

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR



**CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTI-NEOPLÁSICA
EN LA LÍNEA CELULAR Neuro-2a DE UNA TOXINA
PURIFICADA DEL VENENO DE *Tityus discrepans*.**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la ilustre Universidad Central de Venezuela por la bachiller
Mugete Corina Cisneros Salazar como requisito para optar al título de Lic. en
Biología Mención Celular

Laboratorio de Neurofarmacología Celular
Centro de Biofísica y Bioquímica
Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas

Tutor: Dra. Gina D'Suze

Asesor Académico: Dra. M. Valentina Salas
Jurados: Prof. M. Lorena Marquez y Prof. Fernando González

Caracas, 2015

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS.....	V
ÍNDICE DE GRÁFICAS.....	VI
ÍNDICE DE TABLAS.....	VIII
ABREVIATURAS.....	IX
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	3
BIOLOGÍA DE ESCORPIONES.....	3
DISTRIBUCIÓN DEL GÉNERO <i>Tityus</i>	6
EMPONZOÑAMIENTO ESCORPIÓNICO.....	8
CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DEL VENENO DE <i>T. discrepans</i>	10
• Actividad sobre canales de Na ⁺	11
• Actividad sobre canales de K ⁺	13
• Actividad antibacteriana y antimicótica.....	13
• Actividad sobre el sistema hemostático.....	14
• Actividad curarizante.....	14
• Actividad inflamatoria.....	15
• Actividad antineoplásica.....	15
MUERTE CELULAR.....	15
• Necrosis.....	15
• Apoptosis.....	16
1. Vía extrínseca.....	17

2. Vía intrínseca.....	17
3. Vía lisosomal.....	19
NEUROBLASTOMA.....	21
ANTECEDENTES.....	22
OBJETIVOS.....	27
MATERIALES Y METODOLOGÍA.....	28
COLECCIÓN DEL VENENO DE <i>T. discrepans</i>	28
DETERMINACIÓN PROTÉICA.....	28
PURIFICACIÓN DE TOXINAS.....	28
ELECTROFORESIS.....	29
ESPECTROMETRÍA DE MASAS.....	29
CULTIVO DE LA LÍNEA CELULAR Neuro-2a.....	30
ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR.....	31
DETERMINACIÓN DE MUERTE POR APOPTOSIS O NECROSIS.....	32
DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD LISOSOMAL EN Neuro-2a.....	33
CULTIVO DE NEURONAS DE HIPOCAMPO.....	33
DETERMINACIÓN DEL MECANISMO DE ACCIÓN.....	35
EVALUACIÓN ESTADÍSTICA.....	36
RESULTADOS.....	38
SEPARACIÓN DE LAS FRACCIONES DEL VENENO.....	38
EFECTO CITOTÓXICO DE LAS FRACCIONES DEL VENENO.....	39
REPURIFICACIÓN DE LA FRACCIÓN ACTIVA.....	39
ESTUDIO DE LOS COMPONENTES DE LA FRACCIÓN ACTIVA	

(electroforesis y espectrometría de masa).....	40
CULTIVO DE LA LÍNEA CELULAR Neuro-2a.....	43
EFFECTO DE LA FRACCIÓN ACTIVA Y SU COMPONENTE MAYORITARIO EN LA FORMACIÓN DE DOMOS EN Neuro-2a.....	44
ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR DE LA FRACCIÓN ACTIVA.....	45
NÚMERO DE CÉLULAS TOTALES POR CAMPO.....	47
DETERMINACIÓN DE MUERTE POR APOPTOSIS O NECROSIS.....	48
• Efecto de la concentración sobre Neuro-2a.....	48
• Efecto del tiempo de exposición sobre Neuro-2a.....	53
• Efecto de los componentes de la fracción activa.....	56
• Efecto de sobre la activación lisosomal.....	58
• Efecto de la concentración sobre neuronas de hipocampo.....	60
DETERMINACIÓN DEL MECANISMO DE ACCIÓN.....	63
DISCUSIÓN.....	67
CONCLUSIONES.....	82
BIBLIOGRAFÍA.....	83

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Fósil de escorpión del silúrgico (<i>E. remipes</i>).....	4
Figura 2: Esquema dorsal de la morfología externa de un escorpión.....	6
Figura 3: Fotografía de <i>T. discrepans</i>	7
Figura 4: Distribución de <i>T. discrepans</i>	7
Figura 5: Distribución de la especie del género <i>Tityus</i> en Venezuela.....	9
Figura 6: Estructura terciaria de toxinas del veneno de <i>T. discrepans</i>	11
Figura 7: Apoptosis y Necrosis.....	16
Figura 8: Vías principales apoptóticas.....	18
Figura 9: Apoptosis inducida por la permeabilización de la membrana lisosomal.....	21
Figura 10: Gel de electroforesis en condiciones reductoras.....	41
Figura 11: Microfotografías de la línea celular Neuro-2a.....	44
Figura 12: Efecto de la concentración de p7 y F19 durante 5 h de exposición sobre Neuro-2a.....	48
Figura 13: Efecto de la concentración de p7 y F19 durante 7 h de exposición sobre Neuro-2a.....	51
Figura 14: Efecto del tiempo de exposición de F19 y p7 sobre Neuro-2a.....	54
Figura 15: Efecto de los componentes de F19 sobre Neuro-2a.....	56
Figura 16: Activación de los lisosomas en Neuro-2a por efecto de F19 y p7.....	59
Figura 17: Microfotografías de neuronas de hipocampo expuestas durante 5 h a F19 y p7.....	59
Figura 18: Microfotografías del ensayo de inmunocitoquímica.....	63

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1: Perfil cromatográfico del veneno de <i>T. discrepans</i>	38
Gráfica 2: Efecto de las fracciones del veneno en el porcentaje de muerte celular en Neuro-2a.....	39
Gráfica 3: Perfil cromatográfico de F19 del veneno de <i>T. discrepans</i>	40
Gráfica 4: Espectro de masa de p7 mediante Qtrap.....	42
Gráfica 5: Efecto de F19 y p7 sobre el porcentaje de domos.....	45
Gráfica 6: Efecto de la concentración de F19 en la viabilidad celular de Neuro-2a...	46
Gráfica 7: Efecto del tiempo de exposición de F19 y p7 sobre el número de células totales por campo.....	47
Gráfica 8: Efecto de la concentración de F19 sobre el porcentaje de muerte celular en Neuro-2a durante 5 h de exposición.....	49
Gráfica 9: Efecto de la concentración de p7 sobre el porcentaje de muerte celular en Neuro-2a durante 5 h de exposición.....	50
Gráfica 10: Efecto de F19 y p7 sobre el porcentaje de apoptosis en Neuro-2a durante 7 h de exposición.....	52
Gráfica 11: Efecto de F19 y p7 sobre el porcentaje de necrosis en Neuro-2a durante 7 h de exposición.....	53
Gráfica 12: Efecto del tiempo de exposición en el porcentaje de apoptosis inducido por F19 y p7 a 1 µg/µL sobre Neuro-2a.....	55
Gráfica 13: Efecto del tiempo de exposición en el porcentaje de necrosis inducido por F19 y p7 a 1 µg/µL sobre Neuro-2a.....	56

Gráfica 14: Efecto de los picos de F19 en el porcentaje de apoptosis sobre Neuro-2a durante 7 h de exposición.....	57
Gráfica 15: Efecto de los picos de F19 en el porcentaje de necrosis sobre Neuro-2a durante 7 h de exposición.....	58
Gráfica 16: Efecto del tiempo de exposición de F19 y p7 en la DOI de los lisosomas de Neuro-2a.....	60
Gráfica 17: Efecto de F19 y p7 en el porcentaje de apoptosis de neuronas de hipocampo durante 5 h de exposición.....	62
Gráfica 18: Efecto de F19 y p7 sobre el porcentaje de necrosis en neuronas de hipocampo durante 5 h de exposición.....	62
Gráfica 19: Efecto de F19 y p7 sobre la longitud de las neuritas de neuronas de hipocampo durante 5 h de exposición.....	63
Gráfica 20: Intensidad de fluorescencia del DAPI en Neuro-2a expuestas a F19 durante 7 h.....	65
Gráfica 21: Intensidad de fluorescencia de los complejos caspasa 3-FITC y caspasa 8-FITC en Neuro-2a.....	66
Gráfica 22: Intensidad de fluorescencia de los complejos citocromo-c-rodamina y Bcl-2-rodamina Neuro-2a.....	66

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Intensidad de luminiscencia de las bandas correspondiente a los p1, p2, p3, p4, p5, p6, p7, p8 y F19 sometidos a una corrida electroforética.....	41
Tabla 2: Masas moleculares de los picos que componen a F19 determinadas mediante Q-Trap.....	43
Tabla 3: Efecto citotóxico de F19 sobre Neuro-2a.....	46

ABREVIATURAS

aa: Aminoácidos.

ACN: Acetonitrilo.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario.

AGAP: Péptido analgésico antitumoral.

AIF: Factor inductor de apoptosis.

amu/s: Unidad de masa atómica por segundo.

ANTP: Péptido antitumoral.

Apaf-1: Proteasa apoptótica activadora del factor 1.

A. calcoaceticus: *Acinetobacter calcoaceticus*.

A. crassicauda: *Androctonus crassicauda*.

A. domesticus: *Acheta domesticus*.

Bact: Bactridina.

Bacts: Bactridinas.

Bak: Bcl-2 homologous antagonists/killer.

Bax: Proteína 4 semejante a Bcl-2.

BE: Bromuro de Etidio.

BH3: Bcl-2 homology domain 3 agonist.

Bid: Dominio de interacción agonista de muerte de BH3.

BK: Big Potassium.

B. martensii: *Buthus martensii*.

B. subtilis: *Bacillo subtilis*.

CAD: Caspase- activated DNA.

Caspasa: Cisteina-Aspartato Proteasa.

ChTX: Caribdotoxina.

CI₅₀: Concentración inhibitoria media.

CLAR: Cromatografía Líquida de Alta Resolución.

CLAR-FR: Cromatografía Líquida de Alta Resolución de Fase Revesa.

CITX: Clorotoxina.

C. margaritatus: *Centruroides margaritatus*.

DAPI: 4',6-diamino-2-fenilindol.

DD: Dominio de muerte.

DED's: Dominios efectores de muerte.

DISC: Complejo señalizador de iniciación de muerte.

DMEM: Dulbecco's modified Eagles medium.

DOI: Densidad óptica integrada.

Dtto: Distrito.

DUM: Dorsal unpaired median.

Edo: Estado.

EDTA: Ácido etildiaminotetraacético.

EMC: Compatibilidad electro-magnética.

Endo-G: Endonucleasa G.

EPP's: Potenciales de la placa terminal.

E. feacalis: *Entorococcus feacalis*.

E. remipes: *Euryptero remipes*.

FADD: Proteína Asociada a Fas con Dominio de Muerte.

Fas-L: Ligando de Fas.

FITC: Fluorescein isothiocyanate.

FR: Fase reversa.

HBSS: Hank's Balanced Salt Solution.

HEPES: Ácido 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazina-etanesulfónico.

HtrA2/Omi: Proteína A2 requerida para altas temperaturas.

H. bengalensis: *Heterometrus bengalensis*.

H. crepitans: *Hyla crepitans*.

IAP: Proteínas inhibidoras de apoptosis.

IbTX: Iberotoxina.

IgG: Inmunoglobulina G.

InfTx: Toxina inflamatoria.

L. quinquestriatus: *Leirus quinquestriatus*.

MALDI-TOF: Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization (Spectrometry) Time of Flight.

MAP quinasas: Proteínas activadas por mitógeno.

MAP1/MAP2: Proteínas asociadas a microtúbulos.

MEPP's: Potenciales miniaturas de la placa terminal.

MgTX: Margotoxina.

MMP-2: Metaloproteínasa 2 de la matriz.

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium de bromuro.

M. luteus: *Micrococcus luteu.*

M.M: Masa molecular.

M. musculus: *Mus musculus.*

M. phaseolina: *Macrophomina phaseolina.*

m.s.n.m: Metros sobre el nivel del mar.

M. tamulus: *Mesobuthus tamulus.*

m/z: Masa /Carga.

NA: Naranja de acridina.

nano-ESI-ITMS: Nano-Electrospray Ionization Ion Trap Mass Spectrometry.

NB: Neuro Basal.

N-CAM: Molécula de adhesión de células neuronales.

NGF: Factor de crecimiento neuronal.

NMR: Resonancia Magnética Nuclear.

ON: Óxido nítrico.

O. doriae: *Odontobuthus doriae.*

PARP: Poly (ADP-ribose) polymerase

PBS: Phosphate buffered saline.

PGE2: Prostaglandina 2.

PML: Permeabilización de la membrana lisosomal.

P. aeruginosa: *Pseudomonas aeruginosa.*

RGB: Rojo, Verde, Azul.

SAB: Albúmina sérica bovina.

SDS: Dodecilsulfato sódico.

SFB: Suero fetal bovino.

Smac/DIABLO: Second Mitochondrial derived activator of Caspase/Direct IAP-Binding protein with a low pI.

SVCIII: Componente III del veneno de escorpiones.

S. dawley: *Sprague dawley.*

TFA: Ácido trifluoracético.

TIFF: Tagged Image File Format.

TNFR: Receptor del Factor de Necrosis Tumoral.

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa.

TP: Tiempo de Protombina.

TPT: Tiempo parcial de tromboplastina.

TK: Tirocin-quinasa.

T. discrepans: *Tityus discrepans.*

T. molitor: *Tenebrio molitor.*

t-PA: Tissue plasminogen activator.

UV: Ultravioleta.

X. laevis: *Xenopus laevis.*

Y. enterocolítica: *Yersinia enterocolítica.*

3D: Tridimensional.