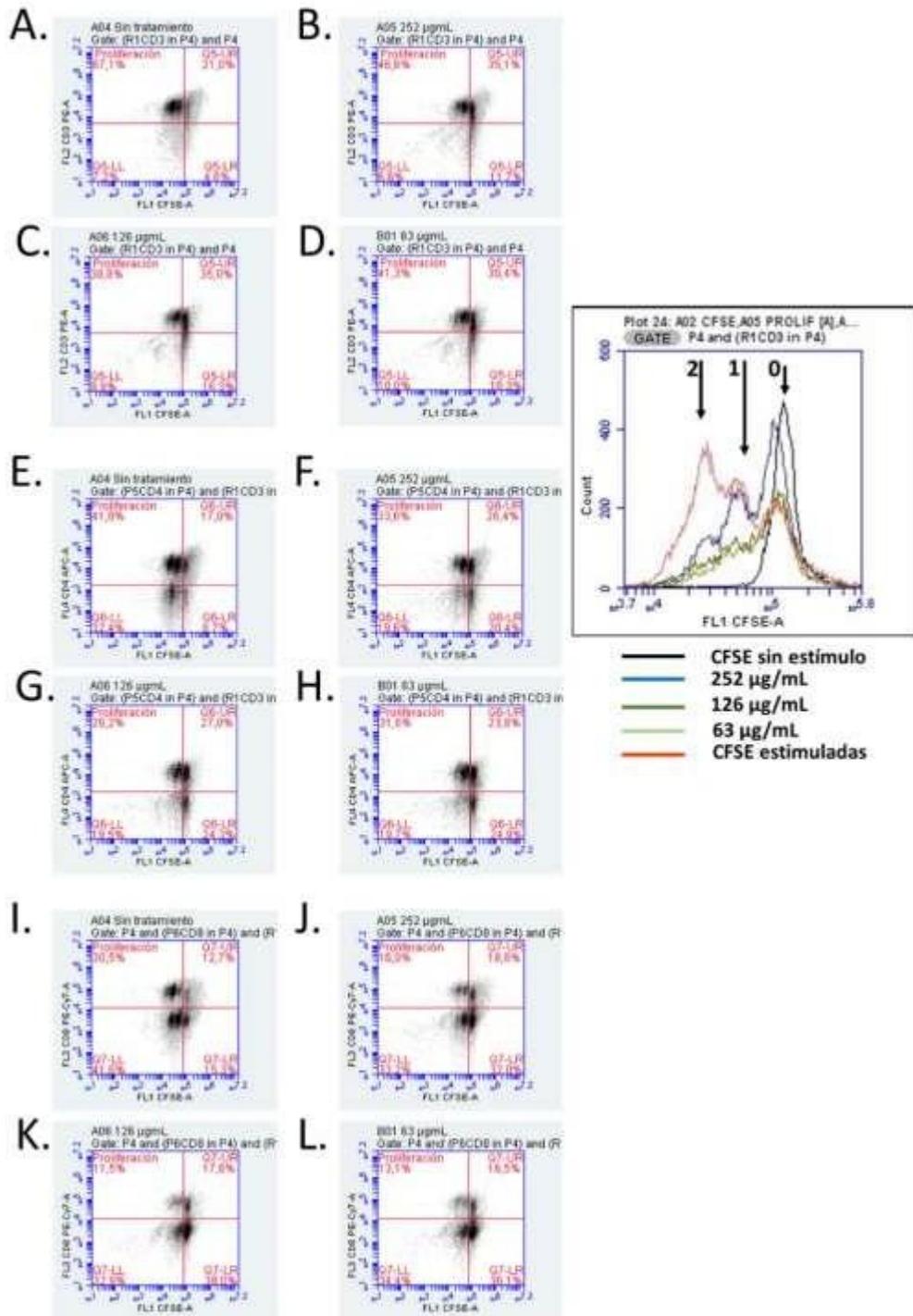
terapias y/o medicamentos asociados a AR, entre las pacientes con diagnóstico previo de AR.

Siendo así, las pacientes manifestaron que el medicamento más frecuente fue el FAME metrotexato (25%), seguido del AINES naproxeno (25%), el corticosteroide sintético prednisona (20%) y el AINES ibuprofeno (20%), sin embargo, los pacientes refieren haber experimentado numerosos efectos adversos, con medicamentos como el metrotexate, la prednisona, leflunomida y prednisolona, a nivel gastrointestinal, sumado a dolores de cabeza frecuentes y dificultad para realizar sus actividades diarias debido a mareos constantes, por lo que tomaron la decisión de abandonar su medicación. Es importante resaltar que algunos pacientes habían sido diagnosticados años atrás (fueron captados de manera libre), sin embargo, para el proyecto, se realizó una reconfirmación de diagnóstico por parte de la reumatóloga.

#### **7.4. El veneno de *Tityus sp* Indujo Disminución de la Proliferación de CMSP de Personas con Diagnóstico de AR y Sanas en Subpoblaciones CD3+, CD3+CD4+, CD3CD8+**

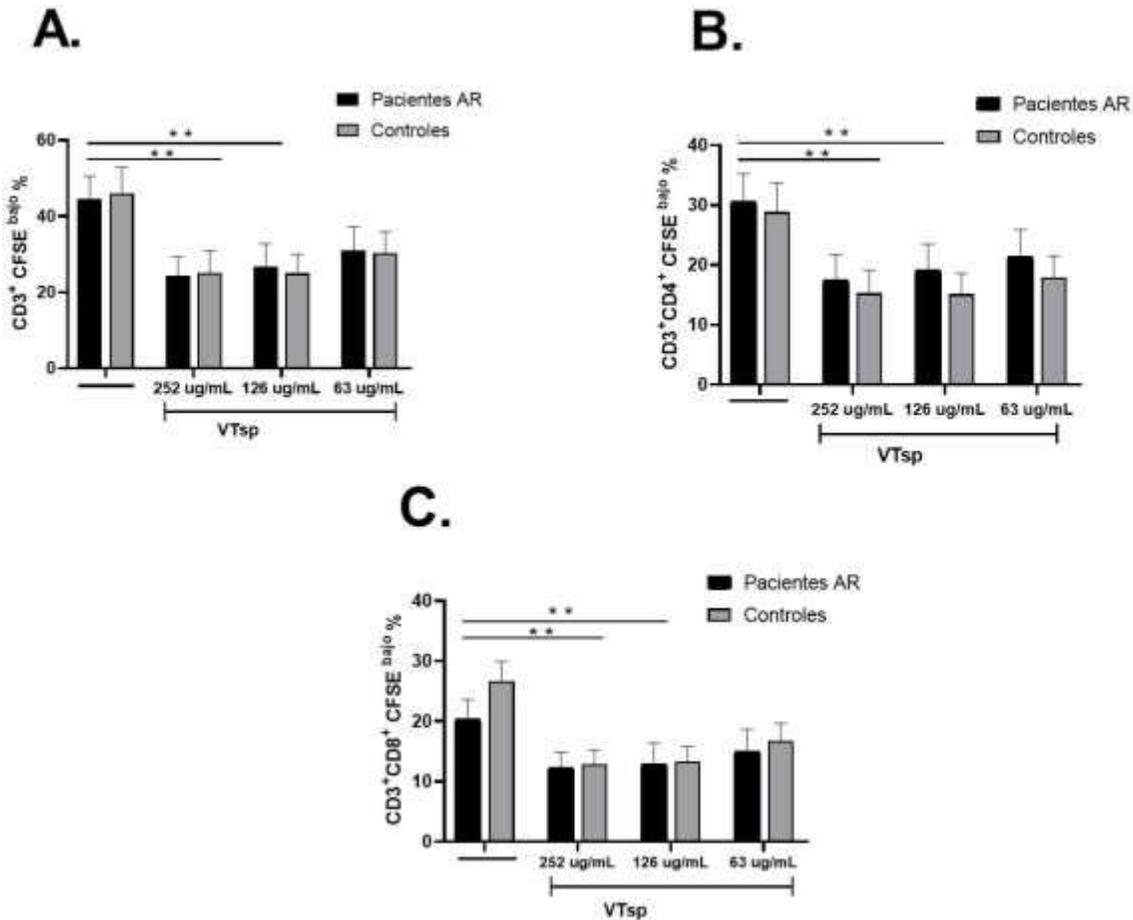
Después de 72h de cultivo, las CMSP de pacientes con diagnóstico de AR y controles sanas, que previo al cultivo fueron marcadas con CFSE (0.062  $\mu\text{M}/\text{mL}$ ) y luego estimuladas con PHA (2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y, expuestas o no a concentraciones de 252, 126 y 63  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , presentaron cambios en el porcentaje de proliferación para las subpoblaciones correspondientes a CD3+, CD3+CD4+, CD3CD8+ (Figura 7).

El análisis estadístico de varianza (ANOVA) permitió observar que existe una diferencia significativa entre las distintas concentraciones de veneno ( $p < 0,05$ ). Adicionalmente, en el análisis de comparación múltiple de Tukey muestra que existen diferencias significativas entre los porcentajes de proliferación para las subpoblaciones celulares CFSE<sup>bajo</sup> en los linfocitos CD3+, CD3+CD4+ y CD3CD8+, en la condición sin tratamiento versus la concentración de veneno de 252  $\mu\text{M}/\text{mL}$  y 126  $\mu\text{M}/\text{mL}$  ( $p < 0.01$ ) (Figura 8)



**Figura 7.** Diagrama de puntos (Dot plot) representativo de citometría para el porcentaje de proliferación en poblaciones celulares. CD3<sup>+</sup> (A, B, C, D), CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> (E, F, G, H, I), CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (I, J, K, L) (Izquierda); e histograma representativo de proliferación general en CMSP (Las fechas refieren a los ciclos celulares, correspondiente a 72h) (Derecha), marcadas

con CFSE con presencia/ausencia de veneno *Tityus sp* 252, 126 y 63  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Las células mononucleares de sangre periférica de pacientes con diagnóstico de AR y sanas fueron marcadas con CFSE (0.062  $\mu\text{M}/\text{mL}$ ), estimuladas con PHA (2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y cultivadas en presencia de las distintas concentraciones de veneno de *Tityus sp* durante 72h, 5%  $\text{CO}_2$  y humedad de 98%. Luego fueron marcadas con los anticuerpos anti- CD3-PE, Anti- CD4-APC y Anti-CD8-PECy7 (Biologend, USA) para ser leídas en el citómetro de flujo (Accuri C6 flow cytometer - BD Biosciences, USA). Los resultados se obtuvieron a través del análisis en el software BD Accuri C6 Software.

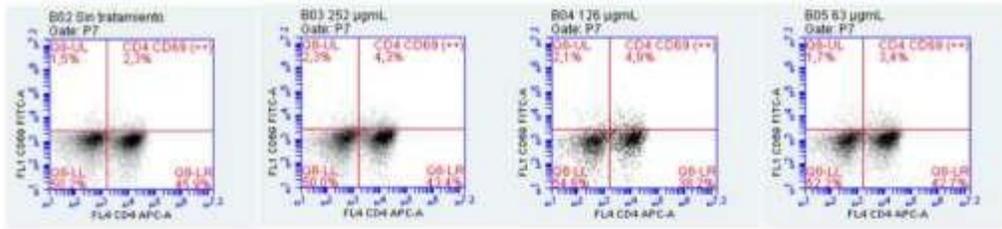


**Figura 8.** Poblaciones celulares CD3<sup>+</sup> (A), CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>(B), CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (C), marcadas con CFSE y el porcentaje de proliferación con presencia/ausencia de veneno *Tityus sp* 252, 126 y 63  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y células sin tratamiento. Las células mononucleares de sangre periférica de pacientes con diagnóstico de AR y sanas fueron marcadas con CFSE (0.062  $\mu\text{M}/\text{mL}$ ), estimuladas con PHA (2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y cultivadas en presencia de las distintas concentraciones de veneno de *Tityus sp* durante 72h, 5%  $\text{CO}_2$  y humedad de 98%. Los resultados están expresados como el  $\pm$  Error estándar de la media ( $\pm$  SEM). Valor de significancia  $P < 0,01^{**}$  vs CFSE.

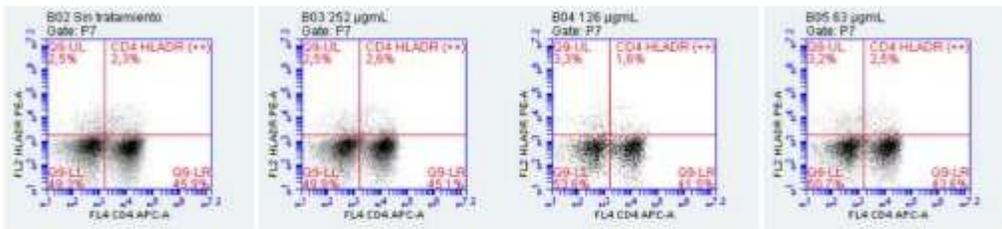
### **7.5. El veneno de *Tityus sp* No Indujo Cambios Significativos En la Activación de CMSP de Pacientes con AR y Sanos Para las Subpoblaciones CD4+HLADR+, CD4+CD69+, CD8+ HLADR+, CD8+CD69+**

Las células mononucleares de sangre periférica de pacientes con AR y controles sanos, estimuladas con PHA (2.5 µg/mL) y tratadas o no, con veneno de *Tityus sp* a concentraciones de 252, 126 y 63 µg/mL no presentaron cambios significativos en el porcentaje de células que expresan marcadores de activación como CD69 y HLADR en las subpoblaciones celulares CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> (Figura 9 y 10). De manera interesante, el porcentaje de células CD8<sup>+</sup> HLADR<sup>+</sup> fue menor en pacientes AR comparado con los controles con una diferencia significativa estadística de  $p < 0,05$  en el análisis de varianza (ANOVA), demostrando que el menor porcentaje de células CD8<sup>+</sup> HLADR<sup>+</sup> está asociado a la enfermedad y no al tratamiento con las diferentes concentraciones del veneno (Figura 10 D).

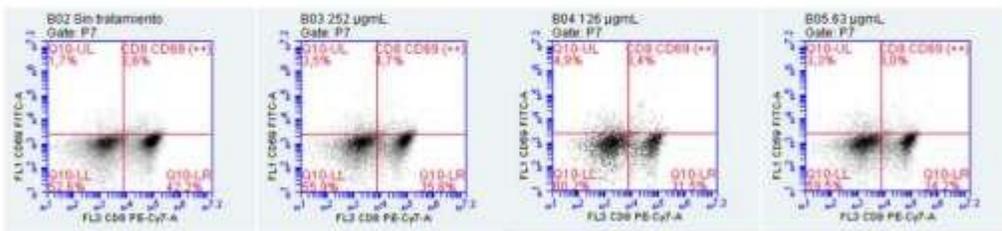
### A. Poblaciones CD4+ que expresan CD69+



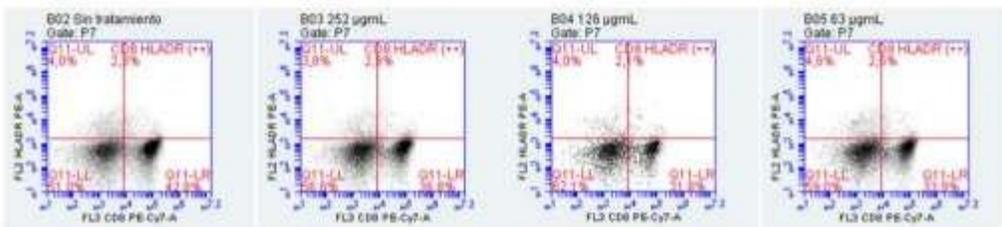
### B. Poblaciones CD4+ que expresan HLADR+



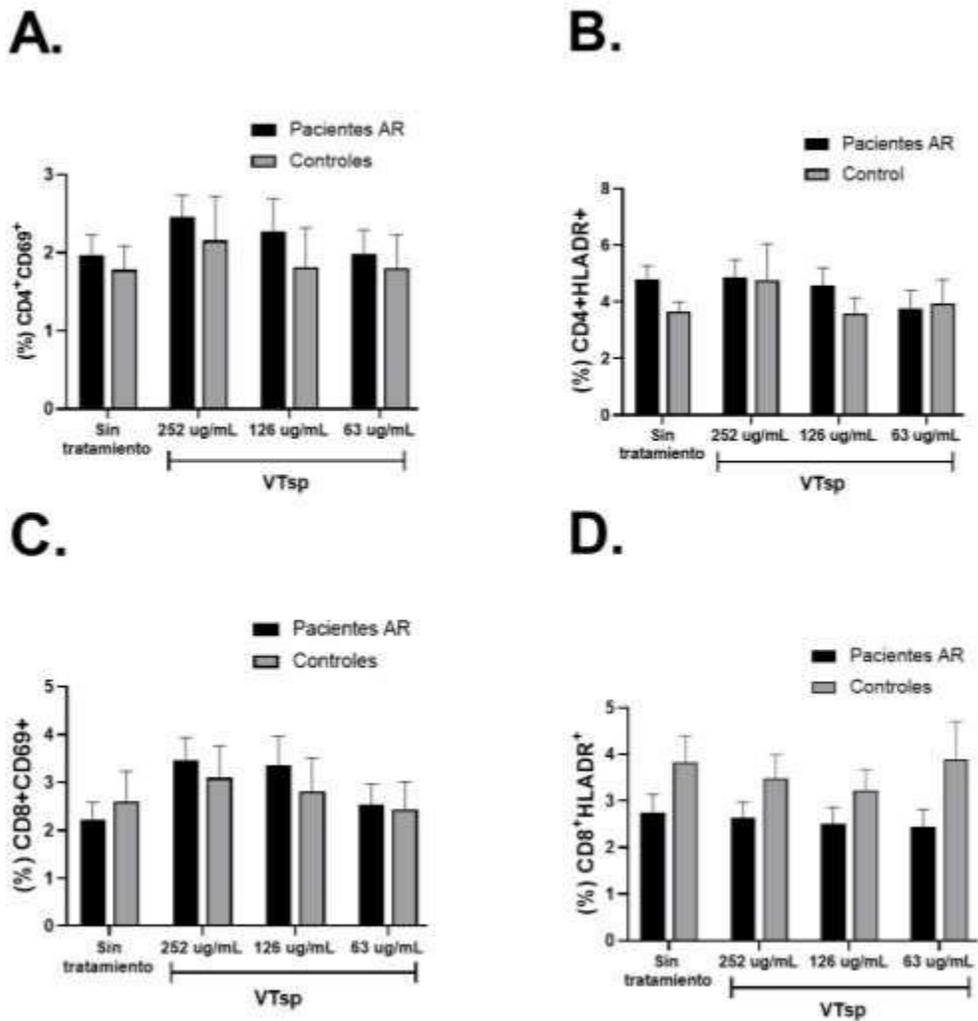
### C. Poblaciones CD8+ que expresan CD69+



### D. Poblaciones CD8+ que expresan HLADR+



**Figura 9.** Diagrama de puntos (Dot plot) representativo de citometría para el porcentaje de activación para las subpoblaciones celulares CD4+HLADR+ (A), CD4+CD69+ (B), CD8+ HLADR+ (C), CD8+CD69+ (D)+ en CMSP cultivadas en presencia/ausencia de veneno *Tityus sp* 252, 126 y 63 µg/mL. Las células mononucleares de sangre periférica de pacientes con diagnóstico de AR y sanas fueron estimuladas con PHA (2.5 µg/mL) durante 72h, 5% CO<sub>2</sub> y humedad de 98%. Luego fueron marcadas con los anticuerpos Anti-CD4-APC, Anti-CD8-PECy7 (Biolegend, USA), Anti-CD69-FITC y Anti-HLA-DR-PE (BD Bioscience, USA) para ser leídas en el citómetro de flujo (Accuri C6 flow cytometer - BD Biosciences, USA). Los resultados se obtuvieron a través del análisis en el software BD Accuri C6 Software.



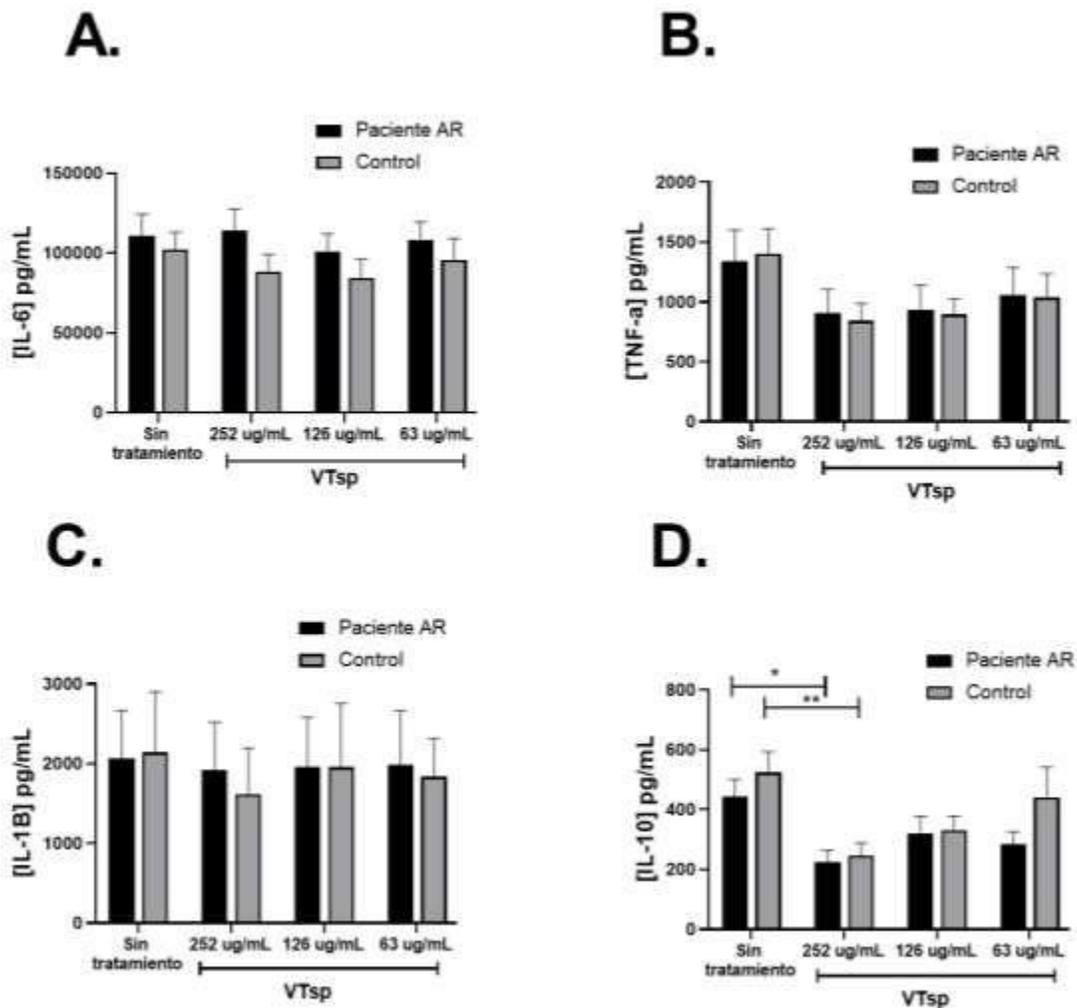
**Figura 10.** Porcentaje de activación para las subpoblaciones celulares CD4+HLADR+ (A), CD4+CD69+ (B), CD8+ HLADR+ (C), CD8+CD69+ (D), estimuladas con PHA (2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y cultivadas en presencia/ausencia de veneno *Tityus sp* a concentraciones de 252, 126 y 63  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . luego de las 72h las células fueron marcadas con anticuerpos Anti-CD4-APC, Anti-CD8-PECy7 (Biolegend, USA), Anti-CD69-FITC y Anti-HLA- DR-PE PE (BD Bioscience, USA) y fueron analizados mediante citometría de flujo. Los resultados están expresados como el  $\pm$  Error estándar de la media ( $\pm$  SEM).

### 7.6. Efecto del Veneno de *Tityus sp* en la Producción de Citoquinas.

Para analizar la expresión de citoquinas IL-6, TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$ , IL-10 en sobrenadantes de cultivo, se realizó la detección mediante el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA). No se obtuvieron diferencias significativas en la concentración de citoquinas TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$  e IL-6, en pacientes con AR vs pacientes sanas en las distintas

concentraciones de veneno (252, 126 y 63  $\mu\text{g/mL}$ ) (Figura 11), por lo que el veneno no afectó la producción de estas citoquinas entre los grupos estudiados. Por otro lado, hubo una diferencia significativa en la concentración de citoquina IL-10 encontrada entre células sin tratamiento vs concentración alta de Tsp (252  $\mu\text{g/mL}$ ), tanto de pacientes con AR como de controles (Figura 11, D).

Por último, el análisis en el análisis de varianza (ANOVA) demostró una diferencia significativa en la concentración de IL-6 entre pacientes AR y controles sanos, observando una tendencia a la alza de en pacientes con AR ( $p < 0,05$ ), (Figura 11, A).



**Figura 11.** Concentración de citoquinas IL-6 (A), TNF- $\alpha$  (B), IL1- $\beta$  (C), IL-10 (D) expresadas por células mononucleares de pacientes con diagnóstico de AR y pacientes sanas en sobrenadantes de cultivo, tratadas con PHA (2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y cultivadas en presencia/ausencia de veneno *Tityus sp* a concentraciones de 252, 126 y 63  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , durante 72h, medida mediante el Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA). La concentración de IL\_10 para las células sin tratamiento versus concentración de 252  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de veneno tuvo una diferencia significativa, tanto para paciente, como control. Para la citoquina IL-6 no hubo diferencias significativas entre los distintos tratamientos, en comparación al control, sin embargo, si hubo una diferencia significativa para el diagnóstico de AR. El valor de significancia se expresó por  $p < 0,05$  en el análisis de varianza ANOVA. Los resultados están expresados como el  $\pm$  Error estándar de la media ( $\pm$  SEM). Los valores de significancia fueron  $P < 0,01^{**}$  y  $P < 0,05^*$ .

## 8. DISCUSIÓN

El presente estudio evaluó la actividad inmunomoduladora del veneno del escorpión *Tityus sp* sobre CMSP en pacientes con diagnóstico de AR, en comparación a pacientes sanas. En él, se estudió la capacidad de proliferación y activación celular del veneno en las poblaciones celulares T CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>, de pacientes con diagnóstico de AR y pacientes sanas, así como la producción de citoquinas IL-6, TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$ , IL-10, en sobrenadantes de cultivo celular de 72h. Los resultados obtenidos muestran que el veneno indujo cambios y respuestas significativas en la proliferación y secreción de citoquinas principalmente.

Las CMSP de pacientes diagnosticados con AR y controles sanos marcadas con CFSE y estimuladas con PHA (2,5  $\mu\text{g/ml}$ ) en presencia/ausencia de 252, 126, 63  $\mu\text{g/ml}$  de veneno *Tityus sp*, respectivamente, representaron un cambio porcentual en la proliferación de subconjuntos correspondientes a CD3<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, CD3CD8<sup>+</sup> con una respuesta dosis dependiente (Figura 8). Normalmente, la proliferación de los linfocitos T ocurre como una respuesta hacia un estímulo proveniente del reconocimiento de un antígeno exógeno o endógeno, que activan los linfocitos T, produciendo su diferenciación y la secreción de mediadores celulares como las citoquinas (115). Este proceso es de vital importancia en la respuesta inmune adaptativa, para generar respuestas rápidas mediante la expansión clonal de los linfocitos hacia el antígeno.

En este caso, se utilizó la Fitohemaglutinina, un mitógeno conformado por una lectina vegetal con la capacidad de unirse a los receptores TCR y activar los linfocitos. Normalmente, la proliferación es mediada por una combinación de señales del receptor específico de linfocitos T (TCR), moléculas co-estimuladoras (CD3 y CD4) y factores de crecimiento autocrinos, principalmente IL-2 que inducen la cascada de activación y la consecuente proliferación (115). Sin embargo, el veneno de *Tityus sp* redujo el porcentaje de proliferación celular en comparación con las células no tratadas, lo cual pudo deberse a la presencia de toxinas bloqueadoras de canales iónicos, teniendo en cuenta estos también están implicados en el proceso de sinapsis inmunológica y que, además, se ha

demostrado que el bloqueo específico para el canal Kv1.3 en linfocitos T es capaz de inhibir o detener dicho proceso.

Teniendo en cuenta lo anterior, es importante mencionar que la activación celular es regulada mediante una vía de señalización dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ . Una vez activa la célula se pone en marcha una vía de señalización para la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$ , cuando este liberado de las reservas intracelulares, los canales iónicos como el CRAC se abren, por los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico aumentan, y este flujo de iones es sostenido gracias a; la apertura de los canales Kv1.3 el cual hiperpolariza la membrana; y la apertura de canales  $\text{IkCa1}$  por la elevada concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, regulando de esta manera la activación celular de los linfocitos. Siendo así, el bloqueo selectivo de canales  $\text{K}^+$  (Kv1.3 principalmente) conduce a la despolarización de la membrana, inhibe la afluencia de  $\text{Ca}^{2+}$  resultando en el deterioro de activación, proliferación y de las funciones efectoras (116,117).

Los observados también coinciden con los observados por Casella Martins y colaboradores (2015), quienes obtuvieron una disminución en el porcentaje de proliferación en poblaciones de linfocitos  $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$  de CMSP provenientes de personas sanas, que fueron estimuladas con PHA (2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) expuestas a concentraciones de 50 y 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  veneno de *Tityus serrulatus* en comparación con el control (células + PHA). Los canales iónicos están implicados en la fase temprana de activación de linfocitos por PHA, por lo que es posible que las toxinas presentes en el veneno de *Tityus serrulatus* bloquearan los canales de  $\text{K}^+$  de las células  $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$  y perjudicaran la acción de la PHA (81).

El porcentaje de activación para los marcadores de activación como CD69 y HLADR en las subpoblaciones celulares  $\text{CD4}^+$  y  $\text{CD8}^+$ , expuestas al veneno de *Tityus* sp fue similar a los controles. Sin embargo, el porcentaje de células  $\text{CD8}^+\text{HLADR}^+$  fue menor en pacientes AR comparado con los controles. Estos puede deberse a que se ha asociado la relevancia de los linfocitos T  $\text{CD8}^+$  en artritis autoinmune mediante estudios que muestran correlaciones entre la severidad de la enfermedad y el número y fenotipo de las células T  $\text{CD8}^+$  en sangre periférica o en el tejido inflamatorio (118). Además, en pacientes con artritis reumatoide temprana el número absoluto de células T  $\text{CD8}^+$  fue

más alto que en controles sanos; sin embargo, en pacientes en remisión el número de linfocitos T CD8<sup>+</sup> fue reducido, comparados con controles sanos y pacientes con AR activa (119), lo que podría sugerir una menor respuesta a la estimulación por parte de la PHA en este estudio, teniendo en cuenta que algunos de los pacientes habían sido anteriormente diagnosticados. Sería interesante, para próximos estudios dividir los pacientes en subgrupos que tengan en cuenta; ingesta de medicamentos, el tiempo y el progreso de la enfermedad para descartar diferencias significativas entre los subgrupos.

Por otro lado, el veneno de *Tityus sp* provocó una disminución de IL-10 en sobrenadantes de cultivo, para las concentraciones de 252 y 126 µg/ml de veneno en comparación con el control (células + PHA) (Figura 11D). Estos hallazgos contrastan con lo reportado por otros autores que exponen un incremento en IL-10 y otras citoquinas como respuesta al cuadro de envenenamiento por ecorpionismo y también, por la interacción con canales iónicos de algunas toxinas aisladas en estudios *in vitro* (25,84,102,120). Sin embargo, Zoccal y colaboradores (2011) reportaron que a las toxinas Ts1, Ts2 y Ts6 del veneno de *Tityus serrulatus* no liberaron de IL-10 en ninguna de las concentraciones estudiadas (100, 50 y 25 µg/ml) en sobrenadantes de cultivo de la línea celular de macrófagos murinos (J774.1) previamente estimulada con LPS (Endotoxina) (82).

Debido a lo anterior, los autores sugieren que la producción de citoquinas por parte de los macrófagos estimulados por toxinas es independiente de las interacciones de los canales iónicos de las toxinas. Esto está respaldado por el hecho de que Ts1 y Ts2 se unen a los canales de Na<sup>+</sup>, presentando efectos opuestos respecto al NO, TNF-α, IL-6 e IL-10. Además, Ts1 y Ts6 mostraron efectos similares a pesar de que actúan sobre los canales iónicos Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>, respectivamente en los canales iónicos de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>, respectivamente (82). Por lo tanto, considerando que el presente estudio es piloto, es imperante la necesidad de estudios adicionales del veneno del escorpión *Tityus sp* y la identificación, clasificación de las toxinas del veneno, así como su interacción en la producción de citoquinas, para correlacionar mejor su capacidad proinflamatoria y/o antiinflamatoria y las interacciones con los canales iónicos.

Los niveles de citoquina IL-6 no se vieron afectados con la exposición a ninguna de las concentraciones de veneno obtenidos de sobrenadantes de cultivo, sin embargo, sí hubo una diferencia significativa para el diagnóstico de AR, obteniendo un mayor nivel de esta citoquina en comparación con los controles sanos. Estos resultados coinciden con los resultados obtenidos por Xuefeng Wang, Liyang Dong y colaboradores (2015), quienes encontraron un aumento de los niveles de IL-6 obtenido de sobrenadantes de cultivo de CMSP de 24h, estimuladas con PHA en pacientes con AR en comparación con controles sanos (121). Esta citoquina proinflamatoria se encuentra asociada a los procesos inflamatorios y se encuentra en abundancia en el líquido sinovial y en el suero de los pacientes con AR, y sus altos niveles se han correlacionado con la actividad de la enfermedad y la destrucción articular; la IL-6 junto a otras citoquinas, promueve la diferenciación de la IL-17 para la producción de células T colaboradoras (Th17), que juegan un papel importante en la inducción de la respuesta autoinmune. La estimulación de estas células rompe el equilibrio inmunológico y tiene gran importancia patológica en las enfermedades inmunológicas y el desarrollo de enfermedades autoinmunes e inflamatorias (7).

Los niveles de citoquinas IL-6, TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$ , de CMSP de pacientes AR y sanas, expuestas a 252, 126, 63  $\mu\text{g/ml}$  de veneno *Tityus sp*, no presentaron cambios significativos en los niveles de estas para los sobrenadantes de cultivo. A pesar de que se ha demostrado que el veneno escorpiónico tiene la capacidad de liberación de mediadores celulares como respuesta al envenenamiento por ecorpionismo y también en estudios *in vitro* (25,84,102,120). En ese sentido, sería importante continuar con el estudio del efecto del veneno en la liberación de mediadores celulares.

Finalmente, en el análisis sociodemográfico se pudo observar que las pacientes con AR suelen presentar comprometidas todas las articulaciones grandes (hombros, tobillos y rodillas), así como las articulaciones pequeñas (metacarpofalángicas, interfalángicas proximales y las muñecas). Estos resultados coinciden con lo reportado por Hernández y colaboradores (2012), quienes observaron que las articulaciones más afectadas, en 21 pacientes con Artritis Reumatoide temprana, fueron las Metacarpofalángicas (80%), interfalángicas proximales (85,71 %) y las muñecas (85,71

%). De igual manera para las articulaciones grandes, donde se observó que los Hombros (37,5), tobillos (61,90) y rodillas (57,14) estuvieron también afectados, las cuales son afectaciones características de la AR (122). Por otro lado el rango de edad en este estudio fue de 20-69 años de edad, por lo que sería interesante realizar subclasificaciones de las edades así como también en el progreso de la enfermedad, ya que se ha observado que en las distintas etapas de la artritis reumatoide se pueden exhibir cambios en los criterios serológicos, así como en el número de articulaciones afectas y la movilidad, importantes en la respuesta del paciente hacia distintos fármaco (4,15).

## 9. CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio evidenciaron que el veneno de *Tityus sp* en concentraciones de 252 y 126 µg/ml, ejerce un efecto inmunomodulador en las CMPS tanto de pacientes con diagnóstico de AR, como pacientes sanas, principalmente en el porcentaje de proliferación y en la liberación de citoquinas como la IL-10.

Las diferencias encontradas en la proliferación para las poblaciones CD3+, CD3+CD4+, CD3CD8+ de CMPS de ambos grupos, para las concentraciones de 252 y 126 µg/ml, podrían indicar una posible inhibición de la activación celular (estimulada por PHA) mediante el bloqueo selectivo de canales iónicos ( de Potasio (K<sup>+</sup>) principalmente), debido a la importancia de los canales de potasio en el mantenimiento de niveles de Ca citosólicos para una activación efectiva seguida de una proliferación y diferenciación exitosa de los linfocitos T.

Por otro lado, el veneno de *Tityus sp* no indujo cambios significativos en el porcentaje de activación de células T CD4+ y CD8+ en marcadores de activación CD69 y HLADR. Sin embargo, se observó una inhibición del porcentaje de activación en células T CD8+ que expresaron HLADR de pacientes con AR en comparación con controles. Se ha demostrado que en algunos casos donde los pacientes presentan remisión de la enfermedad, los niveles séricos de T CD8+ se encuentran disminuidos en comparación con pacientes con AR activa, por lo que se podría tener en cuenta la discriminación por subgrupos entre pacientes que ya han tomado medicamentos, recién diagnosticados y con artritis activa.

Los niveles de citoquinas IL-6, TNF-α, IL1-β, por su parte, no se vieron afectados por la exposición de CMSP en las distintas concentraciones de veneno de *Tityus sp* (252, 126, 63 µg/ml) para los dos grupos estudiados. Sin embargo, hubo una disminución significativa en los niveles de IL-10 expuestas a las concentraciones 252 y 126 µg/ml en comparación con células no tratadas, para los dos grupos.

Por último, los niveles de citoquina IL-6 fueron estadísticamente significativos, a la baja, en comparación a los controles. La IL-6 se encuentra en mayores cantidades en sangre

periférica y en tejido afectados en AR, por lo que estos niveles se van a expresar al alza, como respuesta al estado inflamatorio del paciente.

Teniendo en cuenta que este fue el primer estudio sobre la capacidad inmunomoduladora del veneno de un escorpión endémico *Tityus sp*, del municipio de Popayán se evidencia su importancia en este campo, gracias a esto, el presente abre una puerta para el estudio prospectivo del veneno, su caracterización e identificación de sus componentes como posibles blancos terapéuticos.

## **10.RECOMENDACIONES**

Sería interesante para próximos estudios poder trabajar con una muestra poblacional más grande, teniendo en cuenta los resultados de este estudio piloto para corroborar la variabilidad en las pruebas en donde los resultados no fueron significativos.

Por otro lado, creemos que es importante que, en estudios futuros asociados con Artritis reumatoide, se pueda realizar una clasificación de los pacientes en subgrupos de estudio, teniendo en cuenta etapa de progresión de la enfermedad, edad, anterior consumo de medicamentos, con el fin de realizar mejores interpretaciones de los resultados obtenidos.

Por último, podrían tenerse en cuenta tiempos de incubación más largos y examinar los efectos del veneno tomando mediciones a lo largo del cultivo para observar si existen diferencias en el tiempo de exposición al agente evaluado, es decir, el veneno.

## 11. BIBLIOGRAFIA

1. Scott DL, Wolfe F, Huizinga TW. Rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2010 Sep;376(9746):1094–108.
2. Rudan I, Sidhu S, Papan A, Meng S-J, Xin-Wei Y, Wang W, et al. Prevalence of rheumatoid arthritis in low- and middle-income countries: A systematic review and analysis. *J Glob Health*. 2015 Jun;5(1):010409.
3. Silman AJ, Pearson JE. Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res*. 2002;4(Suppl 3):S265.
4. Vinaccia S, Juárez F, Anaya JM. Relaciones entre variables sociodemográficas, incapacidad funcional, dolor y desesperanza aprendida en pacientes con diagnóstico de artritis reumatoide. *Int J Clin Heal Psychol*. 2004;4(1):91–103.
5. Maldonado G, Ríos C, Paredes C, Ferro C, Intriago MJ, Aguirre C, et al. Depresión en artritis reumatoide. *Rev Colomb Reumatol*. 2017;24(2):84–91.
6. Fondo Colombiano de Enfermedades de Alto Costo (CAC). Situación de la artritis reumatoide en Colombia. Bogotá D.C, Colombia; 2018.
7. Mateen S, Zafar A, Moin S, Khan AQ, Zubair S. Understanding the role of cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clin Chim Acta*. 2016 Apr;455:161–71.
8. Firestein GS, McInnes IB. Immunopathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *Immunity*. 2017;46(2):183–96.
9. Alghasham A, Rasheed Z. Therapeutic targets for rheumatoid arthritis: Progress and promises. *Autoimmunity*. 2014 Mar;47(2):77–94.
10. Alunno A, Carubbi F, Giacomelli R, Gerli R. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: new players and therapeutic targets. *BMC Rheumatol*. 2017;1(1):1–13.
11. McInnes IB, Schett G. Mechanism of Disease The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *N Engl J Med*. 2011;365(23):2205–19.
12. Miossec P, Korn T, Kuchroo VK. Interleukin-17 and Type 17 Helper T Cells. *N Engl J Med*. 2009 Aug;361(9):888–98.
13. Alle G. Artritis reumatoidea: actualización en conceptos fisiopatológicos. *AUTONMUNIDAD*. 2020;5(2545–6032):71.
14. Alam J, Jantan I, Bukhari SNA. Rheumatoid arthritis: Recent advances on its etiology, role of cytokines and pharmacotherapy. *Biomed Pharmacother*. 2017;92:615–33.
15. Guo Q, Wang Y, Xu D, Nossent J, Pavlos NJ, Xu J. Rheumatoid arthritis: Pathological mechanisms and modern pharmacologic therapies. *Bone Res*. 2018;6(1).
16. Barral Mena E, García Cárdbaba LM, Canet Tarrés A, Enríquez Merayo E, Cruz

- Utrilla A, de Inocencio Arocena J. Methotrexate in juvenile idiopathic arthritis. Adverse effects and associated factors. *An Pediatr [Internet]*. 2020;92(3):124–31. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.anpedi.2019.05.010>
17. Linares V, Alonso V, Domingo JL. Oxidative stress as a mechanism underlying sulfasalazine-induced toxicity. *Expert Opin Drug Saf*. 2011 Mar;10(2):253–63.
  18. Kasarekto K, Cudnoch-Jędrzejewska A, Członkowski A, Mirowska-Guzel D. Mechanism of action of three newly registered drugs for multiple sclerosis treatment. *Pharmacol Reports*. 2017 Aug;69(4):702–8.
  19. Elvin JG, Couston RG, van der Walle CF. Therapeutic antibodies: Market considerations, disease targets and bioprocessing. *Int J Pharm*. 2013 Jan;440(1):83–98.
  20. Brown W, Coles A. Alemtuzumab: evidence for its potential in relapsing&ndash;remitting multiple sclerosis. *Drug Des Devel Ther*. 2013 Mar;7:131.
  21. Scherer HU, Burmester G, Riemekasten G. Targeting activated T cells: successful use of anti-CD25 monoclonal antibody basiliximab in a patient with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis*. 2006 Sep;65(9):1245.
  22. Lunardon L, Payne AS. Rituximab for autoimmune blistering diseases: recent studies, new insights. *G Ital Dermatol Venereol*. 2012 Jun;147(3):269–76.
  23. Attarde SS, Pandit S V. Scorpion venom as therapeutic agent - current perspective. *Int J Curr Pharm Rev Res*. 2016;7(2):59–72.
  24. Bergeron ZL, Bingham J-P. Scorpion toxins specific for potassium (K<sup>+</sup>) channels: a historical overview of peptide bioengineering. *Toxins (Basel)*. 2012 Nov;4(11):1082–119.
  25. Ortiz E, Gurrola GB, Schwartz EF, Possani LD. Scorpion venom components as potential candidates for drug development. *Toxicon*. 2015;93:125–35.
  26. Bagal SK, Brown AD, Cox PJ, Omoto K, Owen RM, Pryde DC, et al. Ion Channels as Therapeutic Targets: A Drug Discovery Perspective. *J Med Chem*. 2013 Feb;56(3):593–624.
  27. Thell K, Hellinger R, Schabbauer G, Gruber CW. Immunosuppressive peptides and their therapeutic applications. *Drug Discov Today*. 2014;19(5):645–53.
  28. Davidson A, Diamond B. AUTOIMMUNE DISEASES. *N Engl J Med*. 2001;344(14):1703–14.
  29. Elwyn G, Laitner S, Coulter A, Walker E, Watson P TR. Medicamentos para la artritis reumatoide. *Bmj*. 2009;1–16.
  30. Fox JW, Serrano SMT. Approaching the golden age of natural product pharmaceuticals from venom libraries: an overview of toxins and toxin-derivatives currently involved in therapeutic or diagnostic applications. *Curr Pharm Des*.

2007;13(28):2927–34.

31. de Souza JM, Goncalves BDC, Gomez M V., Vieira LB, Ribeiro FM. Animal toxins as therapeutic tools to treat neurodegenerative diseases. *Front Pharmacol.* 2018;9(FEB):1–25.
32. Cota-Arce JM. Efecto inmunomodulador del veneno de dos especies de escorpión, *Centruroides limpidus* y *Centruroides noxius*, en la diferenciación de linfocitos T cooperadores. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California; 2018.
33. Fung-Leung WP, Edwards W, Liu Y, Ngo K, Angsana J, Castro G, et al. T cell subset and stimulation strength-dependent modulation of T cell activation by Kv1.3 blockers. *PLoS One.* 2017;12(1):3–8.
34. Morales Duque H. Caracterização de novos peptídeos bloqueadores de canais para K<sup>+</sup> isolados da peçonha do escorpião *Tityus* sp. 2013 Feb;
35. Santoyo M, Ríos A, Furuzawa J, Durán D, Hernández E, Esquivel Y, et al. El papel del canal Kv1.3 en el desarrollo de la artritis reumatoide. *Investig en Discapac [Internet].* 2016;5:146–55. Available from: [www.medigraphic.org.mx](http://www.medigraphic.org.mx)<http://www.medigraphic.com/ridwww.medigraphic.org.mx> %0A<https://adm.org.mx/img/Revista/2016/3> COMPLETO ADM 5-2016.pdf#page=19
36. Rodríguez-Solís AJ, Villarrea-V EC, Corzo-B A. Venenos animales, fuente para el desarrollo de agentes terapéuticos. *Inventio.* 2019;15(36):43–52.
37. Kvien TK, Uhlig T, Ødegård S, Heiberg MS. Epidemiological Aspects of Rheumatoid Arthritis: The Sex Ratio. *Ann N Y Acad Sci.* 2006 Jun;1069(1):212–22.
38. Uhlig T, Moe RH, Kvien TK. The Burden of Disease in Rheumatoid Arthritis. *Pharmacoeconomics.* 2014;32(9):841–51.
39. Fernández-Ávila DG, Rincón-Riaño DN, Bernal-Macías S, Gutiérrez Dávila JM, Rosselli D. Prevalencia de la artritis reumatoide en Colombia según información del Sistema Integral de Información de la Protección Social. *Rev Colomb Reumatol.* 2019;26(2):83–7.
40. Rojas-Villarraga A, Ortega-Hernandez O-D, Gomez LF, Pardo AL, López-Guzmán S, Arango-Ferreira C, et al. Risk Factors Associated with Different Stages of Atherosclerosis in Colombian Patients with Rheumatoid Arthritis. *Semin Arthritis Rheum.* 2008 Oct;38(2):71–82.
41. Holmdahl R. Association of MHC and rheumatoid arthritis. Why is rheumatoid arthritis associated with the MHC genetic region? An introduction. *Arthritis Res.* 2000;2(3):203–4.
42. Muñoz-Valle JF, Padilla-Gutiérrez JR, Hernández-Bello J, Ruiz-Noa Y, Valle Y, Palafox-Sánchez CA, et al. Polimorfismo –1123G>C en el gen PTPN22 y anticuerpos antipeptido citrulinado cíclico en la artritis reumatoide. *Med Clin (Barc).* 2017 Aug;149(3):95–100.

43. Deane KD, Demoruelle MK, Kelmenson LB, Kuhn KA, Norris JM, Holers VM. Genetic and environmental risk factors for rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2017;31(1):3–18.
44. Kharlamova N, Jiang X, Sherina N, Potempa B, Israelsson L, Quirke AM, et al. Antibodies to *Porphyromonas gingivalis* Indicate Interaction between Oral Infection, Smoking, and Risk Genes in Rheumatoid Arthritis Etiology. *Arthritis Rheumatol.* 2016;68(3):604–13.
45. Cutolo M, Capellino S, Montagna P, Villaggio B, Sulli A, Serio B, et al. New roles for estrogens in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 2003;21(6):687–90.
46. Rindfleisch JA, Muller D. Diagnosis and management of rheumatoid arthritis. *Am Fam Physician.* 2005 Sep;72(6):1037–47.
47. Aletaha D, Smolen JS. Diagnosis and Management of Rheumatoid Arthritis: A Review. *JAMA - J Am Med Assoc.* 2018;320(13):1360–72.
48. Ouyang W, Kolls JK, Zheng Y. The Biological Functions of T Helper 17 Cell Effector Cytokines in Inflammation. *Immunity.* 2008 Apr;28(4):454–67.
49. van der Woude D, Lie BA, Lundström E, Balsa A, Feitsma AL, Houwing-Duistermaat JJ, et al. Protection against anti-citrullinated protein antibody-positive rheumatoid arthritis is predominantly associated with HLA-DRB1\*1301: A meta-analysis of HLA-DRB1 associations with anti-citrullinated protein antibody-positive and anti-citrullinated protein. *Arthritis Rheum.* 2010 May;62(5):1236–45.
50. Croia C, Bursi R, Sutera D, Petrelli F, Alunno A, Puxeddu I. One year in review 2019: pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 2019;37(3):347–57.
51. Smolen JS, Steiner G. Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Drug Discov.* 2003 Jun;2(6):473–88.
52. Gillespie MT. Impact of cytokines and T lymphocytes upon osteoclast differentiation and function. *Arthritis Res Ther.* 2007;9(2):103.
53. Young A, Koduri G. Extra-articular manifestations and complications of rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2007;21(5):907–27.
54. Muravyev Y V. Extra-articular manifestations of rheumatoid arthritis. *Nauchno-Prakticheskaya Revmatol.* 2018;56(3):356–62.
55. Ha YJ, Lee S-K. Clinical manifestations and diagnosis of rheumatoid arthritis. *J Korean Med Assoc.* 2010 Oct;53(10):862.
56. Scott IC, Machin A, Mallen CD, Hider SL. The extra-articular impacts of rheumatoid arthritis: moving towards holistic care. *BMC Rheumatol.* 2018 Dec;2(1).
57. Van Der Helm-Van Mil AHM, Detert J, Le Cessie S, Filer A, Bastian H, Burmester GR, et al. Validation of a prediction rule for disease outcome in patients with recent-onset undifferentiated arthritis: Moving toward individualized treatment decision-making. *Arthritis Rheum.* 2008 Aug;58(8):2241–7.

58. Heidari<sup>1</sup> B, Lotfi<sup>1</sup> Z, Ali Firouzjahi<sup>2</sup> R, Heidari<sup>3</sup> P. Comparing the diagnostic values of Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and rheumatoid factor for rheumatoid arthritis. Vol. 33, Research in Medicine. Research in Medicine; 2010.
59. Cimmino MA, Salvarani C, Macchioni P, Montecucco C, Fossaluzza V, Mascia MT, et al. Extra-articular manifestations in 587 Italian patients with rheumatoid arthritis. Rheumatol Int. 2000;19(6):213–7.
60. Al-Ghamdi A, Attar S. Extra-articular manifestations of rheumatoid arthritis: a hospital-based study. Ann Saudi Med. 2009;29(3).
61. Turesson C, Jacobsson L, Bergström U, Truedsson L, Sturfelt G. Predictors of extra-articular manifestations in rheumatoid arthritis. Scand J Rheumatol. 2000;29(6):358–64.
62. Smolen JS, Landewé R, Bijlsma J, Burmester G, Chatzidionysiou K, Dougados M, et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2016 update. Ann Rheum Dis. 2017;76(6):960–77.
63. Smolen JS, Breedveld FC, Burmester GR, Bykerk V, Dougados M, Emery P, et al. Treating rheumatoid arthritis to target: 2014 update of the recommendations of an international task force. Ann Rheum Dis. 2016 Jan;75(1):3–15.
64. Lopez-Olivo MA, Tayar JH, Martinez-Lopez JA, Pollono EN, Cueto JP, Gonzales-Crespo MR, et al. Risk of malignancies in patients with rheumatoid arthritis treated with biologic therapy: A meta-analysis. Vol. 308, JAMA - Journal of the American Medical Association. JAMA; 2012. p. 898–908.
65. Kremer JM, O'Dell JR, Romain PL. Major side effects of low-dose methotrexate - UpToDate. 2020.
66. Fox R, Helfgott SM. Pharmacology, dosing, and adverse effects of leflunomide in the treatment of rheumatoid arthritis - UpToDate. 2019.
67. Fleischmann R, van Vollenhoven RF, Vencovský J, Alten R, Davies O, Mountian I, et al. Long-Term Maintenance of Certolizumab Pegol Safety and Efficacy, in Combination with Methotrexate and as Monotherapy, in Rheumatoid Arthritis Patients. Rheumatol Ther. 2017 Jun;4(1):57–69.
68. Keystone EC, Breedveld FC, Kupper H, Li Y, Florentinus S, Sainsbury I. Long-term use of adalimumab as monotherapy after attainment of low disease activity with adalimumab plus methotrexate in patients with rheumatoid arthritis. RMD Open. 2018;4(1).
69. Schaible TF. Long term safety of infliximab. Can J Gastroenterol. 2000;14(SUPPL. C).
70. Brusca RC & GJB 2003. Brusca, R.C. & G.J. Brusca. 2003. Invertebrates. 2<sup>a</sup> ed. Sinauer Associates, Massachusetts, 936 pp. Vol. 01. 2003.
71. Gómez-C JP, Otero-P R. Ecoepidemiología de los escorpiones de importancia

médica en Colombia. Rev Fac Nac Salud Pública. 2007;25(1).

72. Estrada Gómez S, Saldarriaga MM, Cubides Cubillos S, Cupitra Vergara NI. Distribution of *Centruroides edwardsii* CENTRUROIDES EDWARDSII (GERVAIS, 1843) in the Aantioquia Province, Colombia. Acta Biológica Colomb. 2014 Jul;20(1):207–15.
73. Petricevich VL. Scorpion Venom and the Inflammatory Response. Mediators Inflamm. 2010;2010(August):1–16.
74. Ponce J, Francke OF. Clave para la identificación de especies de alacranes del género *Centruroides* Marx 1890 ( Scorpiones : Buthidae ) en el Centro Occidentede México. Biológicas. 2013;15(1):52–62.
75. Pringos E, Vignes M, Martinez J, Rolland V. Peptide neurotoxins that affect voltage-gated calcium channels: A close-up on  $\omega$ -agatoxins. Toxins (Basel). 2011;3(1):17–42.
76. De Roodt R. Veneno de escorpiones (alacranes) y envenenamiento Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana. Acta Bioquím Clín Latinoam [Internet]. 2015;49(1):55–71. Available from: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=53541285007>
77. Ding J, Chua PJ, Bay BH, Gopalakrishnakone P. Scorpion venoms as a potential source of novel cancer therapeutic compounds. Exp Biol Med. 2014;239(4):387–93.
78. Galíndez-C J. ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES HEMODINÂMICAS EM RATOS GERADAS PELAS PEÇONHAS DOS ESCORPIÕES *Centruroides margaritatus*, *Centruroides limpidus* E *Centruroides noxius*. UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ FACULDADE DE MEDICINA DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E FARMACOLOGIA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA; 2018.
79. Smith-Garvin JE, Koretzky GA, Jordan MS. T Cell Activation. Annu Rev Immunol [Internet]. 2009 [cited 2022 Jan 18];27:591. Available from: </pmc/articles/PMC2740335/>
80. Fukuhara YD., Reis M., Dellalibera-Joviliano R, Cunha FQ., Donadi E. Increased plasma levels of IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 and TNF- $\alpha$  in patients moderately or severely envenomed by *Tityus serrulatus* scorpion sting. Toxicon. 2003 Jan;41(1):49–55.
81. Casella-Martins A, Ayres LR, Burin SM, Morais FR, Pereira JC, Faccioli LH, et al. Immunomodulatory activity of *Tityus serrulatus* scorpion venom on human T lymphocytes. J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis. 2015;21(1):4–11.
82. Zoccal KF, Bitencourt C da S, Secatto A, Sorgi CA, Bordon K de CF, Sampaio SV, et al. *Tityus serrulatus* venom and toxins Ts1, Ts2 and Ts6 induce macrophage activation and production of immune mediators. Toxicon. 2011;57(7–8):1101–8.
83. Hadaddezfuli R, Khodadadi A, Assarehzadegan MA, Pipelzadeh MH, Saadi S.

- Hemiscorpius lepturus venom induces expression and production of interleukin-12 in human monocytes. *Toxicon*. 2015 Jun 15;100:27–31.
84. Corzo G, Espino-Solis GP. Selected scorpion toxin exposures induce cytokine release in human peripheral blood mononuclear cells. *Toxicon*. 2017;127:56–62.
  85. Mazia C. Miastenia gravis y problemas relacionados [Internet]. Vol. 53. 2017. 1689–1699 p. Available from: file:///C:/Users/User/Downloads/fvm939e.pdf
  86. Bernáldez-S J. CARACTERIZACIÓN ELECTROFISIOLÓGICA DE TOXINAS PEPTÍDICAS DEL CARACOL *Conus caifornicus* EN CANALES IÓNICOS DE CALCIO. CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR DE ENSENADA; 2008.
  87. Aidley D-J, Stanfield PR. Ion Channels—Molecules in Action. Vol. 89. 1996.
  88. Salinas-Z VM. PARTICIPACIÓN DE LOS CANALES IÓNICOS DEPENDIENTES DE VOLTAJE EN EL EFECTO QUE EJERCE LA GHRELINA SOBRE LA SECRECIÓN DE HORMONA DE CRECIMIENTO EN BOVINO [Internet]. UNIVERSIDAD VERACRUZANA INSTITUTO; 2013. Available from: file:///C:/Users/User/Downloads/fvm939e.pdf
  89. Norton RS, Chandy KG. Venom-derived peptide inhibitors of voltage-gated potassium channels. *Neuropharmacology*. 2017 Dec;127:124–38.
  90. Wulff H, Calabresi PA, Allie R, Yun S, Pennington M, Beeton C, et al. The voltage-gated Kv1.3 K<sup>+</sup> channel in effector memory T cells as new target for MS. *J Clin Invest*. 2003;111(11):1703–13.
  91. Chandy KG, Wulff H, Beeton C, Pennington M, Gutman GA, Cahalan MD. K<sup>+</sup> channels as targets for specific immunomodulation. *Trends Pharmacol Sci*. 2004;25(5):280–9.
  92. Comes N, Bielanska J, Vallejo-Gracia A, Serrano-Albarrás A, Marruecos L, Gómez D, et al. The voltage-dependent K<sup>+</sup> channels Kv1.3 and Kv1.5 in human cancer. *Front Physiol*. 2013;4(October):1–13.
  93. Xu J, Wang P, Li Y, Li G, Kaczmarek LK, Wu Y, et al. The voltage-gated potassium channel Kv1.3 regulates peripheral insulin sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(9):3112–7.
  94. Arcangeli A, Crociani O, Lastraioli E, Masi A, Pillozzi S, Becchetti A. Targeting Ion Channels in Cancer: A Novel Frontier in Antineoplastic Therapy. *Curr Med Chem*. 2008;16(1):66–93.
  95. Pardo LA. Voltage-gated potassium channels in cell proliferation. *Physiology*. 2004;19(5):285–92.
  96. Panyi G, Varga Z, Gáspár R. Ion channels and lymphocyte activation. *Immunol Lett*. 2004;92(1–2):55–66.
  97. Delgado-Vega AM, Martín J, Granados J, Anaya JM. Genetic epidemiology of rheumatoid arthritis: what to expect from Latin America? *Biomedica*.

2006;26(4):562–84.

98. Ghanshani S, Wulff H, Miller MJ, Rohm H, Neben A, Gutman GA, et al. Up-regulation of the *IKCa1* Potassium Channel during T-cell Activation. *J Biol Chem*. 2000 Nov;275(47):37137–49.
99. Chandy KG, Cahalan M, Pennington M, Norton RS, Wulff H, Gutman GA. Potassium channels in T lymphocytes: toxins to therapeutic immunosuppressants. *Toxicon*. 2001 Sep;39(9):1269–76.
100. Ziegler E, Oberbarnscheidt M, Bulfone-Paus S, Förster R, Kunzendorf U, Krautwald S. CCR7 Signaling Inhibits T Cell Proliferation. *J Immunol*. 2007;179(10):6485–93.
101. Belikan P, Bühler U, Wolf C, Pramanik GK, Gollan R, Zipp F, et al. CCR7 on CD4 + T Cells Plays a Crucial Role in the Induction of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Immunol*. 2018;200(8):2554–62.
102. Lebrun B, Romi-Lebrun R, Martin-Eauclaire MF, Yasuda A, Ishiguro M, Oyama Y, et al. A four-disulphide-bridged toxin, with high affinity towards voltage-gated K<sup>+</sup> channels, isolated from *Heterometrus spinnifer* (Scorpionidae) venom. *Biochem J*. 1997;328(1):321–7.
103. Rashid MH, Huq R, Tanner MR, Chhabra S, Khoo KK, Estrada R, et al. A potent and Kv1.3-selective analogue of the scorpion toxin HsTX1 as a potential therapeutic for autoimmune diseases. *Sci Rep*. 2014 Mar;4:4509.
104. Tanner MR, Tajhya RB, Huq R, Gehrman EJ, Rodarte KE, Atik MA, et al. Prolonged immunomodulation in inflammatory arthritis using the selective Kv1.3 channel blocker HsTX1[R14A] and its PEGylated analog. *Clin Immunol*. 2017;180:45–57.
105. Jin L, Zhou Q (Tony), Chan H-K, Larson IC, Pennington MW, Morales RAV, et al. Pulmonary Delivery of the Kv1.3-Blocking Peptide HsTX1[R14A] for the Treatment of Autoimmune Diseases. *J Pharm Sci*. 2016 Feb;105(2):650–6.
106. Hashemlou M, Ahmadi M, Mirakabadi-Zare A, Hejazi M. Study on anti inflammatory effect of scorpion (*Mesobuthus eupeus*) venom in adjuvant-induced arthritis in rats. *Razi Vaccine Serum Reserch Inst*. 2009;11(July):81–90.
107. Sánchez-Ramón S, López-Longo FJ, Carreño L. Interleucinas en la fisiopatología de la artritis reumatoide: más allá de las citocinas proinflamatorias. *Reumatol Clínica*. 2011 Mar;6:20–4.
108. Hashemlou M, Zare Mirakabadi A, Ahmadi M, Hejazi M. Study on anti inflammatory effect of scorpion (*Mesobuthus eupeus*) venom in adjuvant-induced arthritis in rats. *Arch Razi Inst*. 2016;64(1):51–6.
109. Toldi G, Bajnok A, Dobi D, Kaposi A, Kovács L, Vásárhelyi B, et al. The effects of Kv1.3 and *IKCa1* potassium channel inhibition on calcium influx of human peripheral T lymphocytes in rheumatoid arthritis. *Immunobiology [Internet]*. 2013;218(3):311–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2012.05.013>

110. Tanner MR, Pennington MW, Chamberlain BH, Huq R, Gehrman EJ, Laragione T, et al. Targeting KCa1.1 channels with a scorpion venom peptide for the therapy of rat models of rheumatoid arthritis. *J Pharmacol Exp Ther*. 2018;365(2):227–36.
111. Tanner MR, Pennington MW, Chauhan SS, Laragione T, Gulko PS, Beeton C. KCa1.1 and Kv1.3 channels regulate the interactions between fibroblast-like synoviocytes and T lymphocytes during rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2019;21(1):1–21.
112. Radner H, Neogi T, Smolen JS, Aletaha D. Performance of the 2010 ACR/EULAR classification criteria for rheumatoid arthritis: A systematic literature review. Vol. 73, *Annals of the Rheumatic Diseases*. *Ann Rheum Dis*; 2014. p. 114–23.
113. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum*. 2010;62(9):2569–81.
114. Lyons AB. Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. *J Immunol Methods*. 2000 Sep;243(1–2):147–54.
115. Kindt T, Goldsby R, Osborne B. *Inmunología de los trasplantes*. INMUNOLOGIA de Kuby. 2007. 424–446 p.
116. Lam J, Wulff H. The lymphocyte potassium channels Kv1.3 and KCa3.1 as targets for immunosuppression. *Drug Dev Res*. 2011;72(7):573–84.
117. Oliveira IS, Ferreira IG, Alexandre-silva GM, Cerni FA, Cremones CM, Arantes EC, et al. Scorpion toxins targeting Kv1 . 3 channels: insights into immunosuppression. 2019;(July 2018):1–14.
118. Petrelli A, Van Wijk F. CD8+ T cells in human autoimmune arthritis: The unusual suspects. *Nat Rev Rheumatol*. 2016 Jul;12(7):421–8.
119. Carvalheiro H, Duarte C, Silva-Cardoso S, Da Silva JAP, Souto-Carneiro MM. CD8+ T cell profiles in patients with rheumatoid arthritis and their relationship to disease activity. *Arthritis Rheumatol*. 2015 Feb;67(2):363–71.
120. Petricevich VL, Lebrun I. Immunomodulatory effects of the Tityus serrulatus venom on murine macrophage functions in vitro. *Mediators Inflamm*. 2005;2005(1):39–49.
121. Wang X, Dong L, Liang Y, Ni H, Tang J, Xu C, et al. Performance evaluation of FlowCytomix assays to quantify cytokines in patients with rheumatoid arthritis. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(9):16158–66.
122. Hernández P, Hernández S, Rodríguez M, Morejón G, Rodríguez M, Cuellar H, et al. Epidemiológica y tratamiento precoz en la artritis reumatoide temprana Clinical-epidemiological characterization and early treatment in the early rheumatoid arthritis. 2012;