

RESUMEN

Los escorpiones son uno de los grupos más antiguos de animales terrestres. Su veneno lo utilizan principalmente para capturar presas para su alimentación y defensa. Sin embargo el humano lo ha utilizado en la medicina tradicional debido a que está compuesto por componentes biológicamente activos. De estos, se han descrito toxinas, específicamente del veneno de *Tityus discrepans*, con actividad antineoplásica. Es por eso, que este trabajo tiene como objetivo caracterizar la actividad anticancerígena de una toxina del veneno de *T. discrepans* sobre una línea celular cancerígena de neuroblastoma (Neuro-2a). Para ello se aislaron cuarenta fracciones del veneno a través de CLAR-FR, con un ensayo de citotoxicidad se demostró que sólo tres (F1, F19 y F36) indujeron al menos el 70 % de muerte celular y que F19 disminuye la viabilidad celular de Neuro-2a de manera dosis dependiente con una CI_{50} de $0,71 \mu\text{g}/\mu\text{L}$. F19 fue repurificada por CLAR-FR y su componente mayoritario es p7. Mediante electroforesis y espectrometría de masas se demostró que F19 está conformada por al menos 10 componentes de M.M entre 3845,6 y 8157,7 Da. A través de un ensayo con NA/BE se demostró, que de todos los componentes de F19, p7 es el responsable de la actividad anticancerígena, la cual depende de la concentración y del tiempo de exposición. También se determinó que el mecanismo de acción de p7 ocurre por apoptosis. El mayor porcentaje de muerte celular por apoptosis inducido por F19 y p7 fue a las 7 h de exposición con un aumento en la actividad lisosomal de las células. El efecto de F19 y p7 es similar, sin embargo p7 es más potente, debido a su mayor porcentaje de pureza. Se presume que la activación de los lisosomas se encuentra asociada a la inducción de muerte por apoptosis. El mecanismo de acción se estudió median-

te inmunocitoquímica, en el cual se demostró que la actividad apoptogénica es caspasa dependiente.

En conclusión, en este estudio se demostró que el veneno de *T. discrepans* contiene una toxina con actividad apoptogénica sobre neuroblastomas. Esta toxina, p7, es el componente activo principal de F19, fracción aislada del veneno por CLAR-FR. El p7 ejerce su acción apoptogénica en un tiempo óptimo de 7 h y no tiene un efecto significativo en neuronas de hipocampo. Se presume que dicha actividad, es mediada a través de la permeabilización de la membrana lisosomal en estas células por el aumento de la actividad lisosomal, lo cual induciría la liberación de distintas proteasas que de manera caspasa dependiente (caspasa-3), como indican los resultados de inmunocitoquímica, generan la muerte celular del neuroblastoma.

INTRODUCCIÓN

Biología de los escorpiones.

Los escorpiones han despertado toda clase de mitos por ser antiguos habitantes de la Tierra, se han encontrado fósiles en sedimentos del Paleozoico de hace 450 y 500 millones de años. Ellos son los quelicerados vivientes con registro fósil más antiguo (**Figura 1**) y en consecuencia constituyen el grupo más cercano al arácnido primigenio, por lo que resultan claves para entender la evolución y la filogenia de la Clase Arachnida y del Subphylum Chelicerata; sus parentescos y sus relaciones con otros grupos cercanos. Además constituyen uno de los pocos ejemplos contenidos en registro fósil donde queda documentado el proceso de terrestriación de formas inicialmente acuáticas (Melic, 1996). Pertenecen al Phylum Arthropoda, Subphylum Chelicerata, Clase Arachnida y al Orden Scorpionida, el cual comprende catorce familias de escorpiones: Akravidae, Bothriuridae, Buthidae, Caraboctonidae, Chactidae, Chaerilidae, Euscorpiidae, Hemiscorpiidae, Iuridae, Microcharmidae, Pseudochactidae, Scorpionidae Superstitioniidae y Vaejovidae (Kovarik, 2009; González-Sponga, 2011).

Venezuela ocupa el primer lugar en América del Sur en cuanto a diversidad de especies de escorpiones. Hasta los momentos se han clasificado ciento ochenta y cuatro especies, agrupadas en cinco familias (Buthidae, Chactidae, Euscorpiidae, Hemiscorpiidae y Scorpionidae) y diecisiete géneros. La familia Buthidae en Venezuela está conformada por los géneros: *Ananteris* (30 especies), *Centruroides* (2 especies), *Isometrus* (1 especie), *Mesotityus* (1 especie), *Microtityus* (8 especies), *Rophalurus* (1 especie) y *Tityus* (54 especies) el cual corresponde al 28,3 % de la escorpio-fauna descrita y reúne las especies responsables de

los accidentes escorpiónicos graves en el país, debido a la alta toxicidad de su veneno y al acoplamiento de su distribución geográfica con la mayoría de la población venezolana (Rojas-Runjaic y De Sousa, 2007; González-Sponga, 2011).



Figura 1: Fósil de escorpión del silúrgico (*E. remipes*). Tomado de <http://museumvictoria.com.au/melbournmuseum/discoverycentre/600-million-years/timeline/silurian/eurypterids/> [Consulta: 02 enero de 2015].

Respecto a su morfología el cuerpo de un escorpión está dividido en tres regiones (**Figura 2**): **el prosoma** (región anterior del cuerpo) que incluye la boca, los ojos laterales y mediales; los quelíceros, apéndices pares en forma de pinzas dispuestos a los lados de la boca; los pedipalpos, apéndices pares situados en la parte anterior del prosoma que precede a las quelas (provistos de receptores sensoriales) y las patas. **El mesosoma** (región media del cuerpo) formado por siete segmentos llamados tergitos, el cual en el lado ventral tiene cinco placas llamadas esternitos, las lamelas genitales cubriendo la apertura genital, los estigmas y los peines como órganos sensoriales. **El metasoma** (región caudal del cuerpo) dividi-

do en cinco segmentos y un último segmento llamado telson, donde se encuentra la glándula productora y el aparato inoculador de veneno, el acúleo y tubérculos y cerdas que funcionan como sensores que detectan las vibraciones emitidas a través del aire (Polis,1990; González-Sponga, 2011).

Los escorpiones son animales poco vistosos, solitarios y en pocas ocasiones se les llega a ver junto a otro escorpión. Una de estas veces es durante la danza nupcial, preludio de la fecundación. El período de reproducción coincide con la época de lluvia (mayo-agosto y octubre-noviembre). Son ovovivíparos con aproximadamente treinta crías por camada, posadas por la madre sobre su dorso donde se alimentan del vitelo que contiene su cuerpo, allí permanecen hasta aproximadamente un mes aunque ya posean veneno para capturar sus propias presas. Los escorpiones se alimentan de artrópodos vivos. Las especies que tienen quelas finas generalmente poseen un veneno potente que inmoviliza y mata a las presas en segundos, luego las capturan con las quelas y las trituran usando los pedipalpos. Los escorpiones que poseen quelas grandes y fuertes (como los del género *Broteas*) las utilizan para inmovilizar la presa mientras la trituran con sus quelíceros (González-Sponga, 2011).

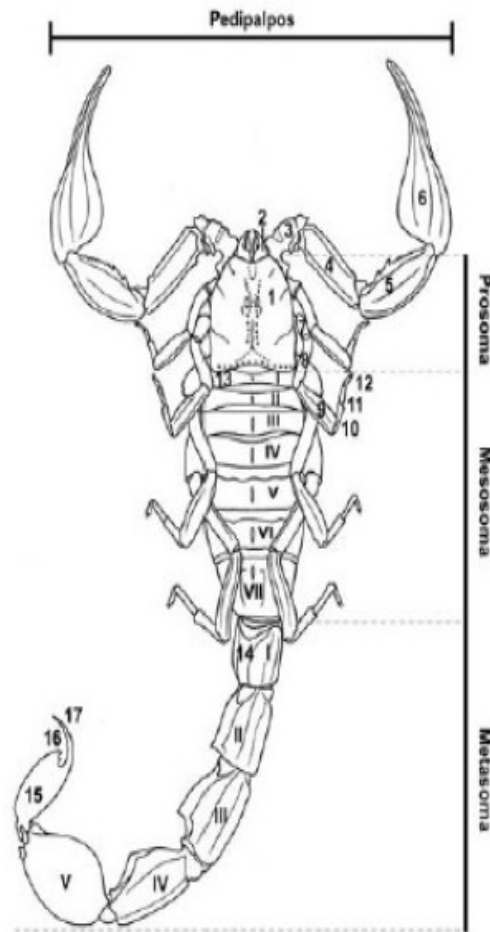


Figura 2: Esquema dorsal de la morfología externa de un escorpión. (1) Prosoma, (2) Quelíceros, (3) Trocánter del pedipalpo, (4, 8) Fémur, (5, 9) Tibia, (6) Quela, (7) Trocánter de las patas, (10) Pretarso, (11) Basitarso, (12) Telotarso, (13) Mesosoma (tergitos I a VII), (14) Segmentos caudales I a V (15) Telson, (16) Tubérculo subaculear y (17) Aculeo. Tomado de González-Sponga, 2011.

Las características morfológicas más distintivas de la especie *T. discrepans*, objeto de estudio (**Figura 3**) son: longitud promedio de 7,1 cm. para los machos y 5,9 cm. para las hembras, cuerpo de color castaño rojizo con los segmentos caudales IV, V y telson de coloración negra (González-Sponga, 2011).

Distribución.

El género *Tityus* es exclusivamente Neotropical, distribuido desde Panamá hasta Argentina incluyendo algunas islas del Caribe. Habita en ambientes húmedos desde los 0 hasta los 2000 m.s.n.m, en zonas montañosas o pie de monte con ve-

getación húmeda. La toxicidad de su veneno sumado a la co-distribución con los humanos ha generado la mayoría de los casos graves y letales por emponzoñamiento en el país. La especie *T. discrepans* habita una diversidad de nichos: desde el Parque Nacional Henry Pittier (Edo. Aragua) hasta la población de Biron-go (Edo. Miranda), en los alrededores de Caracas, Altos Mirandinos, Parque Na-cional Guatopo al norte de Altagracia de Orituco, Edo. Guárico y Tiara, Dtto. Ricau-te (González-Sponga, 2011) (**Figura 4**).



Figura 3: *Tityus discrepans*. Tomado de González Esponga, 1996.

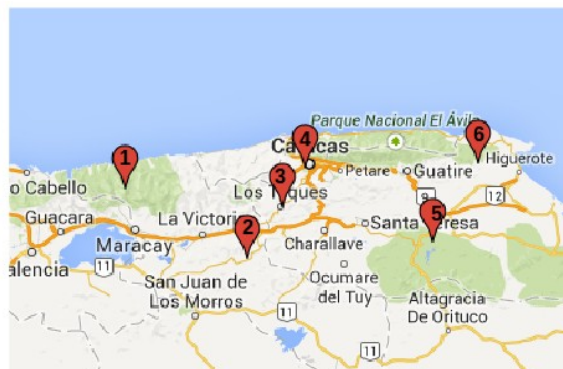


Figura 4: Distribución de *T. discrepans*. (1) Parque Nacional Henry Pittier; (2) Municipio Tiara; (3) Altos Mirandinos; (4) Caracas; (5) Parque Nacional Guatopo y (6) Población de Biron-go, Higuero-te.

Emponzoñamiento escorpiónico.

Se denomina escorpionismo al cuadro clínico característico producido por la inoculación de veneno de un escorpión al humano, que dependiendo de la especie, masa corporal del afectado y la cantidad de veneno inoculado, puede revestir características graves e incluso causar la muerte. El escorpionismo y sus consecuencias representan una importante causa de emergencia, en particular pediátrica, en muchos países (Chippaux y Goyffon, 2008). En Venezuela, el escorpionismo coincide con la estación de lluvia (mayo- julio y octubre- noviembre) y es más frecuente en cinco regiones macro-endémicas (**Figura 5**): (1) la región Centro-Norte (Dtto. Capital, Miranda, Aragua y Carabobo), (2) región Norte-Este (Monagas, Sucre y Anzoátegui), (3) región Centro-Oeste (Lara, Yaracuy y Falcón), (4) región de los Andes (Mérida, Táchira y Trujillo) y (5) región Sur (Bolívar, Amazonas y Delta Amacuro) (Mazzei de Dávila y col., 2011; D'Suze y col., 2015). Todas las especies de *Tityus* son potencialmente letales; sin embargo, son pocas las especies que han sido identificadas como involucradas en escorpionismos graves (**Figura 5**). El promedio anual de incidencia es de 40 emponzoñamientos escorpiónicos por cada 100000 habitantes y la mortalidad es de 0,04 por cada 10000 habitantes (Chippaux y Goyffon, 2008). En Venezuela los casos de escorpionismo están altamente sub-registrados. De acuerdo con las estadísticas del Hospital "Leopoldo Manrique Terrera" en Coche, 3409 casos fueron recibidos en este hospital entre 1990 y 1997 (Mazzei de Dávila y col., 2011).

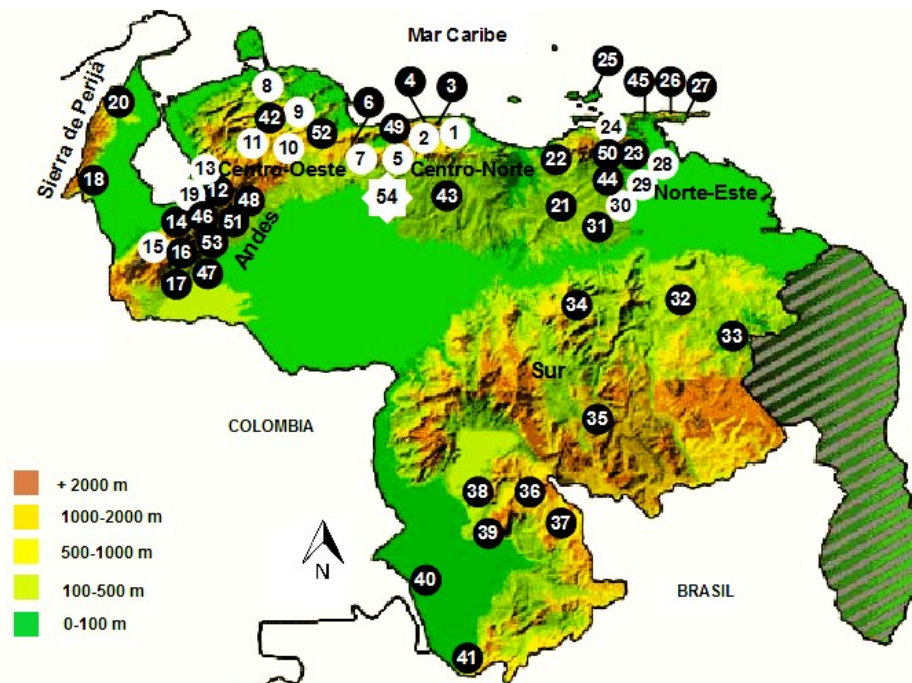


Figura 5: Distribución geográfica de las 54 especies del género *Tityus* descritas en Venezuela. Los círculos blancos corresponden a las especies involucradas en emponzoñamientos fatales o graves, los círculos negros a las especies venenosas aún no reportadas como involucradas en accidentes escorpiónicos. Solamente *T. clathratus* está representado con una estrella blanca dado a que su distribución es muy amplia. (1) *T. discrepans*, (2) *T. isabelceciliae*, (3) *T. lancinii*, (4) *T. osmanus*, (5) *T. pittieri*, (6) *T. Rojas*, (7) *T. carabobensis*, (8) *T. falconensis*, (9) *T. barquisimetanus*, (10) *T. sanarensis*, (11) *T. ivic-nancor*, (12) *T. boconoensis*, (13) *T. valerae*, (14) *T. rubosus*, (15) *T. funestus*, (16) *T. pococki*, (17) *T. surmeridensis*, (18) *T. meridanus*, (19) *T. zulianus*, (20) *T. perijanensis*, (21) *T. gonzalespongai*, (22) *T. tamayoi*, (23) *T. arellanoparrai*, (24) *T. nororientalis*, (25) *T. neoespartanus*, (26) *T. cachipalensis*, (27) *T. irapaensis*, (28) *T. monaguensis*, (29) *T. quirogae*, (30) *T. caripitensis*, (31) *T. surorientalis*, (32) *T. breweri*, (33) *T. venamensis*, (34) *T. riocaurensis*, (35) *T. sarisarinñamensis*, (36) *T. dupouyi*, (37) *T. anduzei*, (38) *T. culebrensis*, (39) *T. urbinai*, (40) *T. filodrendon*, (41) *T. siriana*, (42) *T. rusmelye*, (43) *T. guaricoensis*, (44) *T. walli*, (45) *T. uquirensis*, (46) *T. obispo*, (47) *T. nematochirus*, (48) *T. mucusunamensis*, (49) *T. melanostictus*, (50) *T. elizabethbravo*, (51) *T. dulceae*, (52) *T. dorae*, (53) *T. ahincoi*, (54) *T. clathratus*. Tomado de D'Suze y col., 2015.

El veneno produce una sintomatología compleja denominada “síndrome de emponzoñamiento escorpiónico” (D'Suze y col., 2011; 2015) que se caracteriza por palidez, taquicardia, taquipnea, piloerección, midriasis, hipertensión, priapismo, frialdad cutánea, micción espontánea, náuseas, vómitos, dolor abdominal, diarrea, sialorrea, bradicardia, sudoración profusa, hipotensión, broncoespasmos y miosis. La sintomatología por el emponzoñamiento de los escorpiones del género *Tityus* puede inducir trastornos neurológicos, pancreatitis aguda, manifestaciones cardiovasculares, edema agudo de pulmón, síndrome de dificultad respiratoria

por escorpionismo, trastornos de la coagulación y/o activación de los procesos inflamatorios (Mazzei de Dávila y col., 2011; D'Suze y col., 2011; 2015).

Características bioquímicas del veneno de *T. discrepans*.

El veneno de las especies del género *Tityus* es una mezcla compleja de sales, lípidos, aa, péptidos, mucopolisacáridos y proteínas de baja y alta M.M, algunas de ellas pertenecientes a la familia de las metalo-proteasas y serino-proteasas (Batista y col., 2006; Brazón y col., 2009; 2013). Entre la diversidad de escorpiones del género *Tityus*, la especie *T. discrepans* ha sido la más estudiada. En el veneno de *T. discrepans* utilizando MALDI-TOF y nano-ESI-ITMS se demostró la presencia de 205 componentes de M.M entre 272 y 57908 Da (Batista y col., 2006) con actividad sobre canales iónicos, curarizante, inflamatoria, antibacteriana, antimicótica, sobre el sistema hemostático y anti-neoplásica.

Este veneno contiene una alta proporción de péptidos de baja M.M (<5 kDa), donde la mayoría bloquean canales de K⁺ (2500- 4500 Da) y péptidos con M.M entre 5- 6 kDa son escasos en este veneno. Los péptidos que modifican los mecanismos de compuerta de los canales de Na⁺ tienen M.M de 6 a 8 kDa (Batista y col., 2006; Borges y col., 2006; Díaz y col., 2009; Diego-García y col., 2007; D'Suze y col., 1996; 1997; 1999; 2004a; 2004b; 2009; Peigneur y col., 2012). La mayoría de las toxinas aisladas modulan o bloquean canales iónicos. Independientemente del tamaño y la función poseen un patrón de plegamiento similar (**Figura 6**). La estructura 3D ha sido determinada por NMR sólo en una toxina, la discrepina (Prochnicka-Chalufour y col., 2006), mientras que otras toxinas han sido modeladas *in silico* (Díaz y col., 2009; D'Suze y col., 2009). Son proteínas globulares que adoptan un motivo α/β con una α -hélice y 2 ó 3 láminas β

paralelas o antiparalelas estabilizadas por 3 ó 4 puentes disulfuro. Muestran un alto porcentaje de aa cargados, distribuidos sobre la superficie de la proteína y su configuración espacial ha sido conservada a pesar de la diversidad de secuencias aminoacídicas. Las más estudiadas son las moduladoras de canales de compuerta de Na^+ (Na_v). Las toxinas activas en canales de K^+ inducen despolarización en la membrana celular por el bloqueo de estos. A pesar de que ambos tipos de toxinas tienen una estructura 3D similar, ellas difieren en la interacción superficial con los distintos canales (Rodríguez de la Vega y col., 2003).

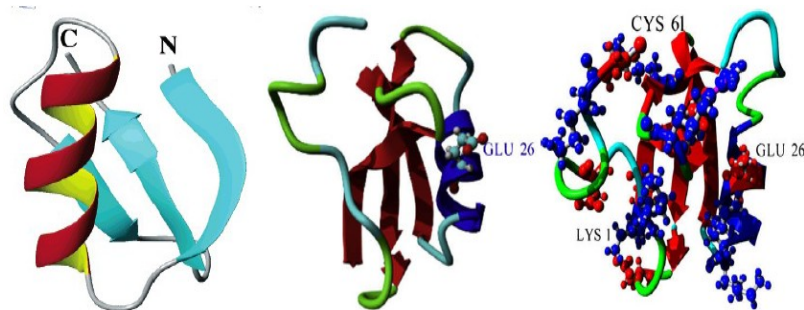


Figura 6: Holomogía de la estructura terciaria de distintas toxinas aisladas del veneno de *T. discrepans*. Izquierda: Discrepina (Prochnicka-Chalufour y col., 2006). Centro: TdNa3 (D'Suze y col., 2009). Derecha: Bactridina 1 (Díaz y col., 2009).

Actividad sobre canales Na^+ voltaje dependiente (Na_v^+): Uno de los principales blancos de las toxinas de escorpión son los canales Na_v^+ . Hasta la fecha se han caracterizado doce toxinas activas en canales Na_v^+ . En 1990 se determinó la composición aminoacídica de la TdVIII la cual contiene 55 aa y M.M de 6140 Da (Borges y col., 1990), pero fue en 1999 cuando se caracterizó su función sobre canales Na^+ 1.4 en ovocitos de *X. laevis* (Tsushima y col., 1999).

En 1996 se secuenciaron las regiones amino terminal y se caracterizó el efecto de cuatro toxinas llamadas TdII-1, -2, -3 y -4 sobre el potencial de membra-

na en reposo, las corrientes de Na^+ y los MEPP's en el músculo sartorio de *H. crepitans*. TdII-1 y -2 fueron específicamente tóxicas a crustáceos y mamíferos, TdII-3 y -4 sólo a mamíferos, TdII-1, -2 y -3 aumentaron los mini potenciales, mientras que todas reducían el potencial de reposo (D'Suze y col., 1996).

La ardiscretina compuesta por 61 aa y M.M de 7103,8 Da fue la primera toxina, con efectos sobre Na^+_v , contra insectos aislada del veneno de *T. discrepans*, esta fue completamente secuenciada, clonada y su actividad caracterizada biológicamente (D'Suze y col., 2004a).

Las Bacts, un grupo de seis toxinas fueron descritas inicialmente por su efecto antibacteriano (Díaz y col., 2009), posteriormente se caracterizó el efecto de algunas de ellas sobre isocanales de Na^+_v de mamíferos (Peigneur y col., 2012) y otras con actividad sobre neuronas DUM de grillo (Forsyth y col., 2012). La Bact-1 y -2 tienen 61 y 64 aa y M.M de 6916 y 7361 Da respectivamente. El resto de las Bacts (Bact-3, -4, -5 y -6) tienen M.M de 7226, 7011, 7101 y 7173 Da respectivamente (Díaz y col., 2009) y se ha identificado más del 70 % de su estructura primaria (Peigneur y col., 2012). Otras toxinas putativamente activas sobre canales de Na^+ han sido identificadas por genes que codifican a partir del ADNc (Diego-García y col., 2007; D'Suze y col., 2009).

Actividad sobre canales de K^+ : Estas toxinas están compuestas de 23 a 60 aa. Hasta ahora en el veneno de *T. discrepans* se han purificado y estudiado funcionalmente cuatro de ellas, descritas más adelante, otras toxinas de cadena larga putativamente activas sobre canales de K^+ han sido identificadas por genes que codifican a partir del ADNc (Diego-García y col., 2007; D'Suze y col., 2009).

La TdK1 con 37 aa y 3817 Da fue la primera toxina bloqueadora de canales de K⁺ aislada del veneno de *T. discrepans*. Esta bloquea reversiblemente los canales de K⁺ shaker-B expresados en células SF9 (D'Suze y col., 1999). La TdK2 y TdK3 con 34 y 36 aa y M.M de 3451 y 3832 Da respectivamente, actúan similar a la TdK1 en los canales de K⁺ shaker-B expresados en células SF9, aunque TdK3 tiene baja especificidad a ellos (Batista y col., 2006). La discrepana con 38 aa y M.M de 4177,7 Da plegada con tres puentes disulfuro, bloquea las corrientes tipo IA de canales de K⁺ voltaje dependiente de la células granulares del cerebelo de ratas (D'Suze y col., 2004b).

Actividad antibacteriana y antimicótica: Los escorpiones diariamente se exponen a infecciones microbianas y a fin de defenderse han desarrollado un mecanismo potente diferente al de su inmunidad innata. Algunos rocían su veneno sobre su cuerpo dejándolo secar, eliminando microorganismos del exoesqueleto y protegiéndolos contra infecciones bacterianas o fúngicas (D'Suze, y col., 2015). Entre estos componentes se destacan las Bact-1 y -2 con actividad contra bacterias Gram-positivas (*B. subtilis*, *M. luteus*, *E. faecalis*) y Gram-negativas (*P. aeruginosa*, *Y. enterocolitica*, *A. calcoaceticus*) que presentan la capacidad de modificar la permeabilidad al Na⁺ en *Y. enterocolitica* (Díaz y col., 2009). Además de las toxinas antibacterianas, en este veneno se han aislado y caracterizado siete toxinas que inhiben de forma dosis dependiente el crecimiento de *M. phaseolina*, un hongo patógeno de plantas comestibles. Estas toxinas denominadas fungitoxinas, F1 a F7, tienen M.M de 1060,1; 7328,9; 7288,3; 7268,5; 7104,6; 6924,6 y 6823,3 Da respectivamente. Las fungitoxinas F2, F3 y F5 disminuyen la actividad de la esterasa involucrada en la descomposición de tejido, importante para la

alimentación del hongo; las toxinas F3 a F6 alteran la permeabilidad de la membrana al Na⁺ y las F1, F5, F6 y F7 alteran la biosíntesis de esteroides de la pared celular inhibiendo la biosíntesis del ergosterol o bien produciendo análogos de este (Joya y col., 2011).

Actividad sobre el sistema hemostático: En el veneno de *T. discrepans* se han descrito componentes con actividad anticoagulante (como inhibidores del factor Xa) y pro-coagulantes (con actividad semejante al factor Xa o compuestos fibrinogénolíticos) que pueden alterar el tiempo de coagulación modificando los valores sanguíneos de TP y TPT (D'Suze y col., 2001; 2003; Brazón y col., 2008; 2013; 2014). También se han descrito proteínas con actividad antifibrinolítica (discreplasma) y semejante a t-PA (Brazón y col., 2009; 2014).

Actividad curarizante: Tdl-1 es una toxina de aproximadamente 48000 Da, única toxina de escorpión con actividad curarizante descrita hasta la fecha (D'Suze y col., 1997). Esta se estudió en preparaciones neuromusculares del músculo sartorio de la rana *H. crepitans*, donde bloquea MEPP's y reduce el EPP's por debajo del umbral de activación del potencial de acción, al igual que la D-tubocurarina cuando se enlaza al sitio de unión de la acetilcolina en el canal nicotínico con la consecuencia de mantener el potencial de membrana.

Actividad inflamatoria: Siete InfTx inducen cambios morfológicos y fisiológicos en macrófagos. La InfTx-2 y InfTx-5 activan la producción de ON y las InfTx -2, -6 y -7 aumentan la liberación de TNF- α mientras que las InfTx-4, -5, -6 y -7 incrementan la concentración intracelular de Ca²⁺ en macrófagos (Ramírez-Bello y col., 2014).

Actividad anti-neoplásica: Las neopladinas aisladas del veneno de *T. discrepans* fueron caracterizadas bioquímicamente. Las neopladinas 1 y 2 de 29918 y 30388 Da, inducen apoptosis por la sobre-expresión de Fas, FasL y Bcl-2 en la línea celular SKBR3 de cáncer mamario (D'Suze y col., 2010).

Muerte Celular.

Uno de los mecanismos de defensa más frecuentes de los organismos pluricelulares, es eliminar células infectadas que puedan interferir con la función normal de este. Esta es una variable importante en el desarrollo, prevención y terapia del cáncer (Zerban y col., 1994; Schulte-Hermann y col., 1997).

La terminología clásica “apoptosis y “necrosis” está basada en los cambios morfológicos de la muerte celular, en los últimos años dado el avance de la exploración bioquímica de las subrutinas de la muerte celular estos términos se han ampliado en trece terminologías que representan subrutinas diferentes agrupadas en: apoptosis extrínseca, apoptosis intrínseca caspasas dependiente o independiente, diversas necrosis reguladas, autofagia y catástrofes mitóticas (Galluzi y col., 2011). Sin embargo las modalidades de muerte celular más comunes son: la necrosis y la apoptosis.

La necrosis es morfológicamente definida por el aumento en el volumen celular (oncosis), inflamación de los organelos, ruptura de la membrana plasmática y la subsecuente pérdida del contenido intracelular (**Figura 7A**). Desde hace mucho tiempo, la necrosis ha sido considerada un tipo de muerte accidental e incontrolada, pero se ha acumulado evidencia de que la ejecución de la necrosis puede estar finamente regulada por vías de señalización y mecanismos catabólicos (Golstein y Kroemer, 2007; Festjens y col., 2006).

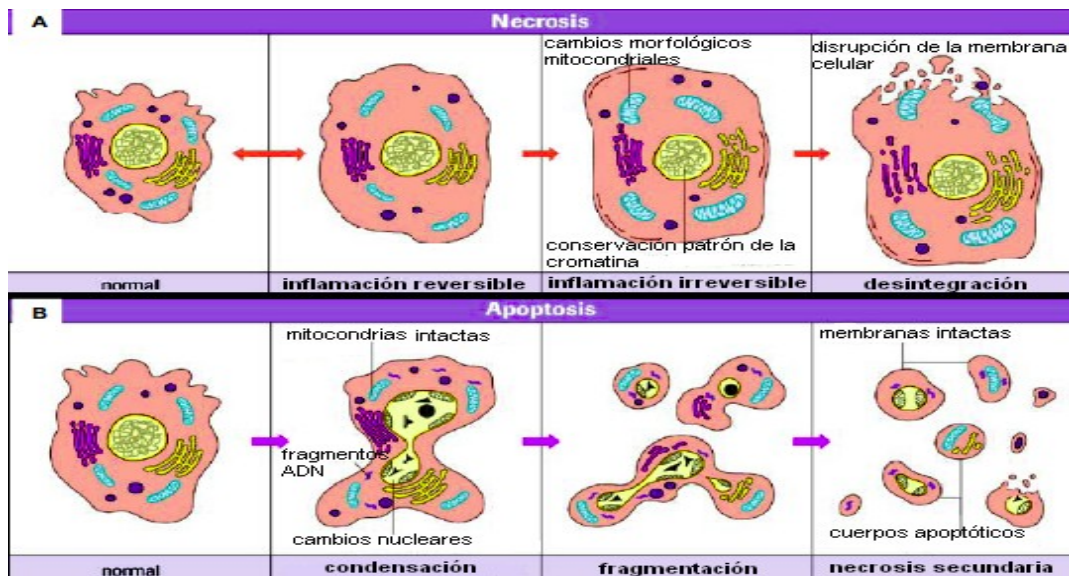


Figura 7: Apoptosis vs Necrosis: A) **Necrosis**: morfológicamente definida como inflamación citoplasmática, dilatación de los organelos que causa vacuolización celular y ruptura de la membrana plasmática, resultando en la liberación del contenido intracelular proinflamatorio. B) **Apoptosis**: las células revelan cambios en la morfología nuclear, incluyendo condensación y fragmentación de la cromatina, encogimiento de la célula, vesiculación y formación de cuerpos apoptóticos. Editado a partir de Hans-Jürgen Rode, 2008.

El término **apoptosis**, es definido como un tipo de muerte celular controlada que puede ser inducida por una variedad de agentes fisiológicos y farmacológicos, la cual fue inicialmente acuñada por Kerr y col. (1972), en función a un criterio morfológico: encogimiento celular, condensación y fragmentación de la cromatina, vacuolización y lisis celular (**Figura 7B**).

Existen dos vías principales de iniciación de apoptosis, la vía extrínseca mediada por un receptor de muerte y la vía intrínseca mediada por daño mitocondrial (**Figura 8**).

Vía extrínseca: Esta vía es mediada por un subgrupo de la súper-familia de TNFR que incluye: TNFR (p55 o CD120a), Fas (CD95/APO-1), DR3 (Apo3 o WSL1), DR4 (TRAIL-R1) y DR5 (TRAIL-R2). Los miembros de la familia de TNFR poseen un dominio extracelular rico en cisteína y un dominio citoplasmático de aproximadamente 80 aa llamado DD que tiene un rol crítico en la transmisión de la

señal de muerte desde la superficie celular a la cascada intracelular de señalización. La activación de los DD induce el reclutamiento y la activación de las caspasas iniciadoras (caspasas 8). Este proceso envuelve la formación y activación de DISC, compuesto de FADD y de caspasa 8. FADD está unido con el zimógeno de la caspasa 8 por medio de la interfase homofílica con sus DEDs. Con la formación de DISC, la caspasa 8 es activada, clivando directamente las caspasas efectoras (caspasa 3). La activación de la caspasa 3 es responsable del clivaje de sustratos de muerte que genera la fragmentación del ADN, la fragmentación nuclear, formación de prolongaciones citoplasmáticas y otros cambios morfológicos y bioquímicos (Elmore, S. 2007; Rastogi, R.P. y col., 2009; Portt, L. y col., 2011).

Vía Intrínseca: La caspasa 8 también puede activar indirectamente las caspasas a través del clivaje de Bid, involucrando la cascada intrínseca apoptótica. Esta vía envuelve estímulos que no se encuentran mediados por receptores, sino que inducen una señal intracelular actuando directamente en blancos dentro de la célula iniciando eventos mitocondriales. Esta señal puede involucrar hormonas, citoquinas y ausencia de factores de crecimiento. La vía intrínseca está mayormente centrada o regulada por la mitocondria y puede ser iniciada por el estrés mediado por la liberación de citocromo c de la mitocondria que resulta en la formación de un apoptosoma conformado por Apaf-1, caspasa 9 y citocromo c. El apoptosoma luego activa un iniciador de caspasa (caspasa 9), lo cual lleva a la activación de una caspasa ejecutora (caspasa 3) generando la misma respuesta apoptótica de la vía extrínseca (Elmore, S., 2007; Portt, L. y col., 2011).

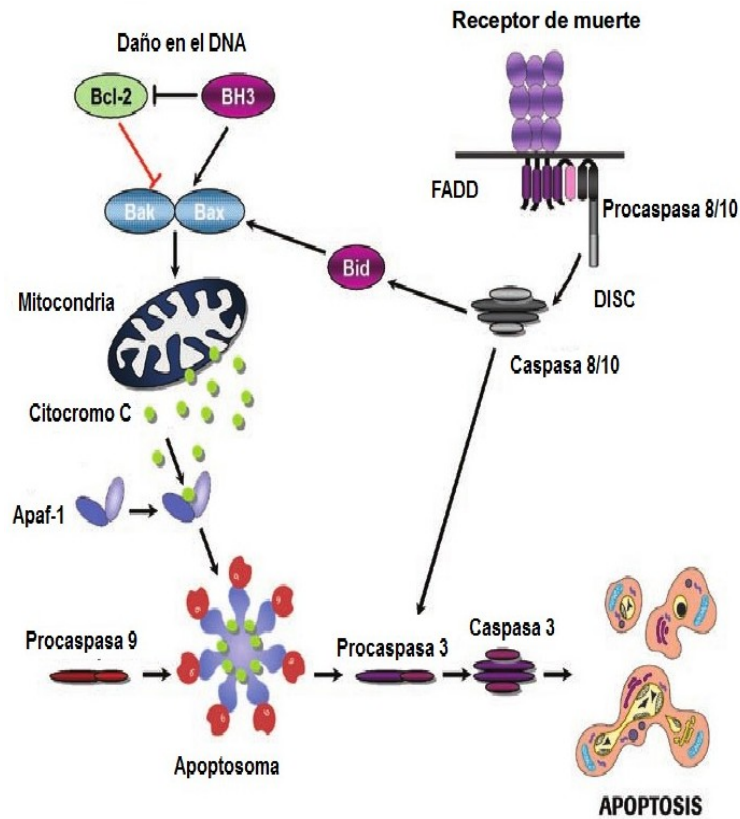


Figura 8: Principales vías apoptóticas. La **vía intrínseca** (izquierda): generada en respuesta a estrés, provoca la activación de proteínas pro-apoptóticas (BH3), la cual disminuye la acción de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2. La activación de proteínas BH3 resulta en la formación de poros en la membrana mitocondrial causando la liberación de citocromo c e induciendo apoptosis. La **vía extrínseca** (derecha) mediada por receptores de muerte, el secuestro posterior de FADD y la activación de caspasas 8 y 10 con la consecutiva inicialización de apoptosis. Tomado de Hans-Jürgen, R., 2008.

En respuesta a un estímulo apoptótico, miembros proapoptóticos se activan permitiendo la permeabilización de la mitocondria, perdiéndose el potencial transmembrana mitocondrial e induciendo la liberación de proteínas proapoptóticas del espacio intermembrana al citosol. La proteína proapoptótica BH3 actúa como sensor para diversos estímulos de muerte y disminuye la acción inhibitoria de proteínas anti-apoptóticas. La activación de BH3 resulta en la oligomerización de Bax y Bak las cuales forman poros en la membrana mitocondrial liberándose otras proteínas proapoptóticas. El primer grupo de proteínas proapoptóticas que activan

la cascada dependiente de caspasa son: citocromo C, Smac/DIABLO y la serinoproteasa HtrA2/Omi. El citocromo C se une y activa Apaf-1 iniciando la formación del apoptosoma mientras que la procaspasa 9 se activa a caspasa 9. Smac/DIABLO y HtrA2/Omi promueven la apoptosis por la inhibición de la actividad de IAP. El segundo grupo consiste en: AIF que se transloca al núcleo y causa la fragmentación del ADN; las Endo-G que también se translocan al núcleo donde cliva la cromatina produciendo fragmentos oligonucleosomales de ADN y por último CAD la cual es subsecuentemente liberada de la mitocondria y translocada al núcleo donde después del clivaje por la caspasa 3, genera la fragmentación oligonucleosomal del núcleo y a una condensación más pronunciada de la cromatina (Elmore, S., 2007; Portt, L. y col., 2011).

Por otro lado, la apoptosis puede ser mediada vía lisosomal (**Figura 9**). Los lisosomas juegan un papel fundamental en la degradación de macromoléculas endocitadas, regulación y/o reciclaje de proteínas. Además de estar involucrados en vías apoptóticas, también se ha descrito su rol en la necrosis y autofagia (Kurz y col., 2008; Kirkegaard y col., 2009; Česen y col., 2012). Fueron inicialmente descritos como “bolsas suicidas” por Christian de Duve pues la permeabilización parcial de la membrana induce apoptosis mientras que una permeabilización masiva induce necrosis (de Duve, 1959; Turk y Turk, 2009).

En el proceso apoptótico, el contenido enzimático de los lisosomas juega un papel crucial en la función degradativa (Repnik y col., 2012). El punto de activación de apoptosis por esta vía comienza por la PML liberándose proteasas como las catepsinas (principal proteína lisosomal) al citosol (Johansson y col., 2010; Rosenberg y col., 2002; Bivik y col., 2006; Schestkova y col., 2007). Dependiendo del

estímulo y el tipo celular, la PML puede ser: un evento iniciador de apoptosis desencadenando una señalización en cascada o puede ocurrir de forma tardía en el proceso apoptótico y por ende contribuir con la amplificación de la señal de muerte, pues las catepsinas tienen la habilidad de participar tanto en la fase de iniciación como en la ejecución de apoptosis (Repnik y Turk., 2010; Schrader y col., 2010).

La señalización después de la PML usualmente envuelve la activación de la cascada de caspasas vía intrínseca, sin embargo las catepsinas también puede mediar la muerte celular de manera independiente de caspasas (Broker y col., 2004). Principalmente la catepsina B induce cambios típicos asociados a apoptosis (Vancompernelle y col., 1998; Foghsgaard y col., 2001). Aunque muchos estudios muestran que dicha permeabilización viene mediada por compuestos que modifican directamente la integridad de la membrana lisosomal, la PML es un contribuidor activo en la señalización apoptótica que puede ser inducida por un estímulo clásico de apoptosis como: la unión del ligando a un receptor de muerte, activación de p53, radiación UV, disminución de factores de crecimiento y/o estrés oxidativo. (Roberg y Öllinger, 1998; Brunk y Svensson, 1999; Guicciardi y col., 2000; Yuan y col., 2002; Bivik y col., 2006).

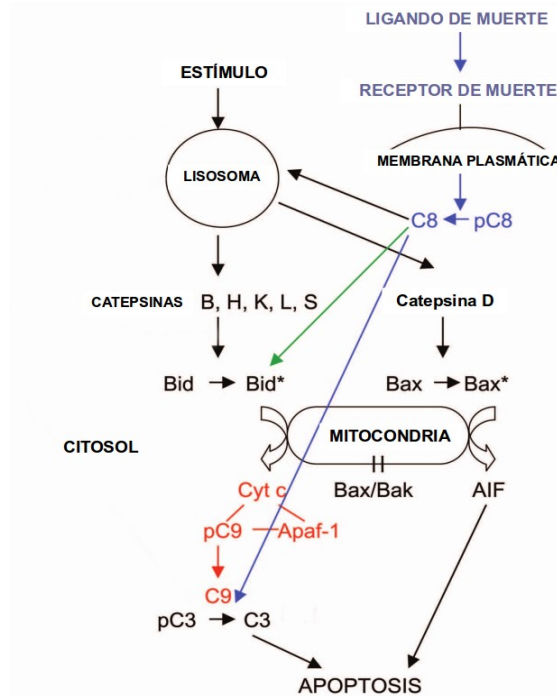


Figura 9: Apoptosis inducida por PML, vía caspasa dependiente y caspasa independiente. Tomado de Stoka y col., 2005.

Muchas drogas han sido utilizadas como inductoras de muerte celular. Específicamente la cafeína (Mi-Hyeon y col., 2002), melatonina (García-Santos y col., 2006), iberina (Jadhav y col., 2007), curcumina (Freudlsperger y col., 2008) entre otras, se han descrito como apoptogénicas en tumores malignos como neuroblastomas.

Neuroblastoma.

Los neuroblastomas son tumores sólidos que sólo ocurren en niños y representan del 8 al 10 % de los cánceres infantiles y el 15 % de las muertes relacionadas por cáncer (Barker y col., 2007). Esta neoplasia maligna se origina en los neuroblastos de la cresta neural y es por eso que tiene mayor propensión a metastizar hacia sitios distantes del cuerpo (Schwab y col., 2003; Grandinetti y col., 2006). Entre los síntomas más comunes se encuentra el dolor, fiebre y pérdida de peso,

sin embargo los síntomas dependen de la masa del tumor y la extensión de la metástasis (Schwab y col., 2003). La edad de diagnóstico en infantes se encuentra en los primeros 12 meses, teniendo generalmente una prognosis prometedora, aunque estén sufriendo de una enfermedad metastásica. Los diagnosticados después de un año tienen un pronóstico menos favorable y usualmente no responden a las combinaciones de terapias más agresivas (Barker y col., 2007). El tratamiento para pacientes con neuroblastoma severo es usualmente la quimioterapia, seguido de la resección quirúrgica o radioterapia (Barker y col., 2007). Los resultados a los distintos tratamientos pueden predecirse por varios factores genéticos bien establecidos, como el grado de diferenciación. Pacientes con tumores localizados en etapa 1 y 2, presentan células bien diferenciadas que son tratadas inicialmente con resección y tienen un rango de sobre-vivencia del 93 %, mientras que infantes con un tumor metastásico, muestran células pobremente diferenciadas (etapa 4), respondiendo a la terapia sólo entre 10 y el 30 % (Grandinetti y col., 2006).

ANTECEDENTES

Los escorpiones y sus venenos han sido utilizados en la medicina tradicional por cientos de años en China, India y África. Estos venenos además de poseer propiedades neurotóxicas también tienen propiedades antitumorales. Sin embargo, sólo pocas toxinas de veneno de escorpiones han sido identificadas como responsables de este efecto, que lo ejercen a través de: (1) el bloqueo de canales iónicos (Jäger y col., 2004), (2) la inhibición de la invasión y extravasación de las células cancerígenas (Deshane y col., 2003) o (3) la activación de las vías que inducen apoptosis (D'Suze y col 2010). Evidencia indica que las drogas antineoplásicas inducen una cadena de eventos donde las MAP quinasas, P38 (Park y col., 2010), metalo-proteinasas (Momeny y col., 2010), Bcl-2 (Sano y col., 2005) o FasL (Micheau y col., 1997) están involucradas en la muerte celular del tumor.

En 1987, Futong Zhang, demostró que el veneno completo del escorpión *B. martensii* induce una disminución en el contenido de ADN en cáncer de mama MA-737 (Zhang y col., 1987). A raíz de estos resultados comenzaron los estudios del potencial efecto anticancerígeno del veneno de escorpiones. Dieciocho años después, Wang y Ji observaron en estudios in vitro, que el veneno completo de *B. martensii* induce apoptosis de células malignas de gliomas U251- MG y que no era citotóxico en carcinoma hepatocelular BEL 7404, ni en células de ovario de hámster C400 (Wang y Ji, 2005). En el 2009 se demostró que el veneno de *B. martensii* también puede inhibir el crecimiento de células humanas Jurkat y células del linfoma Raji mediante la detención del ciclo celular e inducción de apoptosis (Gao y col., 2009). A partir de estas evidencias, se aisló el AGAP un péptido de 85 aa, el cual se clasificó como una toxina de canales de Na⁺_v (Liu y col 2003; Cui y col.,

2010) y el ANTP, con M.M de 6280 Da, (Liu y col., 2002) ambas toxinas ejercen efectos antitumorales en fibrosarcoma S-180 de ratón y en el carcinoma de Ehrlich.

En un grupo de péptidos extraídos del veneno de *B. martensii* constituidos por 50 a 60 aa, se demostró la inhibición del crecimiento e inducción de apoptosis en células de cáncer de próstata DU (Zhang y col., 2009). Posteriormente se describió un componente del veneno de *B. martensii*, parcialmente purificado SVCIII, de aproximadamente 75 kDa que inhibió la proliferación celular y detuvo el ciclo celular en la fase G1 en células de leucemia THP1 y Jurkat (Song y col., 2012).

Un nuevo y prometedor campo de la investigación del cáncer está apuntando a los canales de Na^+ , K^+ , Ca^{2+} y Cl^- , dado que la expresión y la actividad alterada de los canales se encuentra relacionada al cáncer y a su patología. Por otra parte, el bloqueo de la actividad del canal iónico puede afectar el crecimiento y la metástasis del cáncer (Arcangeli y col., 2010). Toxinas de escorpiones que afectan canales iónicos han sido purificadas y estudiadas, entre ellas la IbTX, una neurotoxina con 37 aa aislada del veneno de *M. tamulus*, que bloquea la conductancia de los canales de Ca^{2+} activados por K^+ (canales BK) e induce una ligera despolarización en MCF-7. Las células tratadas con IbTX se acumulan en la fase S del ciclo celular sin alterar la proporción de proliferación celular. Otro experimento con IbTX demostró el bloqueo de los canales BK por la inhibición de las corrientes de K^+ inhibiendo el crecimiento de las células PC-3 de cáncer de próstata (Bloch y col., 2007). La MgTX aislada del veneno de *C. margaritatus* comparte una secuencia homóloga con IbTX y presenta alta afinidad y especificidad por los canales Kv1.3 (Garcia-Calvo y col., 1993). Jang y col., encontraron que la MgTX

puede inhibir significativamente la proliferación de células de adenocarcinoma de pulmón A549 por la regulación de la fase G1/S del ciclo celular (Jang y col., 2011). De igual forma, la ChTX, un péptido aislado de *L. quinquestratus* similar a IbTX y MgTX, actúa como inhibidor de los canales de K⁺ activados por Ca²⁺. La ChTX además puede inhibir la migración de los fibroblastos NIH3T3 y de células de melanoma humano de manera dosis dependiente, despolarizando la célula y reduciendo la fuerza electroquímica de la entrada de Ca²⁺, importante en el proceso de migración celular (Schwab y col., 1999).

En 1991, la CITX, un pequeño péptido de 36 aa purificado del veneno de *L. quinquestratus*, fue descrito como un bloqueador de canales de Cl⁻ que actúa como agente paralítico para pequeños insectos y otros artrópodos (DeBin y Strichartz, 1991). Posteriormente en el estudio del bloqueo de canales de Cl⁻ voltaje dependiente como herramienta contra gliomas, se demostró la propiedad antitumoral de la CITX (Soroceanu y col., 1998; 1999). Inicialmente se pensó que el receptor en los tumores era un canal de Cl⁻, pero luego se demostró que el principal receptor es la MMP-2, que al unirse con la CITX inhibe la habilidad del glioma de invadir (Deshane y col., 2003). Esta MMP-2 se encuentra sobre-expresada en la superficie de los gliomas y otros cánceres relacionados, pero no en las células normales del cerebro.

En el 2007 se describió la actividad antiproliferativa y apoptogénica inducida por el veneno de *H. bengalensis* en células de leucemia U937 y K562, caracterizada por la detención del ciclo celular, la vesiculación de la membrana, condensación de la cromatina y la degradación del ADN, además de la habilidad de inducir autofagia en U937. La molécula de interés fue luego purificada y llamada Bengali-

na, una proteína de 72 kDa (Gupta y col., 2007; 2010). Otro estudio demostró que el veneno crudo de *O. doriae* inhibe el crecimiento celular e induce apoptosis en células humanas de neuroblastoma SH-SY5Y y en células MCF-7 (Zargan y col., 2011a; 2011b). Sobre estas líneas celulares el veneno de *A. crassicauda* causó supresión en el crecimiento celular por la detención de las células en fase S del ciclo celular e indujo apoptosis por el aumento de la producción de ON, activando la caspasa 3 y despolarizando la membrana mitocondrial (Zargan y col., 2011c).

Para el 2010, D'Suze y col., descubrieron dos péptidos aislados del veneno de *T. discrepans* inductores de apoptosis en células SKBR3 de cáncer de mama-rio, los cuales se denominaron neoplantina 1 y 2 de 29918 y 30388 Da respectivamente. Las neoplantinas a su vez no indujeron un efecto significativo en células no malignas de riñón de mono MA104, sugiriendo una actividad específica hacia SKBR3 (D'Suze y col. 2010). Las neoplantinas 1 y 2 inducen 6,3 y 4,1% de apoptosis respectivamente a las 5 h de exposición a las toxinas a través de su unión a la superficie celular de SKBR3 induciendo una sobre-expresión de Fas, FasL y Bcl-2; dicho efecto aumentó a medida que se aumentaba el tiempo de exposición. Estas proteínas inducen apoptosis en SKBR3 de manera similar a la inducida por vinblastina, cisplatino o paclitaxel, drogas utilizadas actualmente en quimioterapia. En el veneno de *T. discrepans* se continúa estudiando la actividad antitumoral de otros componentes sobre distintas líneas celulares cancerígenas.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Caracterizar la actividad anticancerígena en la línea celular de neuroblastoma Neuro-2a de una toxina aislada del veneno de *Tityus discrepans*.

Objetivos específicos:

- Aislar y purificar un fracción del veneno de *T. discrepans*.
- Mantener el cultivo de la línea celular de neuroblastoma Neuro-2a.
- Determinar la CI_{50} de la fracción con actividad anticancerígena sobre Neuro-2a.
- Estudiar el tipo de muerte celular (apoptosis o necrosis) inducida en Neuro-2a por la fracción activa.
- Estudiar el tipo de muerte celular (apoptosis o necrosis) inducida en neuronas de hipocampo por la fracción activa.
- Caracterizar el mecanismo de acción de la fracción sobre Neuro-2a.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colección del veneno de *T. discrepans*.

Escorpiones adultos *T. discrepans* fueron colectados en el área metropolitana de Caracas, Venezuela y guardados en cajas de plástico con agua y comida (medio de cultivo 199 (Sigma), *A. domesticus* y *T. molitor*) *ad libitum*. El veneno se obtuvo por estimulación eléctrica del telson de los escorpiones, los cuales previamente fueron sometidos unos minutos a 4° C para disminuir su actividad biológica. El veneno de varios escorpiones se recolectó en microtubos (Eppendorf^{MR}, Alemania) de 1,5 mL y se denominaron lotes. Se trabajó con lotes de ordeños de más de 100 individuos. Se disolvió en agua destilada y se centrifugó durante 30 minutos a 15000 g en una centrífuga refrigerada (Eppendorf^{MR} Microcentrifuge, 5417R; Alemania) a 4° C.

Determinación protéica.

El contenido protéico se estimó espectrofotométricamente (Eppendorf^{MR} BioPhotometer plus) empleando la ley de Lambert y Beer (Lambert, 1760), donde la concentración de la muestra es directamente proporcional a su absorbancia/cm de longitud de la trayectoria de luz a 280 nm. El sobrenadante se liofilizó utilizando una centrífuga al vacío (Refrigerated CentriVap Centrifugal Concentrator, LABCONCO, EE.UU) y se guardó a - 80° C (Revco Manufacturing Ltd, Suiza) hasta el momento de su uso.

Purificación de las fracciones y toxinas.

El liofilizado se resuspendió en agua bidestilada y se centrifugó durante 30 minutos a 15000 g a 4° C. Tres mg de veneno se separaron de acuerdo a su polaridad en un equipo de CLAR (Waters 1525, Binary HPLC pumps) a través de una columna de FR C18 analítica (250 x 10 mm, Vydac Hesperia, CA. EE.UU). Se utilizó

como fase móvil dos soluciones: solución A (agua con TFA al 0,12 %) y solución B (ACN con TFA al 0,10 %). La elución de los componentes del veneno se realizó bajo un gradiente lineal de 0 a 60 % de la solución B durante 60 minutos a un flujo de 1 mL/min y se detectó a una longitud de onda de 230 nm (D'Suze y col., 1999). Se colectaron manualmente las fracciones y posteriormente fueron liofilizadas. La fracción con actividad anticancerígena se recromatografió hasta su purificación, a través de la misma columna usando un gradiente lineal de 0 a 100 % de solución B durante 400 min. Las toxinas se recolectaron manualmente, liofilizaron y almacenaron a -80° C, hasta el momento de su uso.

Determinación de masas moleculares de la fracción activa y de sus componentes

La fracción activa y sus componentes purificados fueron analizados a través de una electroforesis en gel de poliacrilamida (15 %) en SDS y espectrometría de masas en el Laboratorio de Venómica y Proteómica Estructural del Instituto de Biomedicina de Valencia, C.S.I.C., España por el Dr. Juan Calvete. Para el análisis mediante electroforesis 10 µg de la fracción activa y sus componentes se disolvieron en 10 µL de agua estéril con 2 µL de buffer reductor constituido por 4 % SDS, 12 % glicerol 50 mM tris-base, 2 % mercaptoetanol y 0,01 % Serva Blue. Las muestras se agregaron en los distintos bolsillos y fueron sometidas a 70 voltios y posteriormente a 100 voltios hasta que las bandas se acercaron al borde inferior del gel. Se utilizó un marcador estándar Marck 12 de proteínas (200 – 2,5 kDa) de la casa comercial Novex™ (Life Technologies ®). El gel se lavó con agua destilada en agitación tres veces durante 10 min. Se tiñó con azul brillante de coomassie G-250 durante 1 h con agita-

ción. Se realizaron tres lavados con solución decolorante de ácido acético al 50 % y metanol al 10 % en agua con agitación durante 10 min hasta eliminar el exceso de la tinción y observar las bandas teñidas. Posteriormente la intensidad de luminiscencia de las bandas fueron cuantificadas mediante ImageJ-Gels.

Para la determinación de masas mediante espectrometría las muestras fueron disueltas en 25 μ L de 0,1 % de ácido fórmico y 50 % ACN en agua destilada y las M.M de los analitos determinadas en un espectrómetro QTRAP2000 (Applied Biosystems) (Hager, 2002) equipado con un nano-electronebulizador (Protana, Odense, Denmark), utilizando la opción EMC con barrido de 1000 amu/s en el rango de masa/carga (m/z) 350-1700. La desconvolución de los espectros de series de iones multicargados se realizó manualmente (Calvete, 2014; Marina y Calvete, 2014).

Cultivo de la línea celular Neuro-2a.

La línea celular Neuro-2a (ATTC CCL-131TM) fue donada por el Dr. Manuel Rieber del Centro de Microbiología del IVIC y mantenida en el servicio de Cultivo Celular del Centro de Biofísica y Bioquímica del IVIC. En todos los experimentos *in vitro* con cultivos celulares de Neuro-2a, se utilizó medio DMEM (Gibco®, Life Technologies Co., N.Y, USA) y se preparó siguiendo las instrucciones del fabricante. El medio fue suplementado con ampicilina 100 U/mL, estreptomicina 100 U/mL (A5955, Sigma Chemicals, St. Louis, USA) y 10 % SFB (F4135, Sigma Chemicals, St. Louis, USA) inactivado por calor. Las células fueron crecidas en frascos T-25 (Falcon®) en una incubadora (Napco 5200 Incubator) a 5 % de CO₂ a 37 °C hasta confluencia, cambiando a medio fresco cada 2 ó 3 días. Al momento de repicar las células, el medio fue retirado del frasco de cultivo y las células fueron despegadas agregando 1

mL de mezcla tripsina 0,25 % : EDTA 0,25% (1:1) durante 1 min. Se descartó la tripsina:EDTA y las células que permanecieron adheridas se disgregaron mecánicamente. Se agregó 2 mL de medio DMEM suplementado y posteriormente se trasvasó 1 mL a otro frasco de cultivo con un volumen final de 10 mL de medio DMEM suplementado. Cada frasco inicial se dividió en 2 frascos nuevos de cultivo T-25.

Ensayos de viabilidad celular.

Las células Neuro-2a fueron utilizadas para estudiar el efecto anticancerígeno de las fracciones aisladas por CLAR-FR a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y la fracción activa a distintas concentraciones (0,01; 0,1; 0,4; 0,8; 1,0 y 1,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). En placas (Nunc™, USA) de cultivo de 96 pozos, se sembró 2×10^4 células/pozo (Neuro-2a) en medio DMEM suplementado y se incubaron a 5 % CO_2 a 37° C hasta la formación de la monocapa. El medio de cultivo se cambió a DMEM libre de SFB antes de la exposición a 100 μL /pozo de la fracción en DMEM. Se incubó durante 24 h a 37° C y 5 % CO_2 . A cada pozo se le adicionó 25 μL de MTT (Sigma Chemicals, St. Louis, USA) en PBS a pH 7,4 a una concentración de 2,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y se incubó por 4 h (37° C a 5 % CO_2). Se adicionó solución solubilizante, constituida por formamida (Sigma Chemidals, St. Louis, U.S.A) diluida en agua destilada 1:2 a pH: 4,7 con ácido acético glacial al 80 % (EM Nesciencia, Neo Jersey, U.S.A) y SDS al 20% (Bio Dad, California, U.S.A), se dejó toda la noche en oscuridad a temperatura ambiente. Los cristales de formazán se disolvieron con la solución solubilizante y su absorbancia se determinó en un lector de ELISA (Multiscan modelo 352, Blastemas) a 570 nm.

Determinación de muerte celular por apoptosis o necrosis.

Las células Neuro-2a se cultivaron a 2×10^4 cel/mL sobre cubreobjetos, previamente tratados con polilisina al 0,1 %, mantenidos en medio DMEM suplementado hasta la formación de la monocapa. Las células se incubaron con la fracción activa y su componente mayoritario a distintas concentraciones (0 a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) en medio DMEM durante 5 ó 7 h y a una misma concentración (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) a distintos tiempos (5, 7, 9 y 24 h) en una cámara húmeda. El resto de los componentes de la fracción se estudiaron a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ durante 7 h de exposición a las células. El tipo de muerte celular inducida se determinó mediante epifluorescencia con tinción del ADN con naranja de acridina y bromuro de etidio (NA/BE) (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ / 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en PBS (McGahon y col., 1995; Jolly y col., 1997), determinando simultáneamente el porcentaje de muerte por necrosis por la coloración con el bromuro de etidio y por apoptosis por la coloración con el naranja de acridina. Para ello el número total de células, las células necrosadas y las apoptóticas se cuantificó en cada foto con el paquete Java de procesamiento de imágenes ImageJ (versión 1.48k) de dominio público (Instituto Nacional de Salud, Bethesda, MA, EE.UU.) con el plugins Cell Counter y los porcentajes de apoptosis y necrosis para cada campo, se calcularon a través de las siguientes fórmulas:

$$\% \text{ Apoptosis} = \frac{\text{n}^\circ \text{ cel apoptóticas} \times 100}{\text{n}^\circ \text{ total de cel}}$$
$$\% \text{ Necrosis} = \frac{\text{n}^\circ \text{ cel necrosadas} \times 100}{\text{n}^\circ \text{ total de cel}}$$

Determinación de la actividad lisosomal

La actividad lisosomal se evaluó en el ensayo con NA/BE a través de la intensificación del color rojo a un color rojo brillante en los lisosomas de las células Neuro-2a, producido por la incorporación del NA, con el programa Image J (versión 1.48k). Para esto se seleccionaron por separado tres regiones (que englobaba una célula) al azar de cada microfotografía tomada a las 5, 7, 9 y 24 h de exposición a la fracción activa y a su componente mayoritario a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Cada región seleccionada, se descompuso en sus tres colores (rojo, verde y azul). En el color rojo se cuantificó la DOI de cuatro secciones circulares (25 x 25 píxeles). Tres de las cuatro secciones pertenecían a la región donde se encontraban los lisosomas y la cuarta correspondía al fondo de la microfotografía (sin célula), cuyo resultado fue restado a las otras tres secciones. El procedimiento se repitió para nueve microfotografías en cada condición.

Cultivo primario de neuronas de hipocampo.

Los cultivos primarios de neuronas del hipocampo fueron donados por la Dra. Cecilia Castillo de la Unidad de Neurociencias del IDEA. El protocolo fue realizado por la Dra. Lisbeth García siguiendo los procedimientos de extracción y cultivo del trabajo de Longart y Correa (2004).

Extracción de hipocampos: La extracción de neuronas se realizó a partir de embriones de rata *S. dawley* de 19 días. Los embriones se obtuvieron por cesárea luego del sacrificio de la madre en cámara de CO₂. La extracción de los hipocampos se realizó en condiciones de esterilidad. El medio de disección, HBSS (Gibco 14185-052, 9,6 mM de N-2hidroxietilpiperazina-N'-ácido etanosulfónico [HEPES] pH 7,4, 1 % Pen-Strep), se colocó en cápsulas de Petri, las cuales se mantuvieron sobre hielo du-

rante todo el procedimiento. Inicialmente, se decapitaron los embriones y las cabezas se transfirieron a una de las placas de Petri con HBSS. Luego a las cabezas se les retiró la piel y la calota para exponer el cerebro, transfiriéndolo a una nueva placa. La disección de los hipocampos se realizó bajo la lupa. Los cerebros se transfirieron a una nueva placa y cuidadosamente se eliminaron las meninges. Luego, se separaron los dos hemisferios del cerebro y se cortó el cuerpo caloso para exponer los hipocampos. Cada hemisferio se transfirió a una nueva placa. Finalmente, en otra placa con HBSS se cortaron los hipocampos con una tijera y con la ayuda de una pinza curva fina, se transfirieron los hipocampos a un tubo cónico con 10 mL de HBSS.

Disociación y cultivo de las células del hipocampo: Los hipocampos se lavaron tres veces con HBSS. Luego, se agregaron 5 mL de HBSS-tripsina 1X (Gibco 15090-046) y se incubaron por 15 min a 37°C, agitando cada 5 min. Se realizaron tres lavados con HBSS. Al terminar el último lavado se eliminó por completo el HBSS y los hipocampos se disociaron en el medio NB (2 mM glutamina, 1 % Pen-Strep, 2 % B27, 12,5 mM Glutamato). Las neuronas destinadas a los ensayos con NA/BE se cultivaron en cubreobjetos colocados en placas de 24 pozos, previamente tratados e incubados toda la noche a temperatura ambiente con 37,5 µg/mL de poli-D-lisina (PDL; Sigma P-0899) y laminina 2,5 µg/mL (Invitrogen 23017-015). Las neuronas se cultivaron inicialmente en presencia de glutamato en medio NB y se realizaron cambios parciales del medio (250-300 µL) cada 3-4 días con medio NB sin glutamato.

A través del ensayo con NA/BE, explicado en la sección de determinación de muerte celular se cuantificó el porcentaje de apoptosis y necrosis inducido por la frac-

ción activa a 0,1; 0,5 y 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y su componente mayoritario a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ durante 5 h de exposición respectivamente.

La longitud de las neuritas se cuantificó mediante el plugin NeuronJ (©Erick Meijering) de ImageJ de las células expuestas durante 5 h a la fracción activa (0,1; 0,5 y 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) y su componente mayoritario (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Este permite trazar una línea que se moldea a la neurita seleccionada y medir su longitud.

Determinación del mecanismo de acción mediante Inmunocitoquímica.

Las células de Neuro-2a se sembraron en cubreobjetos tratados previamente con polilisina al 0,1 % y se incubaron en cámara húmeda a 37 °C y 5 % CO_2 con la fracción activa a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ durante 7 h. Los controles se expusieron al medio de cultivo. Las células fueron fijadas con acetona (Merck ®) al 70 % a 4 °C durante 15 minutos. Las células se incubaron en NH_3 (Merck ®) al 0,5 % v/v en etanol (70 %) durante 15 minutos, se lavaron en PBS y se expusieron durante 15 min en suero anti-escorpiónico comercial (anti-*T. discrepans*) (Unidad de Biotecnología, Facultad de Farmacia, UCV) (1/1000). Se lavaron en PBS y se incubaron en medio de bloqueo constituido por: SAB (Sigma A9647) al 25 % en PBS y al 0,1 % de Triton X 100 durante 45 min. Las muestras de los grupos experimentales y controles se incubaron durante 16 h a 4° C con dos juegos de anticuerpos primarios, mientras que a los controles negativos no se les colocó anticuerpo primario.

Juego 1: anti-citocromo c-oveja (1/500 en solución bloqueo) (Sigma C5723) + anti-caspasa 8-ratón (1/1000 en solución de bloqueo) (Santa Cruz SC-5263)

Juego 2: anti-Bcl-2-oveja (1/500 en solución de bloqueo) (Santa Cruz SC-7382) + anti-caspasa 3-ratón (1/1000 en solución de bloqueo) (Santa Cruz SC-136219)

Se lavaron en PBS y se incubaron durante 45 min a temperatura ambiente en oscuridad con los anticuerpos secundarios: anti- IgG de oveja conjugado con rodamina (SAB3700683, Sigma) y anti-IgG de ratón conjugado con FITC (F6257 Sigma). Se lavaron con PBS y los núcleos fueron teñidos con DAPI (1 mg/mL) durante 5 min. Finalmente las muestras fueron montadas con Inmunomount (Sigma), se observaron utilizando microscopía de epifluorescencia (Nikon Eclipse E600) y luego fotografiadas digitalmente con una cámara digital Spot Flex. Las imágenes se guardaron como archivos TIFF de color y se utilizó el paquete Java de procesamiento de imágenes ImageJ (versión 1.48k) para analizar los cambios de intensidad de fluorescencia de las imágenes.

Las microfotografías se tomaron en colores separados (rojo, verde y azul) y se yuxtapusieron para obtener una imagen RGB en los tres colores. Para cuantificar los resultados, se seleccionaron veinte células al azar por condición y se cuantificó la intensidad de fluorescencia de cada color a través del plugins RGB-measure de ImageJ. La intensidad de fluorescencia de los controles negativos para las células expuestas al medio con y sin toxina se restaron a los resultados respectivos.

Estadística.

Todos los resultados fueron sometidos a un estudio de normalidad con Shapiro-Wilk y Jarque-Bera. Si la población presentó una distribución normal se evaluó con estadística paramétrica, en caso contrario se analizó con estadística no paramétrica.

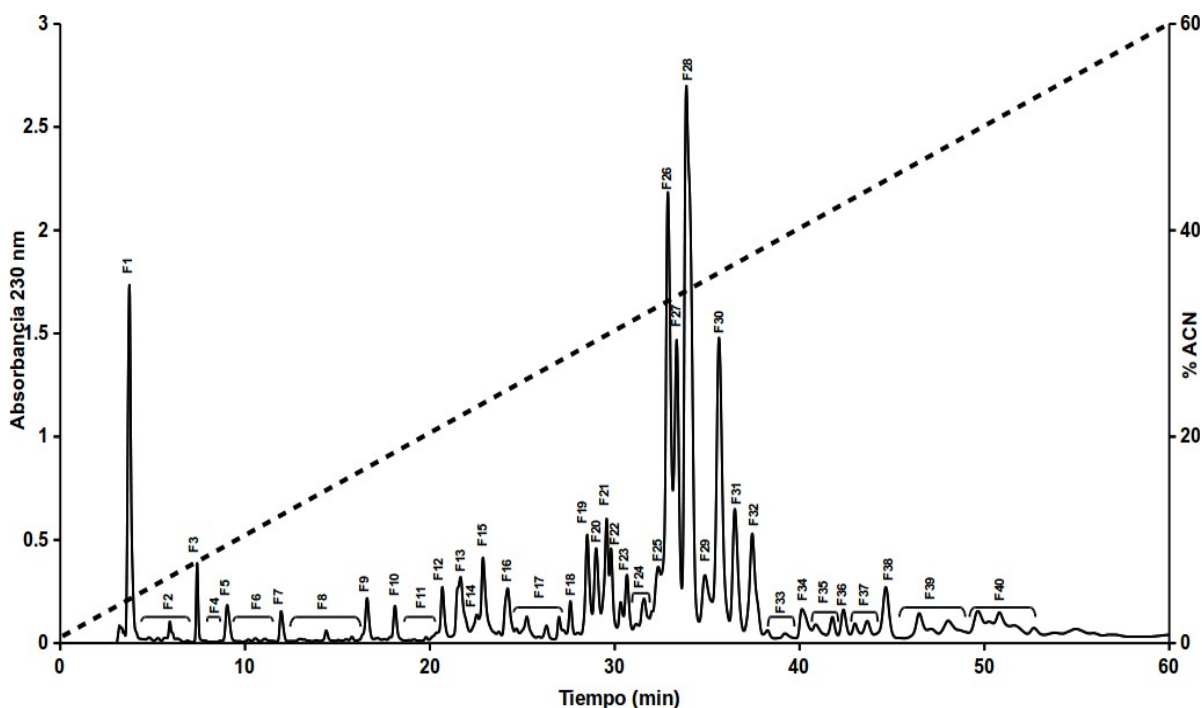
Los resultados del ensayo con MTT se analizaron con estadística paramétrica (regresión lineal polinómica), el resto de los resultados se analizaron con estadística no paramétrica. Los resultados del porcentaje de apoptosis y necrosis fueron presen-

tados como la mediana y sus intervalos de confianza calculados por el método Moses, la DOI y la longitud de neuritas fueron presentadas como la mediana y sus intervalos de confianza calculados por el método de Hodges y Lehmann y la significación estadística de los resultados se evaluó con el método de Kruskal y Wallis (Hollander y Wolfe, 1973).

RESULTADOS

Separación de los componentes del veneno.

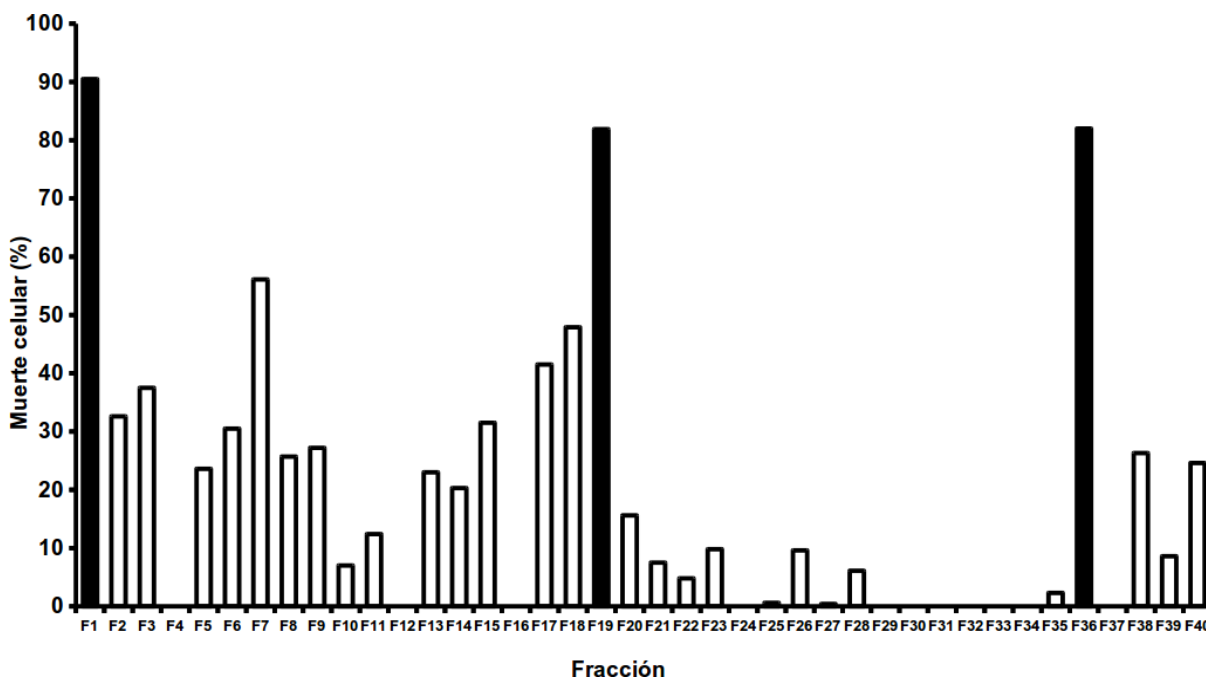
El veneno de *T. discrepans* se disolvió en agua bidestilada y se centrifugó para separar los componentes polares de los no polares. La **Gráfica 1** muestra el perfil cromatográfico característico de los componentes polares del veneno de *T. discrepans* medido a 230 nm. Se obtuvieron 40 fracciones las cuales eluyeron entre 3,8 y 52 min y se denominaron con la letra F que indica fracción, con números árabes crecientes dependiendo del tiempo de elución. Los perfiles cromatográficos obtenidos de más de 100 corridas realizadas no mostraron diferencias cualitativas entre ellos (**Resultados no mostrados**).



Gráfica 1: Perfil cromatográfico del veneno de *T. discrepans* separado por CLAR-FR. La elución de las fracciones se realizó a 1 mL/min durante 60 min en un gradiente lineal del solvente A ($H_2O + 0,12\%$ TFA) a 60 % del solvente B ($ACN + 0,1\%$ TFA). La ordenada representa la absorbancia medida a los 230 nm y la abscisa el tiempo de elución. Las fracciones fueron recolectadas manualmente de F1 a F40.

Efecto citotóxico de las fracciones del veneno.

Al estudiar la citotoxicidad de las 40 fracciones (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) sobre la línea celular Neuro-2a a través de un ensayo colorimétrico con MTT se evidenció que sólo F1, F19 y F36 indujeron más del 60 % de muerte celular (**Gráfica 2**). Solamente se caracterizó el efecto de F19 que eluye a los 28,07 min y representa el 1,59 % del veneno completo. La F4, F5, F8 a F16, F20 a F35 y F37 a F40 indujeron un porcentaje de muerte celular menor al 30 % mientras que F2, F3, F6, F7, F15, F17 y F18 indujeron un porcentaje de muerte celular entre 30 y 60 %.

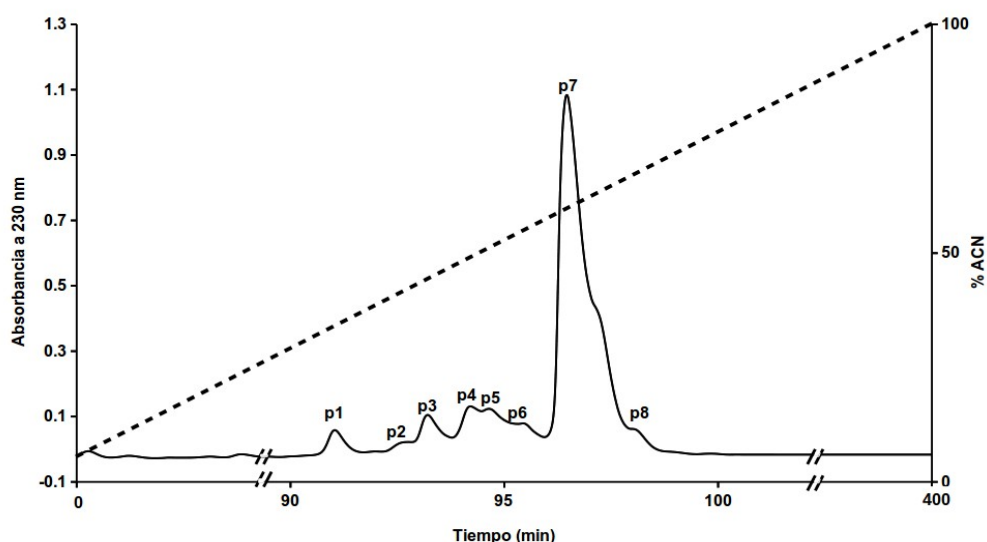


Gráfica 2: Porcentaje de muerte celular en Neuro-2a inducido por las fracciones del veneno separadas por CLAR-FR en un ensayo con MTT. La fracciones 1, 19 y 36 (barras negras) indujeron una muerte mayor al 60 %.

Repurificación de la fracción activa.

Al repurificar F19 utilizando con una variación del gradiente utilizado para separar el veneno, se observó que F19 está constituida por ocho componentes. La **Gráfica 3** muestra el perfil cromatográfico característico de la repurificación de F19 medi-

do a 230 nm, cuyos componentes fueron denominados con la letra p que indica pico desde p1 hasta p8, con tiempos de elución de 85,27; 88,78; 91,04; 93,17; 94,15; 95,30; 96,41 y 97,99 min respectivamente. El p1, p2, p3, p4, p5, p6, p7 y p8 representaron el 0,72; 0,23; 3,0; 5,28; 6,92; 3,33; 76,52 y 4,0 % de F19 respectivamente. El componente mayoritario de F19 es p7 el cual representa el 76,52%.



Gráfica 3: Perfil cromatográfico de la repurificación de F19 del veneno de *T. discrepans* separado por CLAR-FR. La elución de las fracciones se realizó a 1 mL/min durante 400 min en un gradiente lineal del solvente A ($H_2O + 0,12\%$ TFA) a 100 % del solvente B (ACN + 0,1 % TFA). La ordenada representa la absorbancia medida a los 230 nm y la abscisa el tiempo de elución. Los picos fueron recolectados manualmente. El p7 representa el componente mayoritario objeto de estudio.

Estudio de los componentes de la fracción activa (electroforesis y espectrometría de masa).

La **Figura 10** muestra el gel de electroforesis en condiciones reductoras de F19 y sus componentes aislados mediante CLAR-FR. Se observó que F19 está conformada por proteínas con M.M entre 14,4 y 3,5 kDa aproximadamente. Los picos más puros son p1 y p2, los cuales están compuestos por una única proteína de aproximadamente 3,5 kDa. Los demás picos presentaron entre dos o tres bandas con

M.M de 3,5; 6 y 14 kDa aproximadamente. El componente mayoritario de p3, p4, p6, p7 y p8 es una proteína con una M.M de 6 kDa aproximadamente, a diferencia del componente más abundante de p5 cuya M.M es de 3,5 kDa aproximadamente. Estos resultados fueron corroborados a través de la cuantificación de la intensidad de luminiscencia de las bandas de los distintos carriles, lo cual se resume en la **Tabla 1**.

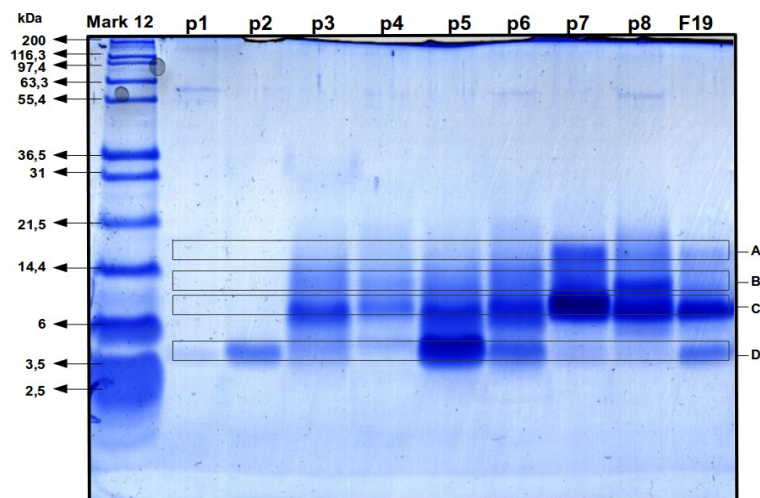
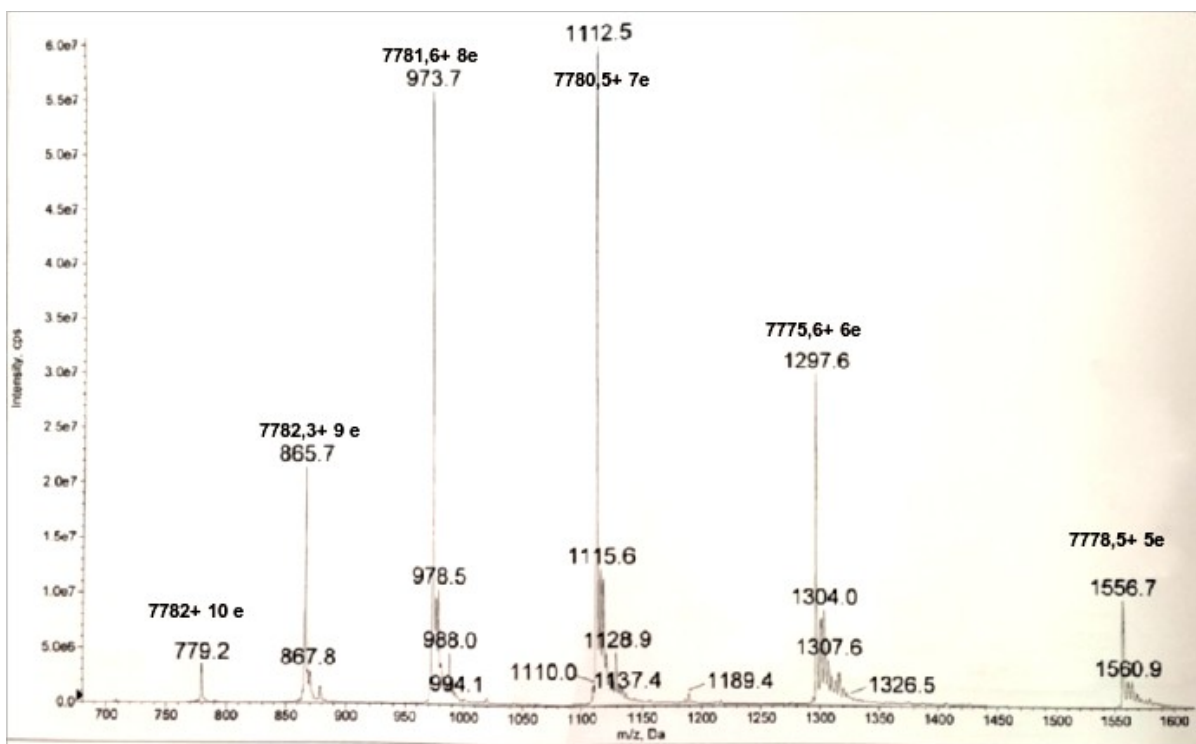


Figura 10: Gel de electroforesis de poliacrilamida al 15 % en condiciones reductoras un gel , teñido con azul de coomassie G-250. El primer carril se cargó con el marcador estándar Marck 12 de proteínas, los otros carriles se cargaron con 10 µg de p1, p2, p3, p4, p5, p6, p7, p8 y F19 respectivamente. Los recuadros A, B, C y D indican el lugar donde se cuantificó la intensidad de luminiscencia mostrados en la Tabla1.

Tabla 1: Intensidad de luminiscencia de las bandas A, B, C y D correspondiente de los p1, p2, p3, p4, p5, p6, p7, p8 y F19 sometidos a una corrida electroforética en condiciones reductoras que se muestra en la Figura 10.

	A	B	C	D
p1	1058	962	1053	1650
p2	1318	1111	1204	10541
p3	9230	16597	20718	10558
p4	8852	13081	13810	4829
p5	10717	19470	24546	33442
p6	14244	21230	24681	17340
p7	28908	29080	32263	6211
p8	21518	28849	28707	7034
F19	11494	14366	23333	11085

La **Gráfica 4** muestra el espectro de masa de p7, componente mayoritario de F19, sometido a Qtrap. Se observó la frecuencia relativa de los componentes de cada pico en función a la relación de su m/z donde p7 presentó una proteína mayoritaria de 7780,8 Da. El resto de los picos fueron sometidos a la misma metodología (**Resultados no mostrados**). Las M.M de todos los picos (p1-p8) determinadas mediante QTrap se resumen en la **Tabla 2**. Las M.M de p1, p2, p4 y p7 son 3845,6; 3973,9; 6042 y 7780,8 Da respectivamente. En el p3 se cuantificaron dos componentes con M.M de 3905,1 y 6042,3 Da respectivamente. En el p5 se determinaron tres proteínas de M.M correspondientes a 3958,2; 6058,6 y 6556,6 Da mientras que en el p6 se determinaron dos componentes de M.M de 6058,4 y 6096,5 Da. Por último en el p8 se determinó una proteína de 7780,8 Da y otra de 8157,7 Da.



Gráfica 4: Espectroscopía mediante Qtrap de p7. Los picos hacen referencia a la intensidad relativa de los compuestos de p7 en función de su masa/carga (m/z).

Tabla 2: Masas moleculares de los picos que componen a F19. Las M.M fueron determinadas mediante Q-Trap siguiendo los protocolos sugeridos por el fabricante. Para la calibración de los equipos se empleó una mezcla de proteínas pequeñas y se operaron en modo lineal para determinar el promedio de la relación masa/carga (m/z)

Picos de F19	MM (Da)			
	p1	3845,6	-	-
p2	3973,9	-	-	-
p3	3905,1	6042,3	-	-
p4	-	6042,5	-	-
p5	3958,2	6058,6	-	-
		6556,6		
p6	-	6058,4	-	-
		6096,5		
p7	-	-	7780,8	-
p8	-	-	7780,8	8157,7

Cultivo de la línea celular Neuro-2a

En la **Figura 11** se muestra la morfología de las Neuro-2a a distintos porcentajes de concurrencia. Estas células tienen una morfología típica neuronal, son planas con citoplasma extenso y cromatina relajada. Al ser cultivadas, se adhieren con facilidad y extienden sus neuritas al área circundante (**Figura 11A**). Las células en división pueden formar aglomerados celulares o domos. A alta concurrencia > 80 % (**Figura 11B**) se muestran con una morfología redondeada y con una exigua extensión de sus neuritas. Al tomar una muestra de las células con morfología redondeada y recultivarlas al 40 % de concurrencia (**Figura 11C**), se observó nuevamente una morfología típica neuronal.

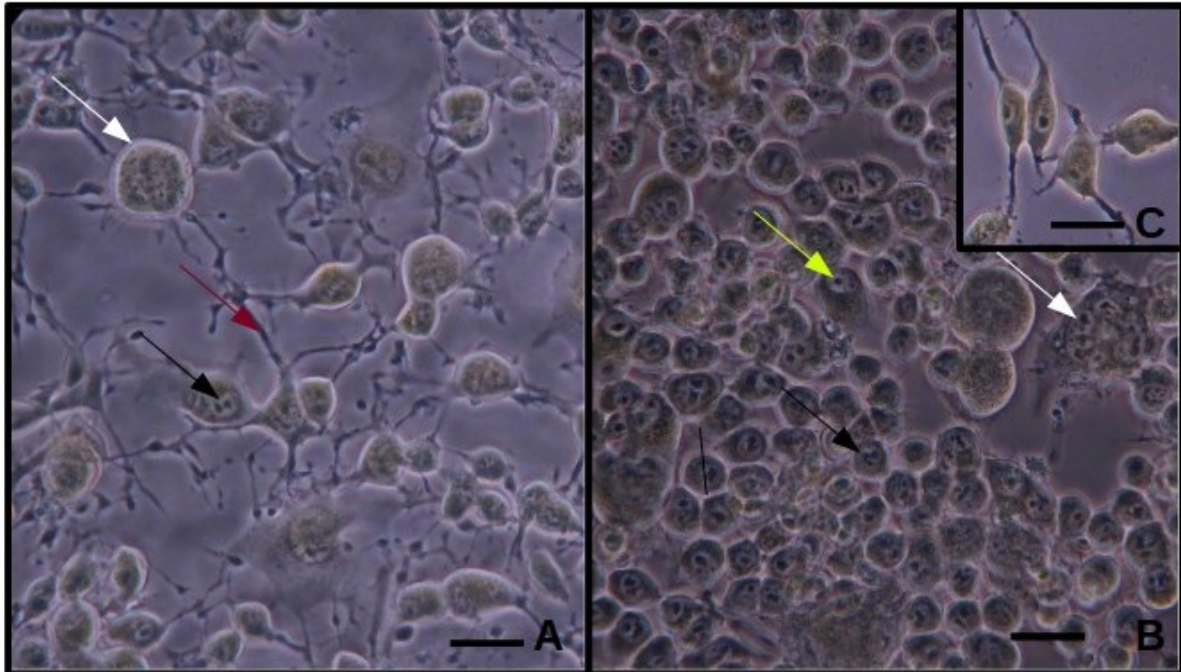
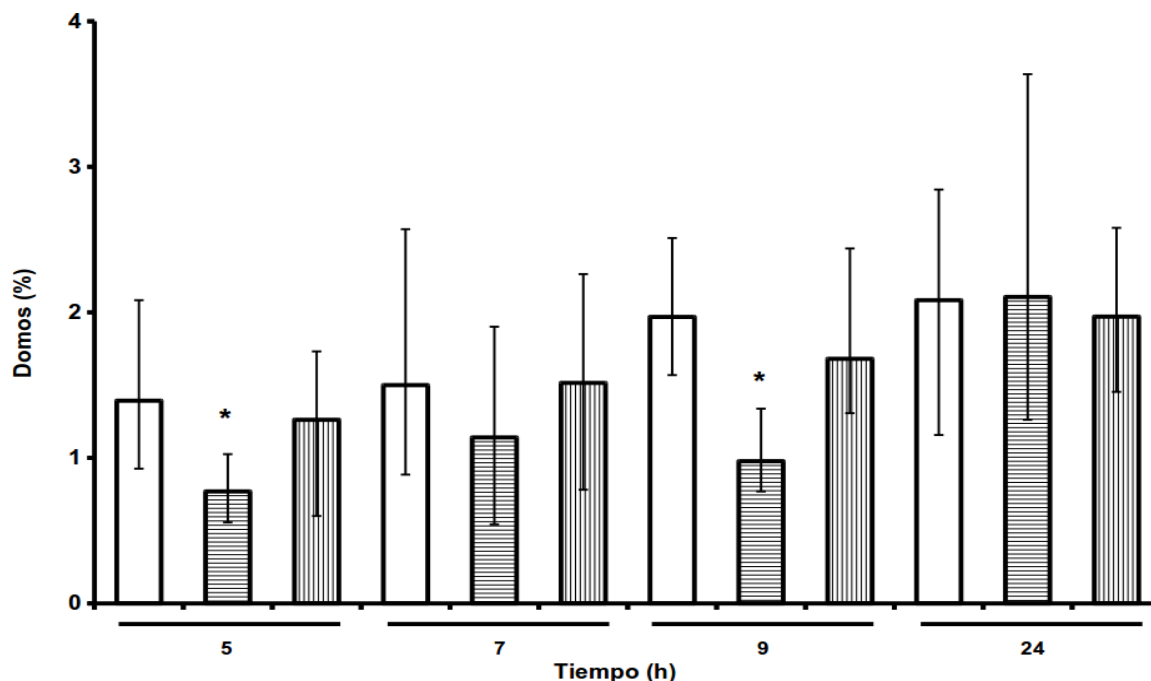


Figura 11: Microfotografías de la línea celular Neuro-2a cultivadas en medio DMEM suplementado. A: células al 40 % de concurrencia. B: células al 80 % de concurrencia. C: células de B re-cultivadas hasta 40 % de concurrencia. Flecha amarilla: nucleolos; flecha blanca: domos; flecha negra: núcleo y flecha roja: neuritas. Escala de 50 μm

Formación de domos en Neuro-2a.

Se estudió el efecto de F19 y p7 (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) sobre la formación de domos al exponer las Neuro-2a durante 5, 7, 9 y 24 h (**Gráfica 5**). La incubación de las células con F19 durante 5, 7 ó 9 h indujo una disminución del porcentaje de domos. Los porcentajes a las 5, 7 y 9 h de exposición fueron: 0,8 (0,6 , 1); 1,1 (0,5 , 1,9); 1 (0,8 , 1,3) % respectivamente en comparación a los controles cuyos porcentajes de domos fueron 1,4 (0,9 , 2,1); 1,5 (0,9 , 2,6); 2 (1,6 , 2,5) % respectivamente. Sólo a las 5 y 9 h hubo una disminución estadísticamente significativa ($P < 0,05$). A las 24 h de exposición F19 no indujo cambios significativos ($P > 0,05$) en el porcentaje de domos cuyos valores son 2,1 (1,2 , 2,8) %. Así, p7 no induce cambios significativos ($P > 0,05$) en el porcentaje de domos a ninguno de los tiempos estudiados, los porcentajes observados a

las 5, 7, 9 y 24 h de exposición fueron: 1,3 (0,6 , 1,7); 1,5 (0,8 , 2,3); 1,7 (1,3 , 2,4) y 2 (1,5 , 2,6) % respectivamente. Los resultados se muestran como las medianas con sus intervalos de confianza al 95 %.



Gráfica 5: Efecto de F19 y p7 sobre el porcentaje de domos. Se incubaron las células Neuro 2a con F19 (líneas horizontales) y p7 (líneas verticales) a 1 µg/µL durante 5, 7, 9 y 24 h. Los resultados representan las medianas de al menos 100 células contadas por campo con sus intervalos de confianza al 95 %. Los (*) indican las diferencias significativas (P< 0,05) en comparación a los controles (barras blancas).

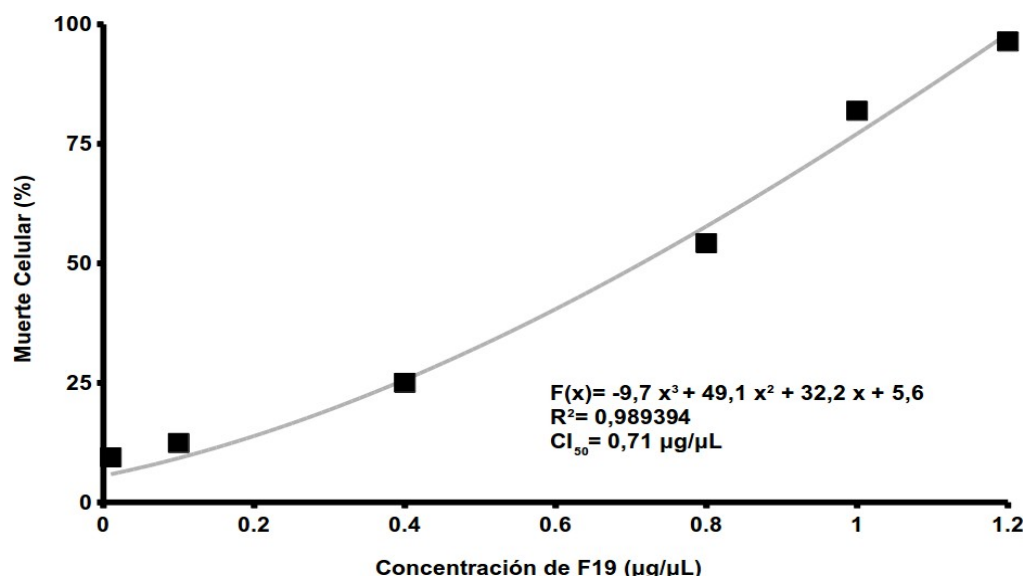
Ensayos de viabilidad celular de la fracción activa.

En el estudio del efecto citotóxico de F19 sobre Neuro-2a a través del ensayo colorimétrico con MTT (**Tabla 3**) se determinó que las células expuestas a F19 durante 24 h, a concentraciones crecientes de 0,01; 0,1; 0,4; 0,8; 1,0 y 1,2 µg/µL presentaron 9,4; 12,4; 25; 54,2; 81,9 y 96,4 % de muerte celular respectivamente. La **Gráfica 6** muestra una curva dosis-respuesta del porcentaje de muerte celular en función de las concentraciones de F19. A medida que aumentó la concentración de F19 se incrementó el porcentaje de muerte celular, con un coeficiente de determinación de

0,99. Concentraciones $\geq 0,8 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ indujeron una muerte celular mayor al 50 % mientras que concentraciones $\leq 0,4 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ indujeron una muerte celular menor al 25 %. La CI_{50} obtenida a través de la regresión lineal polinómica fue $0,71 \mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Tabla 3: Efecto citotóxico de F19 sobre Neuro-2a. El efecto citotóxico se midió mediante el ensayo colorimétrico con MTT. Se determinó el porcentaje de células vivas y muertas. La absorbancia (ABS_1 y ABS_2) fue determinada a 570 nm. BCO= blanco; CEL: células y CI_{50} : concentración inhibitoria media.

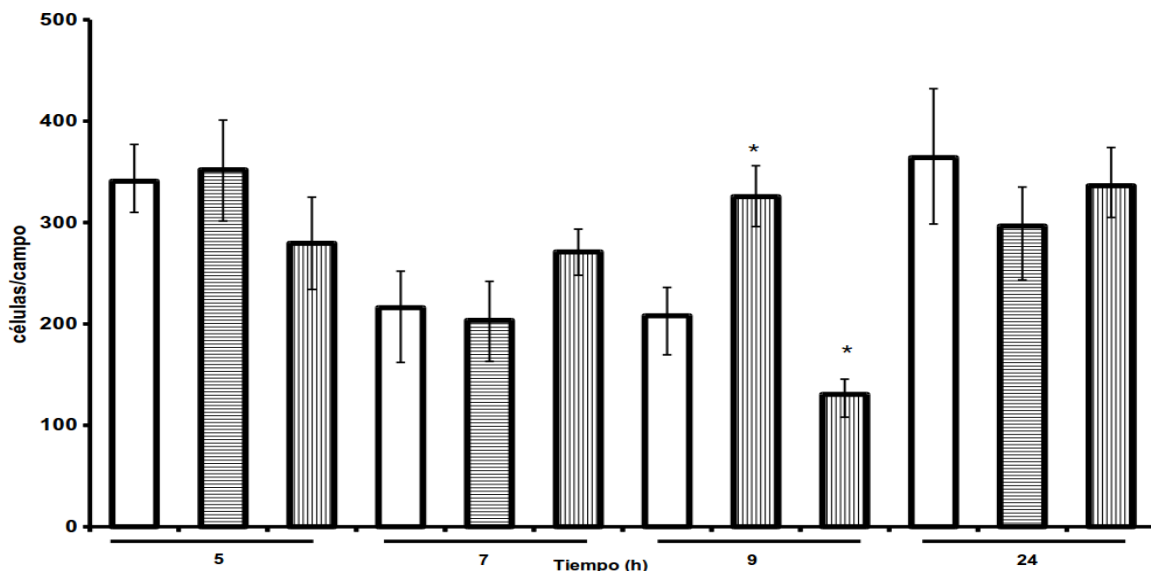
CONCENTRACIÓN F19 ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	ABS_1	ABS_2	PROMEDIO ABS	PROMEDIO-BCO	% CEL VIVAS	% CEL MUERTAS
BLANCO	0,209	0,134	0,1715	0	-	-
0	1,937	1,886	1,9115	1,74	100	0
0,01	1,801	1,696	1,7485	1,577	90,6	9,4
0,1	1,691	1,7	1,6955	1,524	87,6	12,4
0,4	1,589	1,364	1,4765	1,305	75	25
0,8	1,181	0,755	0,968	0,7965	45,8	54,2
1	0,478	0,494	0,486	0,3145	18,1	81,9
1,2	0,334	0,136	0,235	0,0635	3,6	96,4



Gráfica 6: Efecto de la concentración de F19 en la viabilidad celular de Neuro-2a. Las células fueron incubadas con 0,01; 0,1; 0,4; 0,8; 1 y $1,2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ de F19 durante 24 h. Los datos son presentados como el porcentaje de muerte celular inducida a estas concentraciones y representan el promedio de al menos dos réplicas. La ecuación superior representa la regresión lineal polinómica con un coeficiente de correlación de 0,99 y un CI_{50} de $0,71 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ de F19.

Número de células totales por campo.

Los neuroblastomas se expusieron a F19 y p7 (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) durante 5, 7, 9 y 24 h y se cuantificó el número total de células por campo (**Gráfica 7**). Sólo se observó una disminución significativa ($P < 0,05$) en las células expuestas a p7 durante 9 horas en comparación al control. No se observó una tendencia o patrón constante en el número de células por campo en las distintas condiciones ensayadas. El número de células totales por campo de las Neuro-2a controles, las expuestas a F19 y a p7 durante 5 h fue de: 341 (310 , 377), 352 (302 , 401) y 280 (234 , 325) células/campo respectivamente; a las 7 h fue de: 216 (162 , 252), 204 (163 , 242) y 271 (248 , 294) células/campo respectivamente; a las 9 h es: 208 (170 , 236), 326 (296 , 356) y 131 (108 , 146) células/campo respectivamente y a las 24 h fue de: 364 (299 , 432), 297 (243 , 432) y 336 (305 , 374) células/campo respectivamente.



Gráfica 7: Efecto de F19 y p7 sobre el número de células totales por campo en función del tiempo de exposición. Las Neuro-2a se incubaron durante 5, 7, 9 y 24 h con F19 (líneas horizontales) y p7 (líneas verticales) a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Los datos son presentados como medianas de al menos 100 células contadas por campo y sus intervalos de confianza al 95 %. Los (*) indican las diferencias significativas en comparación a los controles (barras blancas).

Determinación de muerte por apoptosis o necrosis.

- Efecto de la concentración de la fracción activa y su componente mayoritario sobre Neuro-2a.

Se estudió el efecto de concentraciones crecientes de F19 y p7 sobre las Neuro-2a durante 5 y 7 h de exposición. La **Figura 12** muestra las microfotografías de Neuro-2a tomadas en campos al azar a concentraciones crecientes de p7 y F19 durante 5 h. Se observaron células vivas de color verde en todas las condiciones.

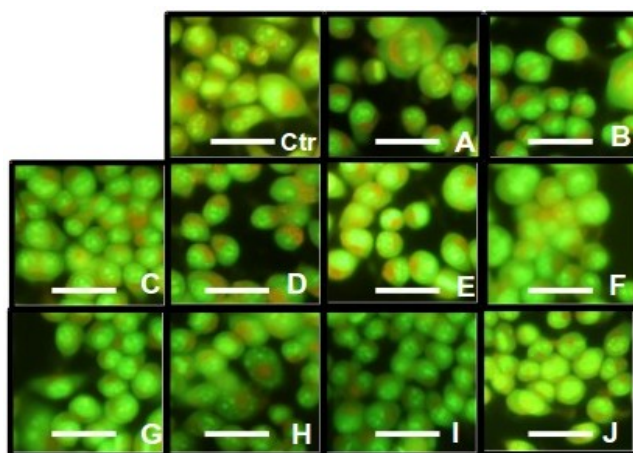
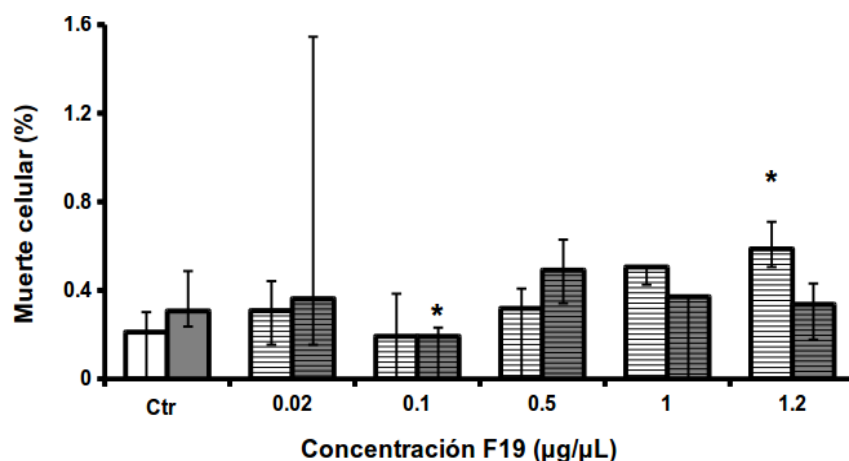


Figura 12: Efecto de concentraciones crecientes de p7 y F19 durante 5 h de exposición sobre las Neuro-2a. Las microfotografías muestran a las Neuro-2a teñidas con NA/BE. Ctr: control; A: F19 0,02 µg/µL; B: F19 0,1 µg/µL; C: F19 0,5 µg/µL; D: F19 1 µg/µL; E: F19 1,2 µg/µL; F: p7 0,01 µg/µL; G: p7 0,06 µg/µL; H: p7 0,1 µg/µL; I: p7 0,6 µg/µL y J: p7 1 µg/µL. Las células vivas se observan de color verde. Escala de 50 µm.

La **Gráfica 8** muestra el efecto de la concentración de F19 sobre Neuro-2a durante 5 h de exposición. F19 a una concentración de 1,2 µg/µL aumentó significativamente ($P < 0,05$) tres veces el porcentaje de apoptosis de 0,2 (0 , 0,3) % (control) a 0,6 (0,5 , 0,7) % (experimental). Las otras concentraciones de F19 estudiadas no indujeron cambios significativos en el porcentaje de apoptosis ($P > 0,05$). Los valores observados fueron de 0,3 (0,1 , 0,4); 0,2 (0 , 0,4); 0,3 (0 , 0,4) y 0,5 (0,4 , 0,5) % para 0,02; 0,1; 0,5 y 1,0 µg/µL respectivamente.

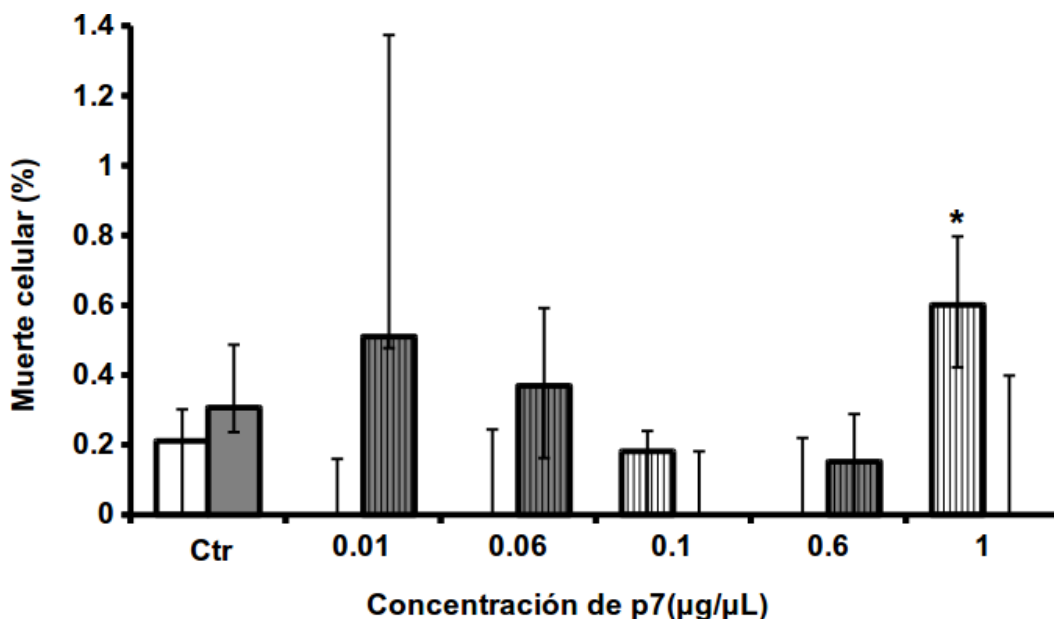
F19 a una concentración de 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ disminuyó significativamente ($P < 0,05$) el porcentaje de necrosis de 0,3 (0,2 , 0,5) % (control) a 0,2 (0 , 0,2) % (experimental). Las otras concentraciones de F19 estudiadas no indujeron cambios significativos ($P > 0,05$) en el porcentaje de necrosis respecto al control, los valores observados fueron: 0,4 (0,2 , 1); 0,5 (0,3 , 0,6); 0,4 (0 , 0,4) y 0,3 (0,2 , 0,4) % para 0,02; 0,5; 1,0 y 1,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de F19 respectivamente.



Gráfica 8: Porcentaje de muerte celular inducido en Neuro-2a por F19 (líneas horizontales) a 0,02; 0,1; 0,5; 1 y 1,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ durante 5 h de exposición. Los datos son expresados como el porcentaje de apoptosis (blanco), necrosis (gris) y representan la mediana de al menos 300 células contadas por campo con sus intervalos de confianza al 95 %. Los (*) indican las diferencias significativas en comparación al resto de las condiciones experimentales. Ctr: control.

La **Gráfica 9** muestra el efecto de p7 a concentraciones crecientes durante 5 h de exposición sobre Neuro-2a. El p7 a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ aumentó significativamente ($P < 0,05$) tres veces el porcentaje de apoptosis de 0,2 (0 , 0,3) % (control) a 0,6 (0,4 , 0,8) % (experimental). Las otras concentraciones de p7 estudiadas no indujeron cambios significativos ($P > 0,05$) en el porcentaje de apoptosis en comparación al control, los valores observados fueron: 0 (0 , 0); 0 (0 , 0,2); 0,2 (0 , 0,2) y 0 (0 , 0,2) % para 0,01; 0,06; 0,1; 0,6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de p7 respectivamente.

Las concentraciones de p7 estudiadas no indujeron cambios significativos en el porcentaje de necrosis respecto al control, los valores observados fueron: 0,5 (0,5 , 1); 0,4 (0,1 , 0,6); 0 (0 , 0,2); 0,2(0 . 0,3); 0 (0 , 0,4) para las concentraciones de 0,01; 0,06; 0,1; 0,6 y 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de p7 respectivamente. El porcentaje de necrosis del control fue de 0,3 (0,2 , 0,5) %.



Gráfica 9: Porcentaje de muerte celular inducido en Neuro-2a por p7 a 0,01; 0,06; 0,1; 0,6; 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ durante 5 h de exposición. Los datos fueron expresados como el índice de apoptosis (blanco) o necrosis (gris) a estas concentraciones y representan la mediana de al menos 300 células contadas por campo al azar con sus intervalos de confianza al 95 %. Los (*) indican las diferencias significativas en comparación al resto de las condiciones experimentales. Ctr: control

Se estudió el efecto a las 7 h de exposición de F19 y p7 (0,5 y 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) sobre las Neuro-2a. La **Figura 13** muestra las microfotografías de las células tomadas a las 7 h de exposición a distintas concentraciones de p7 y F19. Además se observó que a 7 h de incubación se produjo una variación en la coloración en los lisosomas de las células de un color rojo opaco a rojo brillante.

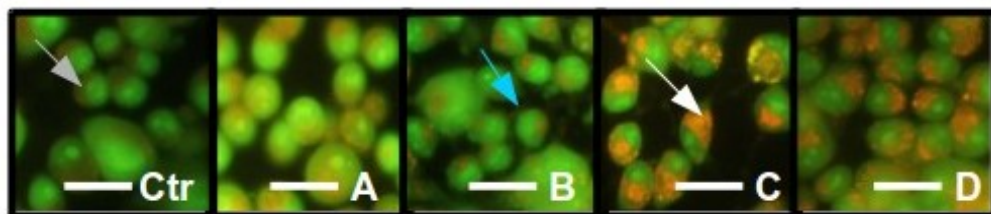
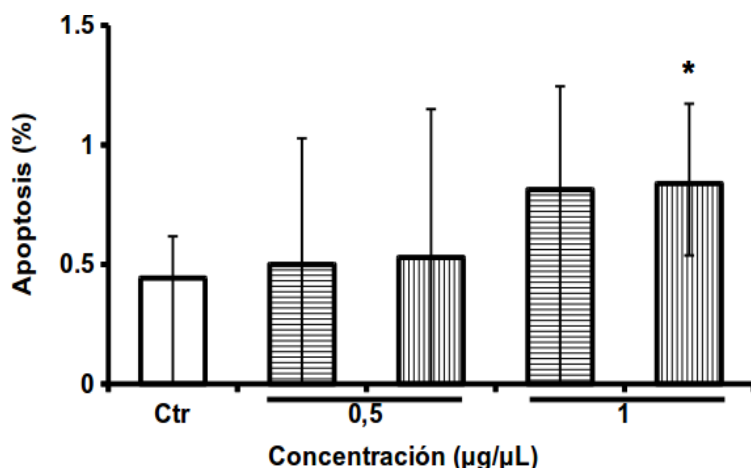


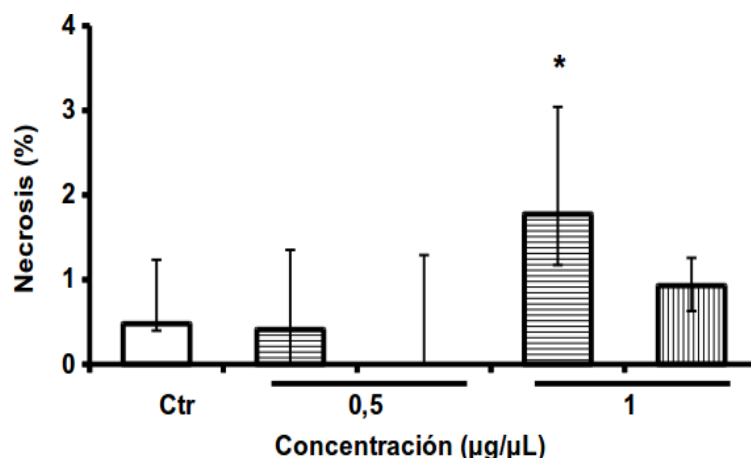
Figura 13: Efecto sobre las Neuro-2a de F19 y p7 durante 7 h de exposición. Las microfotografías muestran a las células teñidas con NA/BE. Ctr: control; A: F19 0,5 µg/µL; B: F19 1 µg/µL; C: p7 0,5 µg/µL; D: p7 1 µg/µL. Se observan células vivas de color verde (flecha azul) con sus núcleos (flecha gris) y la activación de los lisosomas (flecha blanca). Escala de 50 µm.

La **Gráfica 10** muestra el porcentaje de apoptosis inducido por F19 y p7 a concentraciones de 0,5 y 1 µg/µL durante 7 h de exposición. Se observó que F19 y p7 aumentaron el porcentaje de apoptosis respecto a los controles. Sin embargo sólo el aumento inducido por p7 (1 µg/µL) fue significativo ($P < 0,05$) respecto al control y a p7 (0,5 µg/µL). Los porcentajes de apoptosis observados fueron para p7 a 1 µg/µL de: 0,83 (0 , 1,2) %, el control 0,44 (0 , 0,61) % y a 0,5 µg/µL de: 0,53 (0 , 1,14) % apoptosis. Los valores de porcentaje de apoptosis inducidos por F19 fueron 0,5 y 0,81 % a concentraciones de 0,5 y 1 µg/µL respectivamente.



Gráfica 10: Porcentaje de apoptosis inducida en Neuro-2a por F19 (líneas horizontales) y p7 (líneas verticales) a 0,5 y 1 µg/µL durante 7 h de exposición. Los resultados representan la mediana de al menos 100 células contadas por campo al azar con sus intervalos de confianza al 95 %. Los (*) indican las diferencias significativas en comparación al control (ctr) (barra blanca).

La **Gráfica 11** muestra el porcentaje de necrosis inducido en las Neuro-2a por F19 y p7 luego de 7 h de incubación. Se observó un aumento significativo ($P < 0,05$) a de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de F19 respecto al control. Los valores de los porcentajes de necrosis obtenidos para F19 y p7 a 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ fueron: 0,4 (0 , 1,3) y 0 (0 , 1,2) % respectivamente. Los valores de los porcentajes de necrosis obtenidos para F19 y p7 a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ fueron: 1,77 (1,17 , 3,04) y 0,92 (0,62 , 1,25) % respectivamente. Los valores del porcentaje de necrosis obtenidos para el control fue de 0,48 (0,39 , 1,23) %.



Gráfica 11: Porcentaje de necrosis inducida en Neuro-2a por F19 (líneas horizontales) y p7 (líneas verticales) a 0,5 y 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ durante 7 h de exposición. Los resultados representan la mediana de al menos 100 células contadas por campo al azar con sus intervalos de confianza al 95 %. Los (*) indican las diferencias significativas en comparación al control (ctr) (barra blanca).

- Efecto del tiempo de exposición de la fracción activa y su componente mayoritario sobre Neuro-2a.

Se estudió el efecto del tiempo de exposición de F19 y p7 sobre las Neuro-2a a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. La **Figura 14** muestra las microfotografías tomadas a las 5, 7, 9 y 24 h de exposición a F19 y p7. Las células expuestas a p7 durante 7 y 9 h (**Figura 14 J y K**) desarrollaron vesiculaciones en la membrana celular y cambiaron la coloración de verde hacia verde brillante o amarillo-naranja, con la presencia de células necrosa-

das de coloración roja y células apoptóticas de coloración verde brillante. Por otro lado, a las 9 y 24 h de exposición a p7 se observaron numerosos restos celulares (**Figura 14 K y L**). La mayoría de los neuroblastomas expuestos a las toxinas durante 5 (**Figura 14 E e I**) ó 24 (**Figura 14 H y L**) h no presentaron un cambio cualitativo en comparación al control (**Figura 14 A, B, C y D**).

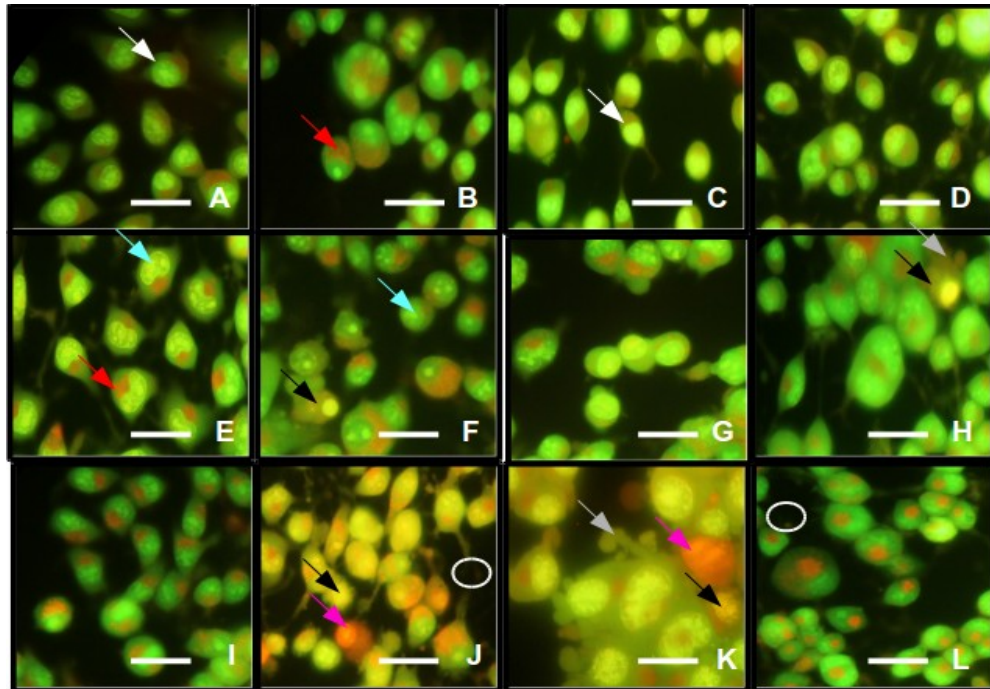
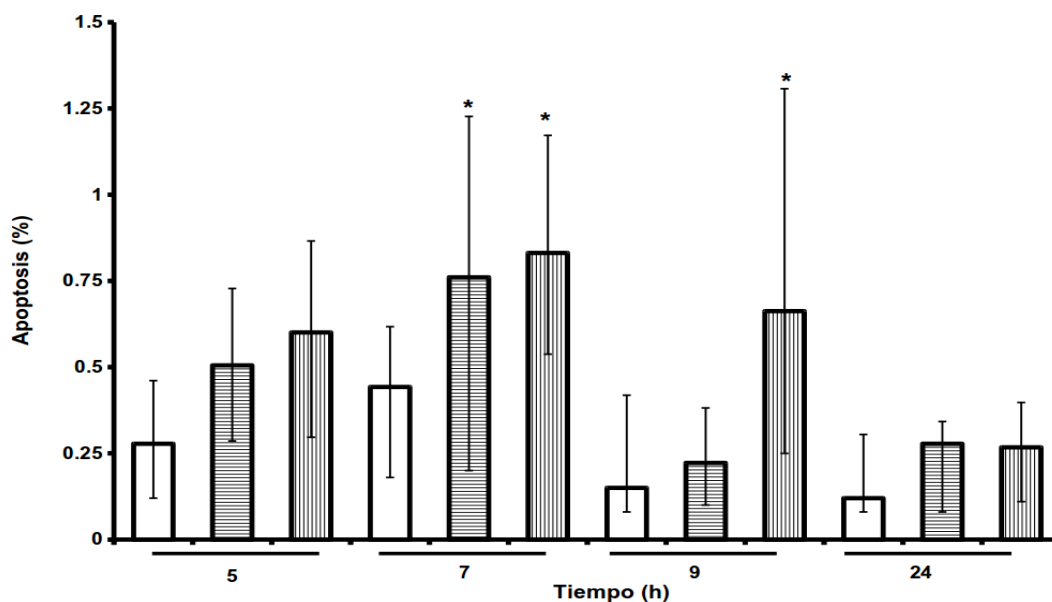


Figura 14: Efecto del tiempo de exposición de F19 y p7 a 1 µg/µL sobre las Neuro-2a. Las microfotografías muestran las Neuro-2a teñidas con NA/BE. A, B, C y D: células controles a 5, 7, 9 y 24 h respectivamente. E, F, G y H: células incubadas con F19 durante 5, 7, 9 y 24 h respectivamente. I, J, K y L: células incubadas con p7 durante 5, 7, 9 y 24 h. En las microfotografías se observan células vivas de color verde (flecha blanca) con al menos dos nucléolos (flecha azul) y lisosomas (flecha roja), células necrosadas de color rojo (flecha rosada), células apoptóticas tempranas de color verde brillante (F, J) y tardías (K) (flecha negra), formación de vesiculaciones en la membrana celular (flecha gris) y restos celulares (círculos). Escala de 50 µm.

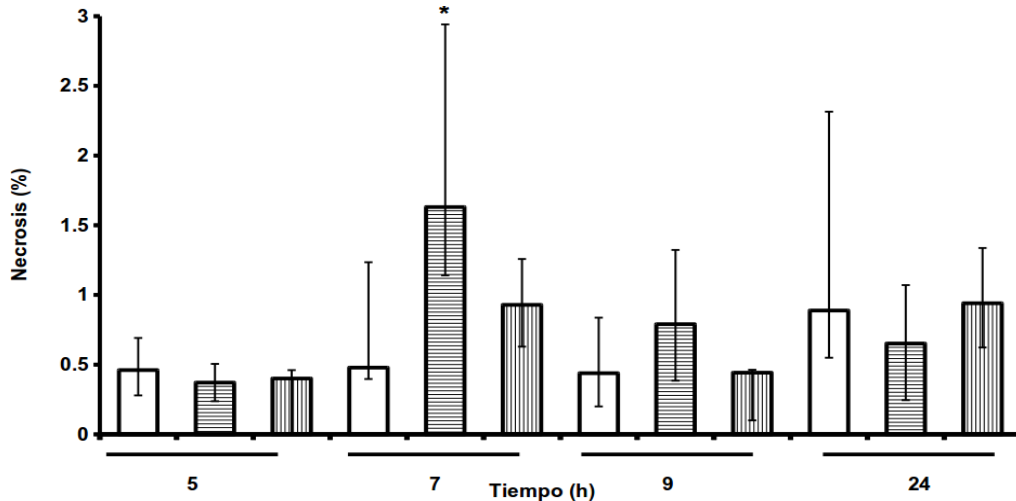
En la **Gráfica 12** se observó el porcentaje de apoptosis inducido por F19 y p7 (1 µg/µL) durante 5, 7, 9 y 24 h de exposición. Se evidenció un aumento significativo ($P < 0,05$) a las 7 h de exposición desde 0,44 (0,18 , 0,61)% del control hasta 0,8 (0,2 , 1,2) y 0,8 (0,5 , 1,2) % de apoptosis inducido por F19 y p7 respectivamente. A las 9 h de exposición p7 indujo un aumento significativo ($P < 0,05$) desde 0,15 (0,08 ,

0,41) % hasta 0,7 (0,3 , 1,3) % de apoptosis. Los valores de los porcentajes de apoptosis inducidos por F19 a las 5, 9 y 24 h de exposición fueron: 0,5 (0,3 , 0,7); 0,2 (0,1 , 0,4) y 0,3 (0,1 , 0,3) % respectivamente y los inducidos por p7 a las 5 y 24 h de incubación fueron de: 0,6 (0,3 , 0,9) y 0,3 (0,1 , 0,4) % respectivamente.



Gráfica 12: Porcentaje de apoptosis inducido por F19 (líneas horizontales) y p7 (líneas verticales) a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ durante 5, 7, 9 y 24 h de exposición sobre Neuro-2a. Los resultados representan la mediana con sus intervalos de confianza al 95 % de al menos 100 células contadas por campo al azar. Los (*) indican las diferencias significativas en comparación al los controles (barras blancas).

La **Gráfica 13** muestra el porcentaje de necrosis inducido por F19 y p7 al exponer las células durante 5, 7, 9 y 24 h de exposición. Únicamente F19 a las 7 h de incubación indujo un aumento significativo ($P < 0,05$) desde 0,47 (0,39 , 1,23)% del control hasta 1,6 (1,1 , 2,9) % de necrosis del experimental. Los porcentajes de necrosis inducidos por F19 a las 5, 9 y 24 h de exposición fueron: 0,4 (0,2 , 0,5); 0,8 (0,4 , 1,3) y 0,7 (0,2 , 1,1) % respectivamente, mientras que por p7 fueron de 0,4 (0 , 0,5); 0,9 (0,6 , 1,3); 0,4 (0,1 , 0,5) y 0,9 (0,6 , 1,3) % para las 5, 7, 9 y 24 h de incubación respectivamente.



Gráfica 13: Porcentaje de necrosis inducida por F19 (líneas horizontales) y p7 (líneas verticales) a 1 µg/µL durante 5, 7, 9 y 24 h de exposición sobre Neuro-2a. Los resultados representan la mediana con sus intervalos de confianza al 95 % de al menos 100 células contadas por campo al azar. Los (*) indican las diferencias significativas en comparación a los controles (ctr) (barras blancas).

- Efecto de los componentes de la fracción activa.

La **Figura 15** muestra el efecto sobre las Neuro-2a de los picos de F19 a 1 µg/µL durante 7 h de exposición. Se pudo observar que p7 y p8, indujeron la activación de los lisosomas en esta línea celular de neuroblastomas.

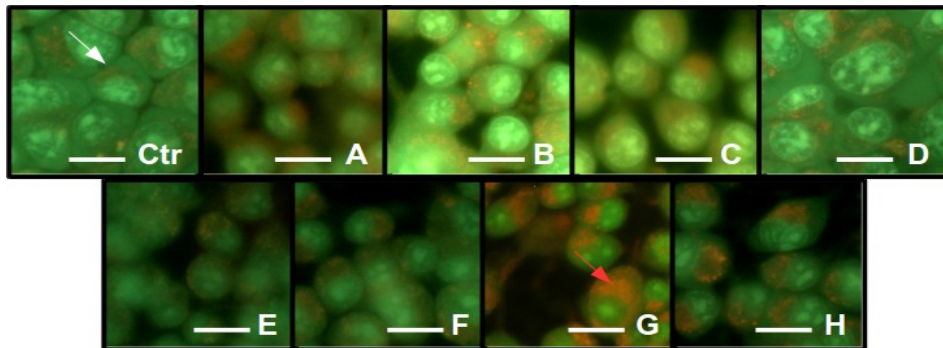
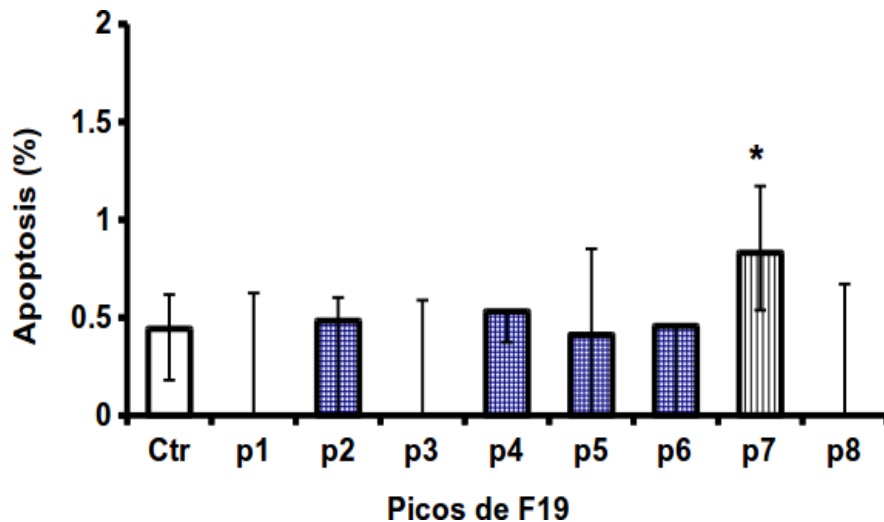


Figura 15: Efecto de los componentes de F19 separados mediante CLAR-FR sobre las Neuro-2a. Las microfotografías muestran a las Neuro-2a expuestas durante 7 h a los componentes de F19 a 1 µg/µL. Se observan células vivas (flecha blanca) y lisosomas (flecha roja). Ctr: control; A: p1; B: p2 C: p3; D: p4; E: p5; F: p6; G:p7 y H: p8. Escala de 25 µm

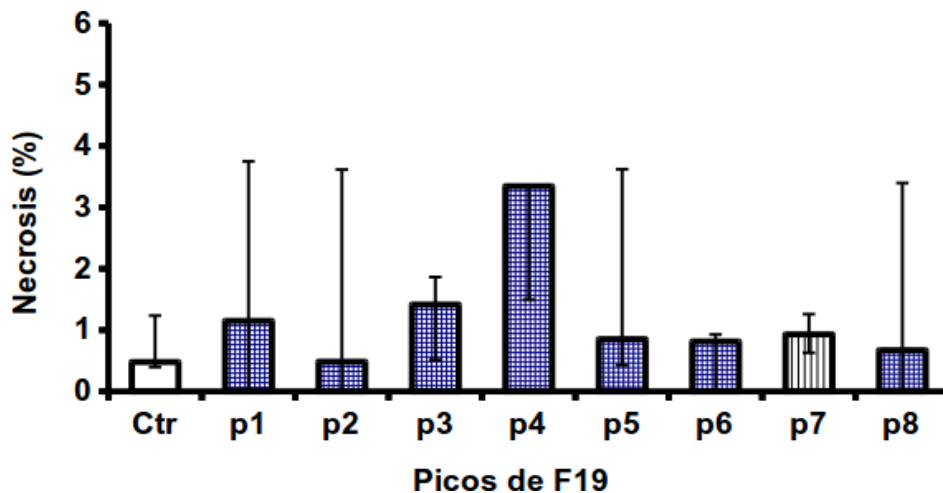
La **Gráfica 14** muestra el efecto sobre el porcentaje de apoptosis de los neuroblastomas a las 7 h de exposición a p1, p2, p3, p4, p5, p6, p7, p8 (1 µg/µL). El ensayo con NA/BE reveló que solamente p7 aumentó significativamente ($P < 0,05$) el por-

centaje de apoptosis desde 0,44 (0,18 , 0,61) % del control hasta 0,83 (0,53 , 1,17) % de experimental. Los porcentajes de apoptosis inducidos por p1, p2, p3, p4, p5, p6 y p8 en las células fueron 0,44 (0,18 , 0,61); 0 (0 , 0,62); 0,48 (0 , 0,6); 0 (0 , 0,58); 0,53 (0,37 , 0,53); 0,41 (0 , 0,85); 0,45 (0 , 0,46); 0 (0 , 0,67) % respectivamente.



Gráfica 14: Porcentaje de apoptosis inducido sobre Neuro-2a por p1, p2, p3, p4, p5, p6, p8 (cuadrados) y p7 (líneas verticales) a (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) durante 7 h de exposición. Los resultados representan la mediana con sus intervalos de confianza al 95 % de al menos 100 células contadas por campo al azar. Los (*) indican las diferencias significativas en comparación al control (ctr) (barra blanca).

La **Gráfica 15** muestra el efecto sobre el porcentaje de necrosis de los neuroblastomas a las 7 h de exposición a p1, p2, p3, p4, p5, p6, p7 y p8 a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. El ensayo con NA/BE reveló que ninguno de sus componentes indujo efectos significativos ($P > 0,05$) en el porcentaje de necrosis. Los valores inducidos por p1, p2, p3, p4, p5, p6, p7 y p8 fueron de 1,14 (0 , 3,75); 0,48 (0 , 3,61); 1,41 (0,5 , 1,8); 3,34 (1,49 , 3,34); 0,85 (0,42 , 3,61); 0,81 (0 , 0,92); 0,92 (0,62 , 1,25); 0,67 (0 , 3,39) % de necrosis respectivamente, mientras que el control indujo 0,47 (0,39 , 1,23) % de muerte por necrosis.



Gráfica 15: Porcentaje de necrosis inducida sobre Neuro-2a por p1, p2, p3, p4, p5, p6, p8 (cuadrados) y p7 (líneas verticales) a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ durante 7 h de exposición. Los resultados representan la mediana con sus intervalos de confianza al 95 % de al menos 100 células contadas por campo al azar. Los (*) indican las diferencias significativas en comparación al control (ctr) (barra blanca).

- Efecto de la fracción activa y su componente mayoritario sobre la activación de los lisosomas:

La activación de los lisosomas por efecto de F19 y p7 se cuantificó en función de la coloración de los lisosomas con NA. La **Figura 16** muestra las diferencias en la coloración de los lisosomas inducida por F19 y p7 (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) a las 5, 7, 9 y 24 h de exposición. Se observó que los lisosomas intensificaron su color hacia rojo brillante cuando las células estuvieron expuestas a las toxinas durante 7 y 9 h. Se cuantificó la variación de la intensidad de fluorescencia emitida por los lisosomas en las distintas condiciones como la DOI del color rojo.

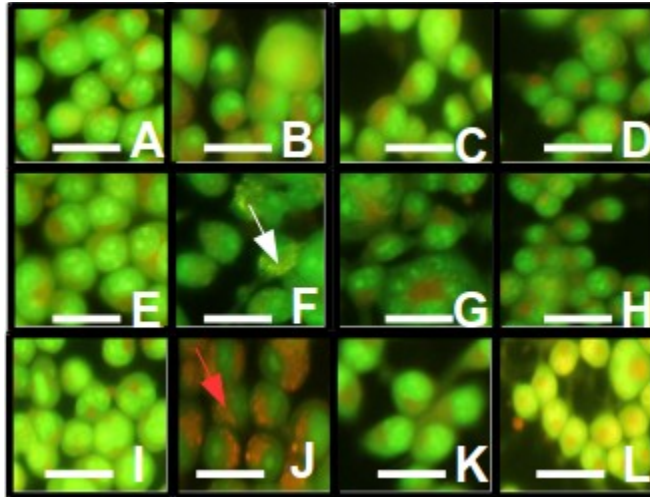
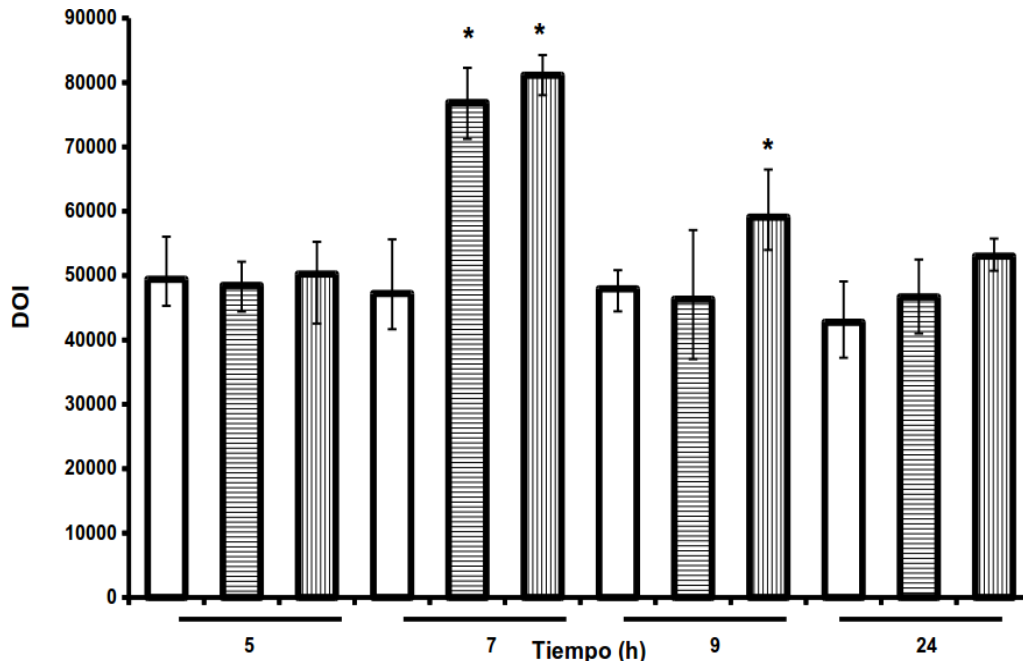


Figura 16: Activación de los lisosomas por efecto de las toxinas. Las microfotografías muestran las Neuro-2a durante 5, 7, 9 y 24 h de exposición a F19 y p7 a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y teñidas posteriormente con NA/BE. A, B, C y D: células controles a 5, 7, 9 y 24 h respectivamente. E, F, G y H: células incubadas con F19 (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) durante 5, 7, 9 y 24 h respectivamente. I, J, K y L: células incubadas con p7 (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) durante 5, 7, 9 y 24 h respectivamente. Se observan lisosomas de amarillo (flecha blanca) (F) y de color rojo (flecha roja) (G y J). Escala de 50 μm .

La **Gráfica 16** muestra la DOI de los lisosomas a las 5, 7, 9 y 24 h de exposición a F19 y p7 (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Se evidenció que los neuroblastomas expuestos durante 7 h a F19 y p7 aumentaron significativamente ($P < 0,05$) la DOI en comparación al control desde 47223 (38819,5 , 52765,5) hasta 76895,5 (71504 , 82545) y 81142 (78013,5 , 84245) respectivamente. El efecto de p7 sobre la DOI de los neuroblastomas se mantuvo elevado a las 9 h de incubación con valores de 59083,2 (51679,5 , 64179), mientras que para el resto de los casos no se observó un efecto significativo ($P > 0,05$). La DOI-roja inducida por la exposición a F19 a las 5, 9 y 24 h fue de 48487 (44805,5 , 52556); 46339,8 (35600 , 55655) y 46686,5 (40868 , 52363) respectivamente y por la exposición a p7 de 50253 (45243 , 57954,5) y 53031,5 (50313 , 55299,5) a las 5 y 24 h de exposición respectivamente.



Gráfica 16: Densidad óptica integrada del color rojo de los lisosomas de Neuro-2a sometidos a F19 (líneas horizontales) y p7 (líneas verticales) a 1 µg/µL durante 5, 7, 9 y 24 h de exposición. Los resultados representan la mediana de la DOI de los lisosomas de al menos treinta células por condición con sus intervalos de confianza al 95 %. Los (*) indican las diferencias significativas en comparación a los controles (barras blancas).

- Efecto de fracción activa y su componente mayoritario sobre Neuronas de Hipocampo

La **Figura 17** muestra el efecto de F19 (1, 0,5; 0,1 µg/µL) y p7 (1 µg/µL) durante 5 h de exposición sobre las neuronas de hipocampo. Se observó que las neuronas de hipocampo tienen una alta densidad de neuritas en condiciones controles, sin embargo cuando se expusieron a F19 y p7 disminuyeron su longitud cualitativamente. Se observan células apoptóticas de color verde brillante o anaranjado y células necrosadas de color rojo en las distintas condiciones.

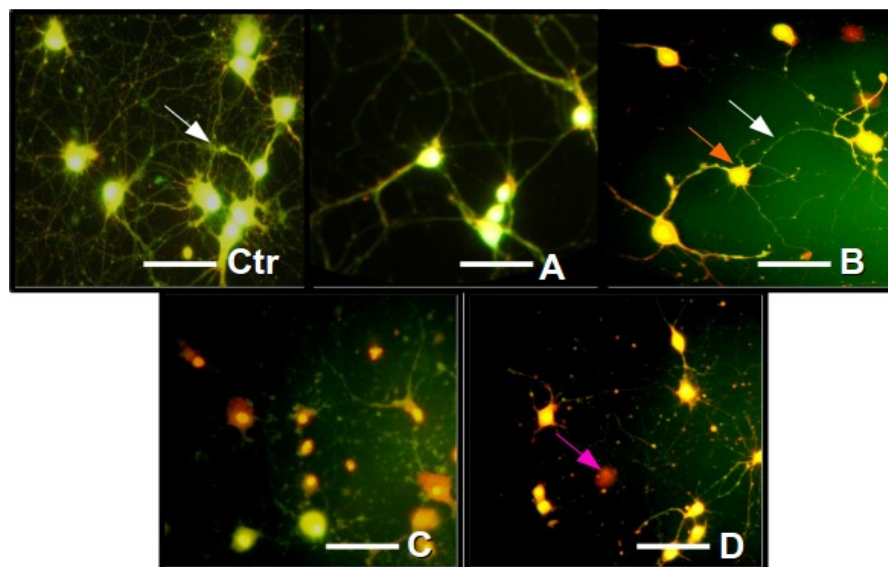
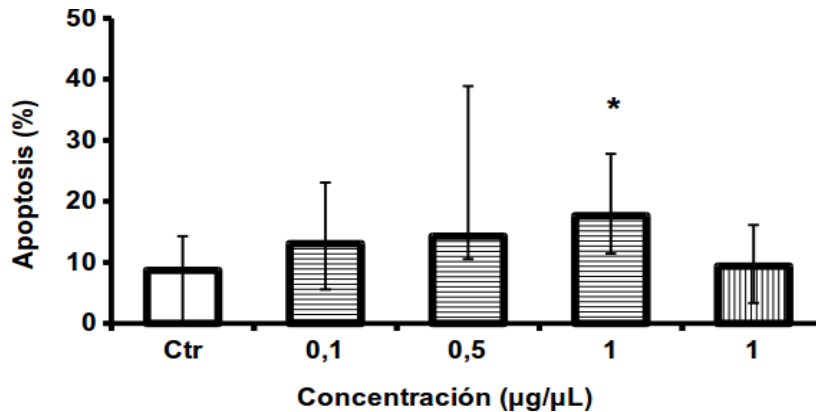


Figura 17: Microfotografías de las neuronas de hipocampo expuestas durante 5 h a F19 (0,1; 0,5; 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) y p7 a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Ctr: control; A: F19 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; B: F19 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; C: F19 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y D: p7 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Se observan neuritas, células viables de color verde; apoptóticas amarillas y naranjas y necrosadas de color rojo. Escala de 30 μm

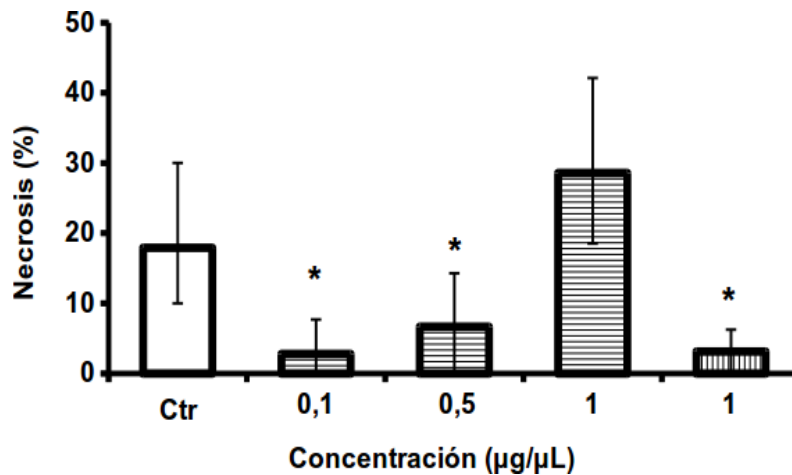
La **Gráfica 17** muestra el efecto sobre el porcentaje de apoptosis en las neuronas de hipocampo inducido por F19 (0,1; 0,5; 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) y p7 (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) durante 5 h de exposición. Se observó el aumento del porcentaje de apoptosis a medida que se incrementó la concentración de F19, sin embargo sólo a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ aumentó significativamente ($P < 0,05$) a 0,17 (0,11 , 0,27) % de apoptosis en comparación al control que obtuvo 0,08 (0 , 0,14) % de apoptosis. F19 a concentraciones de 0,1 y 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ indujo 0,13 (0,06 , 0,23) y 0,14 (0,11 , 0,39) % de apoptosis respectivamente, mientras que p7 a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ indujo 0,09 (0,03 , 0,16) % de apoptosis.

La **Gráfica 18** muestra el efecto sobre el porcentaje de necrosis inducido por F19 (0,1; 0,5; 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) y p7 (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) durante 5 h de exposición sobre las neuronas de hipocampo. F19 a concentraciones de 0,1; 0,5; 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ indujo 0,02 (0 , 0,08); 0,06 (0 , 0,14) y 0,28 (0,19 , 0,42) % de necrosis respectivamente, mientras que p7 a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ indujo 0,03 (0 , 0,06) %. Solamente F19 (0,1 y 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) y p7 (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) dismi-

nuyeron significativamente ($P < 0,05$) respecto al control cuyo porcentaje de necrosis fue de 0,17 (0,1 , 0,3) %. El porcentaje de necrosis de F19 a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ no tuvo diferencia significativas ($P > 0,05$) en comparación al control.

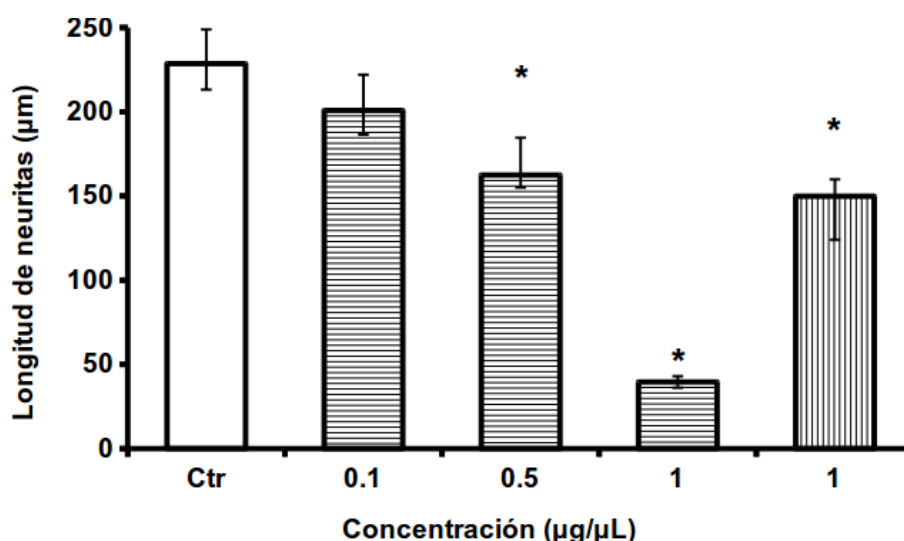


Gráfica 17: Efecto de F19 y p7 en el porcentaje de apoptosis en las neuronas de hipocampo durante 5 h de exposición. El efecto de F19 (líneas horizontales) se estudió a 0,1; 0,5 y 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ mientras que p7 (líneas verticales) a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Los resultados representan la mediana de al menos diez células contadas por campo con su intervalo de confianza al 95 %. Los (*) indican las diferencias significativas en comparación al control (ctr) (barra blanca).



Gráfica 18: Efecto de F19 y p7 sobre el porcentaje de necrosis en neuronas de hipocampo durante 5 h de exposición. El efecto de F19 (líneas horizontales) se estudió a 0,1; 0,5 y 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ mientras que p7 (líneas verticales) a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Los resultados representan la mediana de al menos diez células contadas por campo al azar con su intervalo de confianza al 95 %. Los (*) indican las diferencias significativas en comparación al control (ctr) (barra blanca).

La **Gráfica 19** muestra el efecto dosis dependiente de la disminución de la longitud de las neuritas de las neuronas de hipocampo. Se observó una disminución estadísticamente significativa ($P < 0,05$) en la longitud de las neuritas desde 228,6 (213,1 , 250) μm hasta 162,4 (155 , 184,6) y 39,6 (36,1 , 43) μm con 0,5 y 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de F19 respectivamente y hasta 148,8 (124 , 160) μm con 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de p7. También se observó que F19 a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ tiene un efecto más pronunciado que su componente mayoritario, p7, a la misma concentración. Por otro lado, una concentración de 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de F19 no indujo una disminución significativa ($P > 0,05$) en comparación al control cuya longitud fue de 200,8 (186,5 , 222) μm .



Gráfica 19: Longitud de las neuritas de las neuronas de hipocampo expuestas a F19 (líneas horizontales) a 0,1; 0,5; 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y a p7 (líneas verticales) a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ durante 5 h. Los resultados son expresados como la mediana de al menos diez células contadas por campo al azar y su intervalo de confianza al 95 %. Los (*) señalan las diferencias significativas ($P < 0,05$) en comparación al control (ctr) (barra blanca).

Caracterización del mecanismo anticancerígeno por inmunocitoquímica.

La **Figura 18** muestra las microfotografías de la inmunocitoquímica de las células Neuro-2a expuestas a F19 a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ con sus respectivos controles. Se observó que en los controles negativos (**Figura 18 A y D**) hay una unión inespecífica de los anti-

cuerpos secundarios a las células. Además se observó el incremento cualitativo de la coloración del rojo y verde en las células expuestas a F19 a los distintos juegos de anticuerpos en comparación los controles.

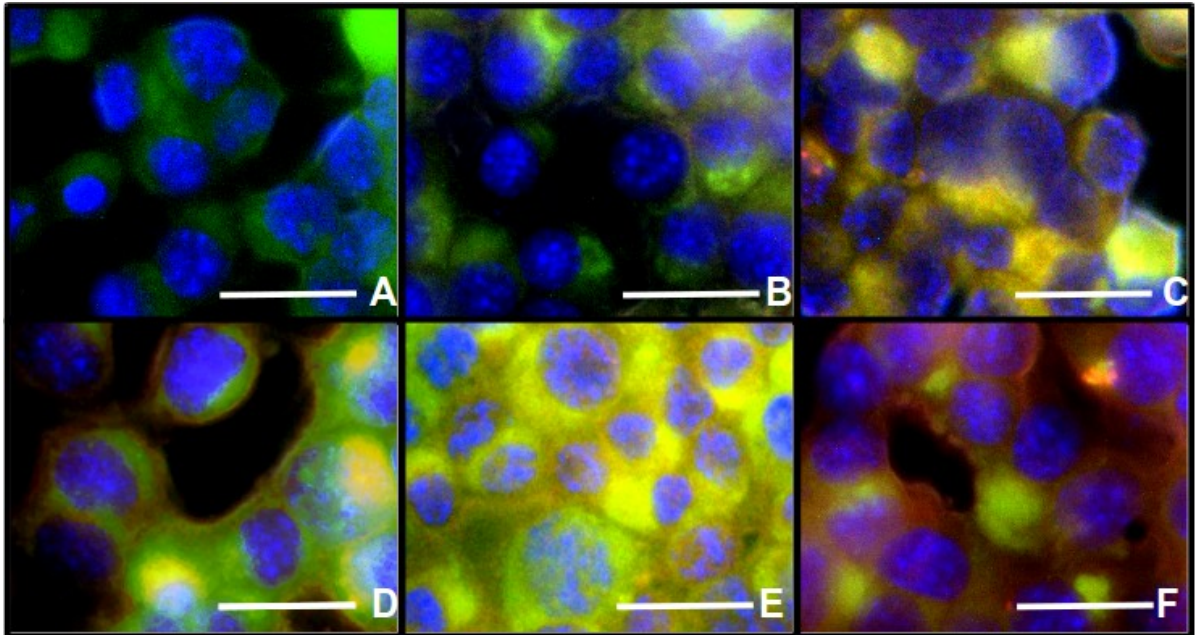
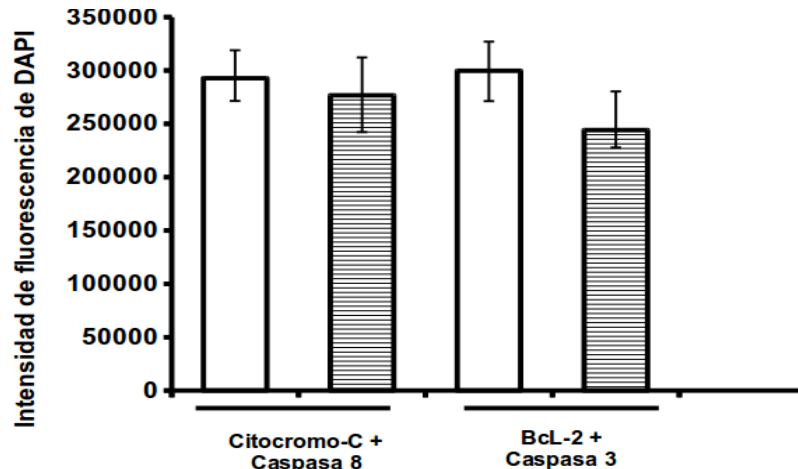


Figura 18: Microfotografías de Neuro-2a del ensayo de inmunocitoquímica. B y E corresponden a las células expuestas al juego de anticuerpos 1 (anti-citocromo c+ anticaspasa 8); E y F a las expuestas al juego de anticuerpos 2 (anti-Bcl-2+ anticaspasa 3). A, B y C son las células incubadas en medio y D, E y F las incubadas con F19 (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) durante 7 h respectivamente. Las microfotografías A y D corresponden a los controles negativos sólo con los anticuerpos secundarios. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron: anti-IgG-ratón marcado con FITC (verde) y anti-IgG-oveja marcado con rodamina (rojo). Las células fueron incubadas en DAPI (azul) antes de ser observadas al microscopio. Escala de 50 μm .

La **Gráfica 20** muestra la intensidad de fluorescencia del DAPI que corresponde a la intensidad de los núcleos, de las distintas condiciones. No se observaron diferencias significativas ($P > 0,05$) en la intensidad de fluorescencia del DAPI en ninguno de los casos. La intensidad de fluorescencia para el DAPI en las células controles y las expuestas a F19, marcadas con anticuerpos contra citocromo c y caspasa 8, fue de 292751 (258246 , 328324) y 276684 (248218 , 304000) respectivamente, mientras que la intensidad de fluorescencia de células controles y las expuestas a F19 marca-

das con anticuerpos contra Bcl-2 y caspasa 3 fue de 299705 (283408 , 335865) y 244129 (211716 , 259962) respectivamente.

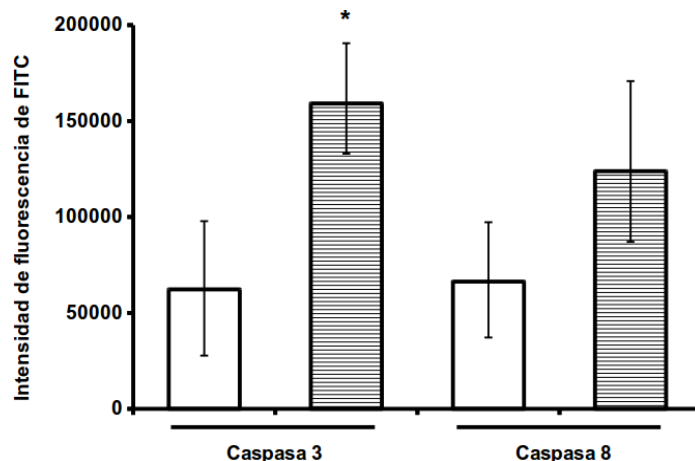


Gráfica 20: Intensidad de fluorescencia del DAPI en la línea celular Neuro-2a expuestas a F19 (líneas horizontales) a 1 µg/µL durante 7 h incubadas con anti-citocromo c + anti-caspasa 8 ó a anti-Bcl-2 + anti-caspasa 3. Las barras blancas corresponden a los controles de cada condición. Los resultados son expresados como la mediana de al menos veinte células cuantificadas al azar y su intervalo de confianza al 95 %.

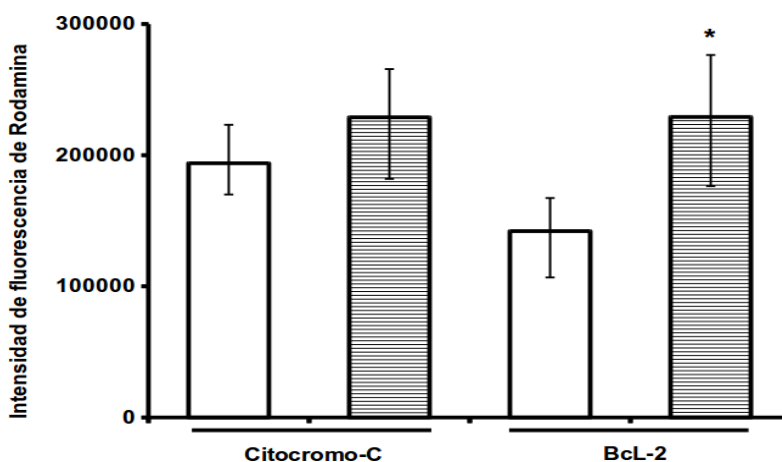
La **Gráfica 21** muestra la intensidad de fluorescencia del complejo caspasas 3-FITC y caspasa 8-FITC, en las distintas condiciones. Se observó un aumento significativo ($P < 0,05$) en la intensidad de fluorescencia del complejo caspasa 3-FITC en comparación a su control desde 292751 (258246 , 328324) hasta 389657 (363482 , 421069). Mientras que la intensidad de fluorescencia del complejo caspasa 8-FITC de 354363 (317566 , 401306) se mantuvo estadísticamente igual ($P > 0,05$) a las del control de 296829 (267656 , 327740), aunque se evidenció su tendencia a aumentar.

En la **Gráfica 22** se muestra la intensidad de fluorescencia del complejo citocromo c-rodamina y Bcl-2-rodamina, en las distintas condiciones. Se observó un aumento significativo ($P < 0,05$) en la intensidad de fluorescencia de la proteína Bcl-2 en comparación a su control desde 142098 (116816 , 177430) hasta 229190 (181962 ,

281960); mientras que la intensidad de fluorescencia del complejo citocromo c-rodamina fue de 227879 (192082 , 275822) el cual se mantuvo estadísticamente ($P > 0,05$) igual al control cuya intensidad de fluorescencia fue de 193875 (164551 , 217716), aunque se evidenció su tendencia a aumentar.



Gráfica 21: Intensidad de fluorescencia de los complejos caspasa 3-FITC y caspasa 8-FITC en la línea celular Neuro-2a expuestas con F19 (líneas horizontales) a $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ durante 7 h, correspondiente a las caspasas 8 y caspasas 3. Las barras blancas corresponden a los controles de cada condición. Los resultados son expresados como la mediana de al menos 20 células contadas por campo al azar y su intervalo de confianza al 95 %. Los (*) señalan las diferencias significativas ($P < 0,05$) en comparación al control.



Gráfica 22: Intensidad de fluorescencia de la rodamina en la línea celular Neuro-2a expuestas a F19 (líneas horizontales) a $1 \mu\text{g}/\mu\text{g}$ durante 7 h correspondiente al complejo Citocromo c-rodamina y Bcl-2-rodamina. Las barras blancas corresponden a los controles de cada condición. Los resultados son expresados como la mediana de al menos 20 células contadas por campo al azar y su intervalo de confianza al 95 %. Los (*) señalan las diferencias significativas ($P < 0,05$) en comparación al control.

DISCUSIÓN

El veneno de escorpiones ha sido utilizado desde tiempos medievales en la medicina y terapia tradicional, dado que está compuesto por una variedad de componentes biológicamente activos. La mayoría de estos compuestos son neurotóxicos con capacidad de modular, abrir o bloquear canales iónicos (Borges y col., 1990; 2006 D'Suze y col., 1996; 1997;1999; 2004a; 2009; Tsushima y col., 1999; Rodríguez de la Vega y col., 2003; Batista y col., 2006; Prochnicka-Chalufour y col., 2006; Diego-García y col., 2007; Díaz y col., 2009; Forsyth y col., 2012; Peigneur y col., 2012). Por ello han captado el interés de investigadores dada la posibilidad de ser utilizadas en el diseño de drogas o como herramientas farmacológicas, bioquímicas y fisiológicas. En las últimas décadas, se ha demostrado el efecto anticancerígeno de toxinas aisladas de venenos de escorpiones (Zhang y col., 1987; DeBin y Strichartz, 1991; Garcia-Calvo y col., 1993; Soroceanu y col., 1998; 1999; Schwab y col., 1999; Liu y col., 2002; 2003; Deshane y col., 2003; Wang y Ji, 2005; Bloch y col., 2007; Gupta y col., 2007; 2010; Gao y col., 2009; Zhang y col., 2009; Cui y col., 2010; D'Suze y col., 2010; Zargan y col., 2011a; 2011b; 2011c; Song y col., 2012; Jang y col., 2011). Sin embargo, en pocas se ha evidenciado el efecto anticancerígeno sobre neuroblastomas (Zargan y col., 2011a; 2011b), cáncer neuronal infantil de pronóstico poco favorable por la baja respuesta a tratamientos (Barker y col., 2007; Grandinetti y col 2006; <http://www.cancer.net>). Esto ha motivado la búsqueda de compuestos con actividad anticancerígena del veneno del escorpión venezolano *T. discrepans* sobre la línea celular de neuroblastoma, Neuro-2a.

El veneno de *T. discrepans* se aisló a través de estimulaciones eléctricas lo cual permite la extracción de aproximadamente el 100 % del veneno con una mayor pureza en comparación a la extracción manual (Oukkache y col., 2013). Se trabajó con lotes de ordeños de más de 100 individuos, ya que existen diferencias cualitativas significativas intra-especie (D'Suze y Sevcik., 2010). Trabajar con lotes de ordeños de numerosos individuos de la misma especie, asegura la presencia de todas las proteínas que la especie produce disminuyendo la variación entre lotes del veneno.

La separación de las fracciones que componen el veneno a través de CLAR-FR se basa en las diferencias en hidrofobicidad de las proteínas. Esto a su vez depende de los aa que conforman las estructuras primarias de estas. En la CLAR-FR eluyen primero las proteínas más polares y posteriormente las más hidrofóbicas, dado que la condición inicial de la fase móvil es acuosa y un alto grado de estructuras organizadas de agua se encuentran alrededor de la fase estacionaria y de las proteínas inmovilizadas. Esto genera una interacción bioquímica entre la región polar de las proteínas con la fase móvil, mientras que la región hidrofóbica se encuentra unida a la fase estacionaria. La elución en gradiente permitió aumentar la concentración de ACN en función del tiempo. El ACN compitió por el sitio de unión de la proteína inmovilizada en la fase estacionaria, rompiendo los enlaces bioquímicos de la proteína con esta y ocasionando su consecutiva elución. De las cuarenta fracciones del veneno, se observó que sólo tres indujeron la muerte celular en Neuro-2a (**Gráfica 2**) y de ellas se escogió la F19 para caracterizar su efecto.

El perfil cromatográfico del veneno de *T. discrepans* es complejo (D'Suze y Sevcik, 2010). La CLAR produce una mejor separación que las cromatografías conven-

cionales (Céard y col, 1992), con ella se disminuye el número de pasos de repurificación y se evita la pérdida de material, dada la sensibilidad de la CLAR ya que se puede trabajar con microgramos de este. El perfil cromatográfico del veneno de *T. discrepans* es parecido a los perfiles cromatográficos de otras especies de *Tityus* (Batista y col, 2004; Diego-García y col 2005). Estos, obtenidos en condiciones experimentales similares, se pueden catalogar como huellas digitales que permiten diferenciarlos por especie (D'Suze y Sevcik, 2010). El perfil cromatográfico del veneno de *T. discrepans* es semejante a otros perfiles cromatográficos ya reportados en otros trabajos con la misma especie, lo que indica su alta reproducibilidad (D'Suze y col., 2010; Ramírez-Bello y col., 2014). En el veneno de *T. discrepans* se han identificado componentes con diversas actividades pero hasta ahora, sólo con actividad anticancerígena fueron las Neopláquinas 1 y 2 (D'Suze y col., 2010) las que presentaron actividad sobre cáncer de seno.

La riqueza del veneno de *T. discrepans* se evidenció en el análisis proteómico del mismo, el cual arrojó la identificación de 205 componentes con M.M entre 272 y 57908 Da (Batista y col., 2006). En el presente trabajo se siguió la metodología utilizada en los trabajos previos del laboratorio (**Gráfica 1**), sin embargo en la separación de los componentes de F19 (**Gráfica 3**) se disminuyó el gradiente utilizado en la separación del veneno. Esto permitió que el intercambio matriz-proteína-fase móvil fuese más específico y que pequeñas diferencias en polaridad de las proteínas fueran notables. El resultado fue la separación de la F19 en ocho picos. El pico mayoritario, p7, representó el 76,52 % de F19. Este pico, se ha descrito como una toxina inflamatoria (InfTx4) con M.M de 7784,32 Da y una secuencia amino terminal de: YVWP

(Ramírez-Bello y col., 2014). Esta secuencia no se encontró en las bases de datos de péptidos. En ese trabajo los autores no pudieron separar mediante CLAR-FR los distintos componentes de la F19, pues la variación del gradiente para la separación fue de 0,5 % ACN/min mientras que en el presente trabajo se redujo a la mitad, por lo que pequeñas diferencias en la polaridad de las proteínas que conforman F19 fueron evidenciadas, logrando separar con mayor eficiencia dichos componentes. Estos resultados fueron corroborados mediante la electroforesis (**Figura 10**), donde se observó que la F19 está compuesta por diversas proteínas, evidenciadas en las distintas bandas. Las M.M de estos se mantienen en un rango próximo a la M.M detectada por la espectrometría discutida más adelante. Mediante la cuantificación del gel (**Tabla 1**) se corroboró los resultados de la CLAR-FR donde p7 corresponde al componente mayoritario de la F19. La electroforesis es una técnica ampliamente utilizada en la separación de proteínas y depende de las M.M, cargas y estructuras 3D de estas, las cuales se encuentran bajo la influencia de un campo eléctrico que las hace migrar hacia el cátodo o ánodo dependiendo de su carga.

La determinación de la M.M de las proteínas que conforman los picos aislados de F19, se realizó mediante espectrometría de masas con un Qtrap (**Gráfica 4**). La espectrometría de masa permite la obtención de iones a partir de moléculas orgánicas en fase gaseosa. Estos son separados de acuerdo a su masa y carga por la manipulación de campos electro-magnéticos. Los iones separados son detectados y la señal m/z es enviada a un sistema de datos computacional. Por lo que la presencia y abundancia en el espectro de determinados tipos de iones, será función de la estructura química de cada compuesto. En este ensayo se determinó que F19 está compuesta

por lo menos por diez proteínas cuyas M.M son: 8157,5; 7780,8; 6556,6; 6096,5; 6058,6 - 6058,4; 6042,5 - 6042,3; 3958,2; 3973,9; 3905,1 y 3845,6 Da.

En este trabajo se observó que la línea celular Neuro-2a cambia su morfología dependiendo del porcentaje de concurrencia en el que se encuentre (**Figura 11**). A fin de determinar si la causa del cambio fue por una diferenciación morfológica, las células que cambiaron su morfología hacia una forma redondeada se repicaron y dejaron crecer hasta un porcentaje de concurrencia < 40 %. Se observó que estas células no perdieron su morfología inicial neuronal típica. Esto demostró que no había ocurrido una diferenciación celular en Neuro-2a como se ha descrito para otras líneas cancerígenas de neuroblastomas (Biedler y col., 1973; Pogorelaya y col., 1985; Constantinescu y col., 2007). En los neuroblastomas la extensión del citoplasma junto a las neuritas les permite tener mayor probabilidad de captación de recursos del medio de cultivo (aa, nutrientes, factores de crecimientos, etc.) para su sobrevivencia. Una alta concurrencia de las células generó la disminución de la prolongación de sus neuritas por el exiguo espacio circundante y por ende una menor probabilidad en la captación de los recursos necesarios.

La formación de aglomerados celulares o domos se ha descrito principalmente en las líneas celulares cancerígenas. Esta puede ser inducida por el uso de distintas toxinas, enzimas, virus (McGrath, 1971; McGrath y col., 1972; Zucchi y col., 2002; Lever, 1979; Rizzino y col., 1982;) o por la presencia de genes específicos (Zucchi y col., 1998; Watari y col., 1996). En la línea Neuro-2a, se observó la formación de domos (**Figura 11**). Esta parece requerir de la expresión simultánea de varias funciones como la presencia de conexiones estrechas entre las células, disminución en la

adherencia al sustrato y una actividad secretora o función de bombeo causando la acumulación de líquido dentro del domo (Leighton y col., 1970; Rizzino y col., 1982). Se presume que los domos permiten a la célula “defenderse” de factores externos que puedan agredir su integridad. Se ha descrito que la formación de domos o aglomerados celulares es inducida por distintas drogas (McGrath, 1971; Fatini y col., 1986; Lever, 1979) y es por eso que se estudió si la formación de domos se ve afectada por F19 o p7 (**Gráfica 5**). Estos resultados demostraron que F19 disminuye la formación de los domos en esta línea celular durante las 5, 7 y 9 h de exposición, p7 mantiene el mismo porcentaje de domos en comparación al control y a las 24 h con F19 se limita su efecto. Por lo que un componente distinto a p7 o de forma conjunta F19, induce la formación de domos en estas células. Entre las proteínas asociadas a la formación de domos descritas en otras líneas celulares cancerígenas se encuentran la PGE2 (Hagiwara y col., 1983), la E-cadherina que interactúa con moléculas del citoplasma a través de la cateninas y la citoqueratina 8 frecuentemente asociada con estructuras tubulares en otros órganos (Kasper y col., 1991; Holt y col., 1994; Ozawa y col., 1989).

La presencia de al menos dos nucléolos en las Neuro-2a (**Figura 11**) son un indicativo de una demanda alta en la biogénesis ribosomal, lo cual es característico de las células altamente proliferativas. Esto permite a las células y neo-células asegurar que tengan los complementos necesarios para su sobrevivencia y su mecanismo fisiológico. El aumento en la síntesis protéica se debe principalmente a modificaciones en los genes supresores de tumores o a la presencia de protooncogenes, responsables de la proliferación incontrolada (Busch y Smetana., 1970; Hadjiolov, 1985; De-

renzini y Ploton 1991; Conlon y Raff 1999; Thomas, 2000; Volarevic y col., 2000; David-Pfeuty, 2006; Sulic' y col., 2005). Por otro lado algunos autores han demostrado que hipertrofias con nucléolos prominentes es un parámetro predictivo de la presencia de una neoplasia (Derenzini y col., 2009), de allí la importancia de los estudios de las variaciones morfológicas.

El efecto anticancerígeno de F19 sobre Neuro-2a, se evaluó inicialmente a través del ensayo colorimétrico con MTT, el cual ofrece una medida rápida, simple y precisa de la viabilidad celular y proliferación de células adherentes (Mosmann, 1983; Scudiero y col., 1988). Se basa en la capacidad de las células viables en reducir la sal de tetrazolium, sustrato amarillo, a cristales de formazán de color azul-oscuro, a través de la acción de la succinato-deshidrogenasa mitocondrial de las células viables. Por lo que a mayor absorbancia mayor es el porcentaje de células viables. Las Neuro-2a al ser expuestas durante 24 h a F19, disminuyeron su viabilidad de manera dosis dependiente (**Gráfica 6**). La curva de dosis-respuesta evidenció que una concentración de 0,71 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ induce el 50 % de muerte en Neuro-2a. El CI_{50} 0,71 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ obtenido para F19 es menor que el de CI_{50} inducido por nanopartículas de CuO (20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) sobre la misma línea celular (Perreault y col., 2012) y menor al de otras toxinas de escorpiones utilizadas en otras líneas celulares cancerígenas (Díaz-García y col., 2013). Hay que destacar, que los ensayos de citotoxicidad con MTT proporcionan una medida de la actividad metabólica, lo cual está íntimamente relacionado con el número de células viables, pero no proporciona información acerca del porqué ni cómo mueren las células.

Para la comparación de resultados, fue importante conocer si el número total de células variaba en función de las condiciones experimentales. Por ello se cuantificó el número de células totales por campo en tiempos crecientes de exposición a F19 y p7 (**Gráfica 7**). La variación del número total de células en todas las condiciones sugirió un error en el sembrado de las células sobre los cubreobjetos. Este error se logró corregir al estandarizar el protocolo de sembrado. Al momento de sembrar las células en los cubreobjetos, estos se movilizaban inmediatamente a la incubadora y se esperaba 20 min antes de colocar el medio, lo que ocasionaba la movilización de la gota conteniente de las células hacia la superficie circundante del cubreobjeto por la disminución de su tensión superficial y por ende disminuyendo el número de células/área contenidas en este. Esto se modificó esperando los 20 min de adhesión de las células al sustrato dentro de la campana flujo laminar sin la movilización del cubreobjeto a la incubadora. Además fue tomado en cuenta en la descripción de los resultados posteriores, los cuales fueron reportados como porcentaje para que pudieran ser comparables entre si.

Para estudiar el mecanismo mediante el cual F19 indujo la muerte en la línea celular de neuroblastoma, se utilizó el ensayo de NA/BE. Este ensayo permitió identificar las células apoptóticas y necrosadas a través de la absorción diferencial de los colorantes en las células viables y no viables, pues el NA es permeable y se incorpora en todas las células, mientras que el BE es impermeable y sólo penetra en aquellas células con ruptura en su membrana. Por lo que las células en apoptosis temprana presentaron una coloración verde brillante con un máximo de emisión del NA a 525 nm, por la unión al ADN condensado; mientras que las células necrosadas se

muestran de color rojizo por la entrada del BE dada la ruptura de su membrana celular y se diferencian de las células en apoptosis tardía que presentan la cromatina condensada y/o fragmentación nuclear.

Se estudió el efecto de la concentración de F19 (**Gráfica 8**) y p7 (**Gráfica 9**) durante 5 h de exposición en el porcentaje de muerte celular (apoptosis y necrosis) de Neuro-2a. El rango de concentraciones estudiadas no causó un aumento significativo en la proporción de muerte celular. Era de esperarse que concentraciones próximas a 0,71 µg/µL ocasionaran el 50 % de muerte celular, sin embargo dado que el CI_{50} fue calculado a las 24 h de exposición, probablemente 5 h no fue el tiempo óptimo para observar el efecto de las toxinas. Por esto, se ensayaron distintos tiempos de exposición con F19 y p7. Por otro lado, se debe tener en cuenta que en el ensayo con MTT se cuantifica la proporción de muerte total producida durante las 24 h de exposición de todas las células contenidas en el pozo, mientras que en el ensayo de NA/BE sólo se cuantifica la proporción de muerte (apoptosis o necrosis) de las células que aún se encuentren adheridas al sustrato.

De igual forma se estudió el efecto de la concentración de F19 y p7 en el porcentaje de apoptosis (**Gráfica 10**) y de necrosis (**Gráfica 11**) pero aumentando el tiempo de incubación durante 7 h. Los resultados mostraron que aunque se observó un aumento dosis dependiente, sólo fue significativo con p7 a la mayor concentración estudiada, sin embargo no se observó lo esperado ya que sólo inducía 1 % de muerte por apoptosis aproximadamente. Razón por la cual se siguió estudiando tiempo mayores a 7 h.

Los resultados del efecto de la variación del tiempo de exposición a F19 y p7 (**Gráfica 12**) demostraron que el efecto apoptogénico se ve pronunciado a las 7 h sobre los neuroblastomas. El efecto causado por p7 fue más pronunciado que el de F19, probablemente porque p7, componente activo y mayoritario de F19, se encuentra en mayor porcentaje de pureza y ejerce un efecto más potente a la misma concentración usada para F19. En el resto de los tiempos no se observó un efecto significativo en la inducción de muerte celular, indicando que las 5, 9 y 24 h no son óptimas para estudiar el efecto anticancerígeno en este tipo de células. Era de esperarse que a partir de las 7 h, el índice de muerte de celular siguiera aumentando en función del tiempo. Se presume que la disminución de la proporción de muerte a las 9 y 24 h en comparación a las 7 h sea por: (1) necrosis secundaria, lo que explicaría la presencia de los restos celulares observados en estas condiciones o (2) el desprendimiento de las células al sustrato, característico de las células adherentes no viables, bien sea por la aberración de proteínas adherentes u otras anomalías desarrolladas en el proceso de muerte celular. Si fue por desprendimiento, las células flotantes no pudieron ser cuantificadas ya que fueron retiradas junto al medio de cultivo al momento de añadirle el NA/BE.

A través del mismo ensayo se estudió el efecto apoptogénico de los distintos componentes de F19 a $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ durante 7 h de exposición (**Gráfica 14**). Estos resultados demostraron que el componente mayoritario de F19, p7, es el componente responsable de la actividad apoptogénica en las Neuro-2a, mientras que p4 pareciera ser el responsable de la muerte por necrosis o que esta es inducida por la actividad sinérgica de todos los componentes de F19 (**Gráfica 15**).

Cabe destacar que los lisosomas de las células Neuro-2a intensificaron su coloración a rojo brillante cuando se expusieron durante 7 y 9 h a F19 y p7 (**Figura 16**). Esta diferencia de coloración puede deberse a que el NA al ser internalizado es atrapado en los lisosomas donde a pH ácidos es protonado exhibiendo un máximo de emisión de 650 nm (color rojizo). Un cambio en la coloración de los lisosomas indica por ende, una variación en el pH intracelular en estos compartimientos. En la formación de los lisosomas, el pH interno varía inicialmente entre 6 y 7. Cuando van madurando, su pH se acidifica alcanzando valores entre 4 y 5, aumentan la concentración de proteasas activas que cumplen con la función degradativa, característica de los lisosomas. Por lo que el cambio en la coloración es un indicativo de la activación lisosomal. La intensidad de la coloración rojiza mostrada en los lisosomas se cuantificó como la DOI (**Gráfica 16**). Se demostró que p7 y de forma menos pronunciada F19, indujeron la activación de los lisosomas de las Neuro-2a a las 7 h de exposición. Lo que sugiere que la activación de los lisosomas está involucrada directa o indirectamente en la activación de procesos degradativos y posiblemente implicados en el proceso de muerte celular en estas células, pues la mayor proporción de muerte celular con F19 y p7 se observó a las 7 h de exposición (**Gráfica 12**). Distintas drogas han sido descritas como iniciadoras de muerte celular a consecuencia de su acumulación en los compartimientos endo-lisosomales en líneas celulares cancerígenas. En la línea de neuroblastoma (SHSY-5Y) se demostró que la inducción de muerte celular es consecutiva a la acumulación de la droga ($A\beta$ -42) en el sistema endo-lisosomal, los cuales presentaron daño en su estructura, liberación de enzimas, acumulación de vacuolas autofágicas y degradación del núcleo conllevando la muerte de las células

(Soura y col., 2012). De manera similar la crotamina, pequeño polipéptido, aislado del veneno de la serpiente de *C. durissus* ejerce su actividad apoptogénica. La crotamina a bajas concentraciones, en células altamente proliferativas, es reclutada vía endocitosis y se acumula en las vesículas endo-lisomales, lo que causa la irrupción de estas, acompañada de la liberación de cistein-catepsinas y un aumento en la actividad de caspasas en el citoplasma lo que activa los procesos de muerte celular programada (Hayashi y col., 2008). Este mecanismo intracelular de muerte ha sido descrito por otros autores en distintas líneas cancerígenas y distintas toxinas, en el cual la PML puede inducir muerte celular vía caspasa dependiente o caspasa independiente (Guicciardi y col., 2004; Stoka y col., 2005; Ka°gedal y col., 2005; Boya y Kroemer, 2008).

Los resultados de la inmunocitoquímica (**Gráfica 17, 18 y 19**) revelaron que la muerte celular inducida por F19 es vía caspasa dependiente pues se observó el aumento de la fluorescencia de la caspasa 3, caspasa ejecutora. Al activarse el zimógeno de caspasa 3, se activa la cascada de caspasas como las caspasa 6, 7 y 9, responsables de la ejecución de la apoptosis y de la mayoría de sus características morfológicas. En el inicio de apoptosis, la caspasa 3 escinde proteolíticamente a PARP en el enlace Aspartato-216/Glicina-217 y cliva proteínas de unión de esteroides junto a la membrana celular (Nicholson y col., 1995; Cabrera y col., 2011). Sin embargo no se observó un aumento significativo de la caspasa 8, esta podría estar inhibida por metilación al nivel del genoma (gen CASP8), como se ha descrito en otras líneas celulares de neuroblastomas (Teitz y col., 2001; Casciano y col., 2004). Tampoco se evidenció el incremento de la fluorescencia del citocromo c, lo que permite inferir que

a las 7 h no se ha activado la vía intrínseca mitocondrial, sin embargo se incrementó la proteína Bcl-2, una proteína antiapoptótica, perteneciente a la familia de proteínas Bcl-2. Esta previene la apoptosis, por dos mecanismos principales: (1) secuestrando caspasa o (2) previniendo la liberación de proteínas apoptogénicas mitocondriales, como AIF o citocromo c, al citoplasma, las cuales pueden activar la cascada de caspasas induciendo apoptosis. El segundo mecanismo concuerda con los resultados observados, ya que no se evidenció el aumento significativo del citocromo c. Cabe destacar que la iniciación de la apoptosis no es un proceso irreversible, si no es equilibrio entre proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas lo que regula dicho mecanismo y se convierte en irreversible cuando las rutas de regulación a través de las proteínas anti-apoptóticas se ven disminuidas por el incremento de las proteínas proapoptóticas.

A fin de estudiar si F19 y su componente mayoritario tenían efecto citotóxico en células sanas, se estudió su efecto sobre cultivos primarios de neuronas del hipocampo (**Gráfica 20, 21 y 22**). Los resultados demuestran que F19 tiene un efecto apoptogénico dosis-dependiente y es más potente que p7 en estas células, ya que el porcentaje de apoptosis de p7 se mantuvo semejante al control, lo cual indica que algún componente de F19 distinto a p7 tiene actividad sobre estas células sanas, confirándole a p7 ventaja como droga anticancerígena, ya que es p7 el componente que tiene mayor efecto apoptogénico en los neuroblastomas estudiados.

La exposición de F19 como de p7 a las 5 h produjo una disminución de la longitud de las neuritas en estas células (**Gráfica 22**). Las neuritas permiten la adherencia a sustratos, intercambio químico y una vez ya maduras, la formación de sinapsis. La disminución de su longitud, tendrá como consecuencia la disminución de esas funcio-

nes. Distintas toxinas han sido descritas por ejercer una disminución en la longitud de las neuritas en distintas neuronas (Lee y col., 2014; Griggs y col., 2014; Ferguson y Audersirk, 1990; Scheneider y col., 2003) y en neuroblastomas (Zargan y col., 2011b). Esto se puede transpolar a lo que ocurre con las Neuro-2a al estar en confluencia (> 80 % de concurrencia) donde comienzan a adquirir una forma redondeada, exigua prolongación de neuritas, desprendimiento al sustrato y su consecutiva muerte. Lo que sugiere que la muerte celular en las Neuro-2a por la exposición de F19 o p7 puede ser un evento inicializado por la disminución de sus neuritas. A menudo las neuritas están empaquetadas en haces de microtúbulos, cuyo crecimiento está estimulado por el NGF, así como las proteínas tau (relacionadas a la unión de microtúbulos y estabilización del citoesqueleto neuronal) y proteínas MAP 1 y MAP2 (asociadas a la estabilización de los microtúbulos). El crecimiento de las neuritas es inducido por la combinación de dos moléculas de N-CAM y el receptor del NGF lo que estimula la actividad de la TK del receptor induciendo el incremento de la neurita (Bear y col., 2006). Se podría pensar que F19 y p7 generan una anomalía en la disposición de los microtúbulos u otras proteínas asociadas a la morfología de las neuritas y su crecimiento o bien es una consecuencia de la inducción de muerte en estas células. Además se demostró que F19 tiene mayor potencia que p7 al disminuir la longitud de las neuritas, lo cual es ventajoso para p7 como droga anticancerígena ya que actualmente muchas drogas utilizadas en quimioterapia tienen un efecto secundario no deseado en pacientes con distintos tipos de cánceres. Con estos resultados se infiere que un componente distinto a p7 induce la disminución de la longitud de las

neuritas, por lo que sería interesante estudiar el efecto de todos los componentes de F19 sobre estas neuronas de hipocampo.

En conclusión, en este estudio se demostró que el veneno de *T. discrepans* contiene otra toxina, distinta a las Neopladinas, con actividad apoptogénica sobre neuroblastomas. Esta toxina, p7, es el componente activo principal de F19, fracción aislada del veneno por CLAR-FR. El p7 ejerce su acción apoptogénica en un tiempo óptimo de 7 h y no tiene un efecto significativo en neuronas de hipocampo. Se presume que dicha actividad, es mediada a través de la PML, lo cual induciría la liberación de distintas proteasas que de manera caspasa dependiente inducen la muerte celular del neuroblastoma.

CONCLUSIONES

1. La CLAR-FR es un método efectivo en la separación de los componentes en este veneno.
2. El perfil cromatográfico del veneno de *T. discrepans* es similar a otros perfiles del mismo veneno, demostrando su reproducibilidad.
3. La línea celular Neuro-2a cambia su morfología dependiendo del porcentaje de concurrencia en el cual se encuentre.
4. El veneno de *T. discrepans* tiene tres componentes con actividad anticancerígena sobre la línea celular Neuro-2a: F1, F19; F36.
5. p7, componente mayoritario de F19, es el único componente responsable de la actividad apoptogénica sobre Neuro-2a.
6. La mayor actividad apoptogénica se evidenció a las 7 h de exposición a las Neuro-2a con F19 y p7, tiempo el cual ocurre la activación de los lisosomas, lo que sugiere que estos implicados en el mecanismo de acción apoptogénico el cual es caspasa dependiente.
7. La F19 disminuye la formación de domos en Neuro-2a mientras que p7, por sí solo, no induce efecto sobre estos.
8. F19 tiene actividad apoptogénica sobre neuronas de hipocampo, mientras que p7 no tiene actividad apoptogénica por sí solo, sin embargo ambos inducen la disminución de la longitud de las neuritas pero F19 con mayor potencia.

BIBLIOGRAFÍA

- Arcangeli, A., Crociani, O., Lastraioli, E., Masi, A., Pillozzi, S., Becchetti, A. 2010. Targeting ion channels in cancer: a novel frontier in antineoplastic therapy. *Curr. Med. Chem.* **16**: 66–93.
- Barker, S. E., Grosse, S. M., Siapati, E. K., Kritz, A., Kinnon, C., Thrasher, A. J., Hart, S. L. 2007. Immunotherapy for neuroblastoma using syngeneic fibroblasts transfected with IL-2 and IL-12,1. *Brit. J. Cancer.* **97**: 210–217.
- Batista, C., D'Suze, G., Gómez-Lagunas, F., Zamudio, F., Encarnación, S., Sevcik, C., Possani, L. 2006. Proteomic analysis of *Tityus discrepans* scorpion venom and amino acid sequence of novel toxins. *Proteomics.* **6**: 3718–3727.
- Batista, C., del Pozo, L., Zamudio, F. Z., Contreras, S., Becerril, B., Wanke, E., Possani, L. D. 2004. Proteomics of the venom from de Amazonian scorpion *Tityus cambridgei* and the role of prolines on mass spectrometry analysis of toxins. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* **803(1)**: 55-66.
- Bear, M. F., Connors, B. W., Paradiso, M. A. 2006. Neuroscience, Exploring the Brain. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. Tercera Edición. ISBN 0-7817-6003-8.
- Biedler, J. L., Helson, L., Spengler, B. A. 1973. Morphology and Growth, Tumorigenicity, and Cytogenetics of Human Neuroblastoma Cells in Continuous Culture. *Cancer Res.* **33**: 2643-2652.

- Bivik, C. A., Larsson, P. K., K°agedal, K. M., Rosdahl, I. K., Öllinger, K. M. 2006. UVA/B-induces apoptosis in human melanocytes involves translocation of cathepsins and Bcl-2 family members. *J. Invest. Dermatol.* **126**: 119-1127.
- Bloch, M., Ousingsawat, J., Simon, R., SchramL, P., Gasser, T. C., Mihatsch, M. J., Kunzelmann, K., Bubendorf, L. 2007. KCNMA1 gene amplification promotes tumor cell proliferation in human prostate cancer. *Oncogene.* **26**: 2525–2534.
- Borges, A., Arantes, E. C., Giglio, J. R. 1990. Isolation and characterization of toxic proteins from the venom of the Venezuelan scorpion *Tityus discrepans* (Karsch). *Toxicon.* **28(9)**: 1011-1017.
- Borges, A., García, C. C., Lugo, E., Alfonzo, M. J., Jowers, M. J. 2006. Diversity of long-chain toxins in *Tityus zulianus* and *Tityus discrepans* venoms (Scorpions, Buthidae): molecular, immunological, and mass spectral analyses. *Comp. Biochem. Physiol.* **142C**: 240-252.
- Boya, P., Kroemer, G. 2008. Lysosomal membrane permeabilization in cell death. *Oncogene.* **27**: 6434–6451.
- Brazón, J., D'Suze, G., D'Errico, M., Arocha-Piñango, C. L., Guerrero, B. 2009. Discreplaminin, a plasmin inhibitor isolated from *Tityus discrepans* scorpion venom. *Arch Toxicol.* **83**: 669–678.
- Brazón, J., Guerrero, B., Arocha-Piñango, C., Sevcik, C., D'Suze, G. 2008. Effect of *Tityus discrepans* scorpion venom on global coagulation test. Preliminary studies. *Invest Clin.* **49(1)**: 49-58.

- Brazón, J., Guerrero, B., D'Suze, G., Sevcik, C., Arocha-Piñango, C. 2013. Anticoagulant and factor Xa-like activities of *Tityus discrepans* scorpion venom. *Acta Toxicol. Argent.* **21(1)**: 26-32.
- Brazón, J., Guerrero, B., D'Suze, G., Sevcik, C., Arocha-Piñango, C. 2014. Fibrin(ogen)olytic enzymes in scorpion (*Tityus discrepans*) venom. *Comp. Biochem. Physiol.* **168B**: 62–69.
- Broker, L. E., Huisman, C., Span, S. W. 2004. Cathepsin B mediates caspase-independent cell death induced by microtubule stabilizing agents in non-small cell lung cancer cells. *Cancer Res.* **64**: 27-30.
- Brunk, U. T., Svensson, I. 1999. Oxidative stress, growth factor starvation and Fas activation may all cause apoptosis through lysosomal leak. *Redox Rep.* **4**: 3-11.
- Busch, H., Smetana, K. 1970. The Nucleolus. New York, Academic Press.
- Cabrera, J. R., Bouzas-Rodriguez, J., Tauszig-Delamasure, S., Mehlen, P. 2011. RET modulates cell adhesion via its cleavage by caspase in sympathetic neurons. *J. Biol. Chem.* **286**: 14628-14638.
- Casciano, I., Banelli, A., Croce, A., De Ambrosis, B., Di Vinci, B., Gelvi, A., Pagnan, A. 2004. Caspase-8 Gene Expression in Neuroblastoma. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1028**: 157–167.
- Calvete, J. J. 2014. Consideraciones sobre la interpretación de espectros de masas Manual de Proteómica (Corrales F, Calvete JJ, eds) DL: NA 1462-2014, Capítulo 8, pp. 173-186 .

- Céard, B., De Lima, M. E., Bougis, P. E., Martin-Eauclaire, M. F. 1992. Purification of the main beta-toxin from *Tityus serralatus* scorpion venom using high-performances liquid chromatography. *Toxicon*. **30 (1)**: 105-110.
- Česen, M. H., Pegan, K., Spes, A., Turk, B. 2012. Lysosomal pathways to cell death and their therapeutic applications. *Exp. Cell Res*. **318**: 1245–1251.
- Chippaux, J. P., Goyffon, M. 2008. Review: Epidemiology of scorpionism: A global appraisal. *Acta Tropica*. **107**: 71–79.
- Conlon, I., Raff, M. 1999. Size control in animal development. *Cell*. **96**: 235–244.
- Constantinescu, R., Constantinescu, A. T., Reichmann, H., Janetzky, B. 2007. Neuronal differentiation and long-term culture of the human neuroblastoma line SH-SY5Y. *J Neural Transm*. **72**: 17–28.
- Cui, Y., Liu, Y., Chen, Q., Zhang, R., Song, Y., Jiang, Z., Wu, C., Zhang, J. 2010. Genomic cloning, characterization and statistical analysis of an antitumoranalgesic peptide from chinese scorpion *Buthus martensii* Karsch. *Toxicon*. **56**: 432–439.
- David-Pfeuty, T. 2006. The flexible evolutionary anchorage-dependent Pardee's restriction point of mammalian cells: how its deregulation may lead to cancer. *Biochim Biophys Acta*. **1765**: 38–66.
- de Duve, C. 1959. Lysosomes, a new group of cytoplasmic particles. En: Sub-cellular Particles. Editor: Hayashi, T. New York: The Ronald Press Co., 128 – 159.

- DeBin, J. A, Strichartz, G. R. 1991. Chloride channel inhibition by the venom of the scorpion *Leiurus quinquestriatus*. *Toxicon*. **29**:1403–1408.
- Derenzini, M., Montanaro, L., Treré, D. 2009. What the nucleolus says to a tumour pathologist. *Histopathology*. **6**: 753-762.
- Derenzini, M., Ploton, D. 1991. Interphase nucleolar organizer regions in cancer cells. *Int Rev Exp Pathol*. **32**: 149–192.
- Deshane, J., Garner, C. C., Sontheimer, H. 2003. Chlorotoxin inhibits glioma cell invasion via matrix metalloproteinase-2. *J. Biol. Chem*. **278**: 4135–4144.
- Díaz, P., D'Suze, G., Salazar, V., Sevcik, C., Shannon, J. D., Sherman, N. E., Fox, J. W. 2009. Antibacterial activity of six novel peptides from *Tityus discrepans* scorpion venom. A fluorescent probe study of microbial membrane Na⁺ permeability changes. *Toxicon*. **54**: 802- 817.
- Díaz-García, A., Morier-Díaz, L., Frión-Herrera, Y., Rodríguez-Sánchez, H., Caballero-Lorenzo, Y., Mendoza-Llanes, D., Riquenes-Garlobo, Y., Fraga-Castro, J. 2013. In vitro anticancer effect of venom from Cuban scorpion *Rhopalurus junceus* against a panel of human cancer cell lines. *J Venom Res*. **4**: 5-12
- Diego-García, E., Schwartz, E., D'Suze, G., Román-González, S., Batista, C. V. F., García, B. I., Rodríguez de la Vega, R., Possani, L. D. 2007. Wide phylogenetic distribution of Scorpine and long-chain β KTx-like peptides in scorpion venoms: identification of "orphan" components. *Peptides*. **28**: 31-37.

- Diego-García, E., Batista, C. V. F., García, B. I., Lucas, S., Candido, D. M., Gómez-Lagunas, F., Possani, L. D. 2005. The Brazilian scorpion *Tityus costatus* Karsch: genes, peptides and function. *Toxicon*. **45(3)**: 273-283.
- D'Suze, G., Batista, C. V. F., Frau, A., Murgia, A. R., Zamudio, F. Z., Sevcik, C., Possani, L. D., Prestipino, G. 2004b. Discrepin, A new peptide of the sub-family α -Ktx15, isolated from the scorpion *Tityus discrepans* irreversibly blocks K⁺-channels (IA currents) of cerebellum granular cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **430**: 256-263.
- D'Suze, G., Brazón, J., Sevcik, C., Guerrero, B., Ojeda, A., Arocha, P. 2001. Effect of *Tityus discrepans* venom on the coagulation mechanism. *J. Venom. Anim. Toxins*. **7(2)**: 321.
- D'Suze, G., Castillo, C., Sevcik, C., Brazón, J., Malavé, C., Hernández, D., Zerpa, N. 2015. Scorpionism and Dangerous Scorpion Species in Venezuela. En: Handbook of Toxinology: Scorpion Venoms. DOI 10.1007/978-94-007-6647-1_24-1. Editorial. Springer.
- D'Suze, G., Corona, F., Possani, L. D., Sevcik, C. 1996. High performance liquid chromatography purification and amino acid sequence of toxins from the muscarinic fraction of *Tityus discrepans* scorpion venom. *Toxicon*. **34(5)**: 591-598.
- D'Suze, G., Moncada, S., González, C., Sevcik, C., Aguilar, V., Alagón, A. 2003. Relationship between plasmatic levels of various cytokines, tumour necrosis factor, enzymes, glucose and venom concentration following *Tityus scorpion* sting. *Toxicon*. **41**: 367–375.

- D'Suze, G., Rosales, A., Salazar, V., Sevcik, C. 2010. Apoptogenic peptides from *Tityus discrepans* scorpion venom acting against the SKBR3 breast cancer cell line. *Toxicon*. **56**: 1497–505.
- D'Suze, G., Schwartz, E. F., García-Gomez, B. I., Sevcik, C., Possani, L. D. 2009. Molecular cloning and nucleotide sequence analysis of genes from a cDNA library of the scorpion *Tityus discrepans*. *Biochimie*. **91**: 1010-1019.
- D'Suze, G., Sevcik, C. 2010. Scorpion venom complexity fractal analysis. Its relevance for comparing venoms. *J Theor Biol*. **267(3)**: 405-16.
- D'Suze, G., Sevcik, C., Brazón, J. 2011. Fisiopatología inducida por el veneno de alacranes del género de *Tityus* de Venezuela. En: Emergencias por animales ponzoñosos en las Américas. Eds: D'Suze G., Corzo G, Paniagua J. pp 529. Edición 2011, Impreso por Documaster, SA de CV, México.
- D'Suze, G., Sevcik, C., Corona, M., Zamudio, F. Z., Batista, C., Coronas, F. I., Possani, L. D. 2004a. Ardiscretin a novel arthropod-selective toxin from *Tityus discrepans* scorpion venom. *Toxicon*. **43**: 263–272.
- D'Suze, G., Sevcik, C., Perez, J. F., Fox, J. W. 1997. Isolation and characterization of a potent curarizing polypeptide from *Tityus discrepans* scorpion venom. *Toxicon*. **35(12)**: 1683-1689.
- D'Suze, G., Zamudio, F. Z., Gómez-Lagunas, F., Possani, L. D. 1999. A novel K⁺ channel blocking toxin from *Tityus discrepans* scorpion venom. *FEBS Lett*. **456**: 146–148.

- Elmore, S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* **35(4)**: 495–516.
- Fatini, J., Abadie, B., Tirard, A., Remy, L., Ripert, J. P., el Battari, A., Marvaldi, J. 1986. Spontaneous and induced dome formation by two clonal cell populations derived from a human adenocarcinoma cell line, HT29. *J Cell Sci.* **83**: 235-249.
- Ferguson, C., Audesirk, G. 1990. Effects of DDT and permethrin on neurite growth in cultured neurons of chick embryo brain and *Lymnaea stagnalis*. *Toxic. in Vitro.* **4(1)**: 23-30.
- Festjens, N., Vanden-Berghe, T., Vandenabeele, P. 2006. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochim Biophys.* **1757**: 1371–1387.
- Foghsgaard, L., Wissing, D., Mauch, D. 2001. Cathepsin B acts as a dominant execution protease in tumor cell apoptosis induced by tumor necrosis factor. *J. Cell. Biol.* **153**: 999-1010.
- Forsyth, P., Sevcik, C., Martinez, R., Castillo, C., D'Suze, G. 2012. Bactridine's effects on DUM cricket neurons under voltage clamp conditions. *J. Insect. Physiol.* **58**: 1676–1685.
- Freudlsperger, C., Greten, J., Schumacher, U. 2008. Curcumin Induces Apoptosis in Human Neuroblastoma Cells via Inhibition of *NFkappaB*. *Anticancer Res.* **28**: 209-214.

- Gao, F., Li, H., Chen, Y. D., Yu, X. N., Wang, R., Chen, X. L. 2009. Upregulation of PTEN involved in scorpion venom-induced apoptosis in a lymphoma cell line. *Leukemia Lymphoma*. **50**: 633–641.
- Garcia-Calvo, M., Leonard, R. J., Novick, L., Stevens, S. P., Schmalhofer, W., Kaczorowski, G. J., Garciat, M. L. 1993. Purification, Characterization, and Biosynthesis of Margatoxin, a Component of *Centruroides margaritatus* Venom That Selectively Inhibits Voltage-dependent Potassium Channels. *J. Bio. Chem.* **268(25)**: 18866-18874.
- García-Santos, G., Antolín, S., Herrera, F., Martín, V., Rodríguez-Blanco, J., Carrera, M., Rodríguez, C. 2006. Melatonin induces apoptosis in human neuroblastoma cancer cells. *J. Pineal Res.* **41**: 130–135.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J. M., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V., Dawson, T. M. y colaboradores. 2011. molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ.* **19(1)**: 107-120.
- Golstein, P., Kroemer, G. 2007. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci.* **32**: 37–43.
- González-Sponga, M. A. 1996. Guía para identificar escorpiones de Venezuela. Cuadernos Lagoven. Editorial Arte S.A. Caracas, Venezuela.
- González-Sponga, M. A. 2011. Escorpiones, características, distribución geográfica y comentarios generales. En: Emergencias por animales ponzoñosos en las

Américas. Eds: D'Suze G., Corzo G, Paniagua J. pp 529. Edición 2011, Impreso por Documaster, SA de CV, México.

- Grandinetti, K. B., Spengler, B. A., Biedler, J. L., Ross, R. A. 2006. Loss of one HuD allele on chromosome #1p selects for amplification of the N-myc proto-oncogene in human neuroblastoma cells. *Oncogene*. **25**: 706–712.
- Griggs, A., Agim, Z., Mishra, V., Tambe, M., Director-Myska, A., Turteltaub, K., McCabe, G. 2014. 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) Is Selectively Toxic to Primary Dopaminergic Neurons In Vitro. *Toxicol Sci*. **140(1)**: 179–189.
- Guicciardi, M. E., Deussing, J., Miyoshi, H. 2000. Cathepsin B contributes to TNF-alpha-mediated hepatocyte apoptosis by promoting mitochondrial release of cytochrome c. *J. Clin. Invest.* **106**: 1127-1137.
- Guicciardi, M. E., Leist, M., Gores, G. 2004. Lysosomes in cell death. *Oncogene*. **23**: 2881–2890.
- Gupta, S. D., Debnath, A., Saha, A., Giri, B., Tripathi, G., Vedasiromoni, J. R., Gomes, A. 2007. Indian black scorpion (*Heterometrus bengalensis Koch*) venom induced antiproliferative and apoptogenic activity against human leukemic cell lines U937 and K562. *Leuk Res*. **31**: 817–825.
- Gupta, S. D., Gomes, A., Debnath, A., Saha, A., Gomes, A. 2010. Apoptosis induction in human leukemic cells by a novel protein Bengalin, isolated from Indian black scorpion: through mitochondrial pathway and inhibition of heat shock proteins. *Chem. Biol. Interact.* **183**: 293-303.

- Hadjiolov, A. A. 1985. The nucleolus and ribosome biogenesis. Cell Biology Monographs. Vienna, Springer Verlag. **12**: 1–267.
- Hager, J. W. 2002. A new linear ion trap mass spectrometer. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **16**: 512–526.
- Hagiwara, M., Chen, I., McGonigle, R., Beckman, B., Fisher, J. W. 1983. Erythropoietin production and dome formation by cultured human renal carcinoma cells. *J. Clin. Invest.* **1**: 1252-1262.
- Hans-Jürgen, Rode. 2008. Apoptosis, Cytotoxicity and Cell Proliferation. Editorial Roche Diagnostics GmbH. 4ta edición. Alemania.
- Hayashi, M., D-Nascimento, F., Kerkis, A., Oliveira, V., Oliveira, E., Pereira, A., Baptista, R. 2008. Cytotoxic effects of crostamine are mediated through lysosomal membrane permeabilization. *Toxicon.* **52**: 508–517.
- Hollander, M., Wolfe, D. A. 1973. Nonparametric statistical procedures. Eds. John Wiley y Sans. pp 204-220. USA, New York.
- Holt, C. H., Lemaire, P., Gurdon, J. B. 1994. Cadherin-mediated cell interactions are necessary for the activation of MyoD in *Xenopus* mesoderm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**: 10844–10848.
- Jadhav, U., Vaughn, S. F., Berhow, M. A., Sanjeeva, M. 2007. Iberin induces cell cycle arrest and apoptosis in human neuroblastoma cells. *Int. J. Mol. Med.* **19(3)**: 353–361.

- Jäger, H., Dreker, T., Buck, A., Giehl, K., Gress, T., Grissmer, S. 2004. Blockage of intermediate-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels inhibit human pancreatic cancer cell growth *in vitro*. *Mol. Pharmacol.* **65**: 630–638.
- Jang, S. H., Choi, S. Y., Ryu, P. D., Lee, S. Y. 2011. Anti-proliferative effect of Kv1.3 blockers in A549 human lung adenocarcinoma *in vitro* and *in vivo*. *Eur. J. Pharmacol.* **651**: 26–32.
- Johansson, A. C., Appelqvist, H., Nilsson, C., Kågedal, K., Roberg, K., Öllinger, K. 2010. Regulation of apoptosis-associated lysosomal membrane permeabilization. *Apoptosis.* **15**: 527–540.
- Jolly, C., Morimoto, R. L., Robert-Nicoud, M., Vourch, C. 1997. HSF1 transcription factor concentrates in nuclear foci during heat shock: relationship with transcription sites. *J. Cell Sci.* **110**: 2935–2941.
- Joya, G., D'Suze, G., Salazar, V., Rosales, A., Sevcik, C., Visbal, G., Ferreira, A. T. S., Perales, J. 2011. Scorpion toxins modify phytopathogenic fungus physiology. A possible source of new fungicides. *J. Agric. Food. Chem.* **59**: 6327–6337.
- Kasper, M., Von Dorsche, H., Stosiek, P. 1991. Changes in the distribution of intermediate filament proteins and collagen IV in fetal and adult human pancreas. *Histochemistry.* **96**: 271–277.
- Kågedal, K., Johansson, A., Johansson, U., Heimlich, G., Roberg, K., Wang, S., Jürgensmeier, J., Öllinger, K. 2005. Lysosomal membrane permeabilization during apoptosis – involvement of Bax?. *Int J Exp Pathol.* **86(5)**: 309–321.

- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., Currie, A. R. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*. **26**: 239-257.
- Kirkegaard, T., Jäättelä, M. 2009. Lysosomal involvement in cell death and cancer. *Biochim. Biophys. Acta*. **1**: 746–754.
- Kovarik, F. 2009. Illustrated catalog of scorpions. Part I. Introductory remark; keys to families and genera; subfamily Scorpioninae with keys to *Heterometros* and *Pandinus* species. Editorial Clairon <http://www.factorioforums.com/scorpio/pdf/scorpions-Kovarik-2009.pdf>. [Consulta: 12 marzo 2015].
- Kurz, T., Terman, A., Gustafsson, B., Brunk, U. T. 2008. Lysosomes in iron metabolism, ageing and apoptosis. *Histochem. Cell Biol.* **129**: 389–406.
- Lambert, J. H. 1760. *Photometria, sive de Mensura et Gradibus Luminis, Colorum et Umbrae*. Augsburg, Alemania.
- Lee, M., Colvin, R., Lee, D. 2014. Alterations of Dopaminergic Synapse and Mitochondrial Structure by Parkinson's Disease Toxins. *J Mol Biol & Mol Imaging*. **1**: 2.
- Leighton, J., Estes, J. W., Mansukhani, S., Brada Z. 1970. A cell line derived from normal dog kidney (MDCK) exhibiting qualities of papillary adenocarcinoma and of renal tubular epithelium. *Cancer*. **26(5)**: 1022-1028.
- Lever, J. 1979. Inducers of mammalian cell differentiation stimulate dome formation in a differentiated kidney epithelial cell line (MDCK). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **76(3)**: 1323-1327.

- Liu, Y. F., Hu, J., Zhang, J. H., Wang, S. L., Wu, C. F. 2002. Isolation, purification, and N-terminal partial sequence of an antitumor peptide from the venom of the Chinese scorpion *Buthus martensii Karsch*. *Prep. Biochem. Biotechnol.* **32**: 317–327.
- Liu, Y. F., Ma, R. L., Wang, S. L., Duan, Z. Y., Zhang, J. H., Wu, L. J., Wu, C. F. 2003. Expression of an antitumor-analgesic peptide from the venom of Chinese scorpion *Buthus martensii Karsch* in *Escherichia coli*. *Protein. Expr. Purif.* **27**: 253–258.
- Longart, M., Correa G. 2004. Análisis morfométrico del proceso de diferenciación in vitro de neuronas del hipocampo. *Invest. Clin.* **51(4)**: 501-518.
- Marina, A., Calvete, J. J. 2014 Secuenciación de novo de péptidos mediante espectrometría de masas: ¿cómo interpretar un espectro MS/MS “a mano”? Manual de Proteómica (Corrales F, Calvete JJ, eds) DL: NA 1462-2014, Capítulo 18, pp. 405-425.
- Mazzei de Dávila, C. A., Dávila-Spinetti, D. F., Ramoni-Perazi, P., Donis, H. J., Santiago, J., Villarroel, V., Arata de Bellabarba, G. 2011, Epidemiología, clínica y terapéutica del accidente escorpiónico en Venezuela En: D'Suze G, Corzo G, Pania-gua J. Emergencias por animales ponzoñosos en las Américas. Documaster, SA de CV, México.
- McGahon, A. J., Martin, S. J., Bissonnette, R. P., Mahboubi, A., Shi, Y., Mogil, R. J., Nishioka, W .K., Green, D. R. 1995. The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis in vitro. *Meth. Cell. Biol.* **46**: 172–173.

- McGrath, C. M. 1971. Replication of Mammary Tumor Virus in Tumor Cell Cultures: Dependence on Hormone-Induced Cellular Organization. *J. Natl. Cancer Inst.* **47**: 2.
- McGrath, C. M., Nandi, S., Young, L. 1972. Relationship Between Organization of Mammary Tumors and the Ability of Tumor Cells to Replicate Mammary Tumor Virus and to Recognize Growth-Inhibitory Contact Signals In Vitro. *J. Virol.* **9(2)**: 367-376.
- Melic, A. 1996. El registro fósil de los escorpiones: Entre el agua y la tierra. *Paleo Entomología.* **16**: 93-104.
- Micheau, O., Solary, E., Hammann, A., Martin, F., Dimanche-Boitrel, M. T. 1997. Sensitization of Cancer Cells Treated With Cytotoxic Drugs to Fas-Mediated Cytotoxicity. *J. Natl. Cancer I.* **89(11)**: 783-789.
- Mi-Hyeon, J., Min-Chul, S., In-Sug, K., Hyung-Hwan, B., Yong-Ho, C., Jong-Phill, C. y colaboradores. 2002. Caffeine induces apoptosis in human neuroblastoma cell line SK-N-MC. *J. Korean Med. Sci.* **17**: 674-678.
- Momeny, M., Malehmir, M., Zakidizaji, M., Ghasemi, R., Ghadimi, H., Shokrgozar, M. A., Emami, A. H., Nafissi, S., Ghavamzadeh, A., Ghaffari, S. H. 2010. Silibin *in vitro* in inhibits invasive properties of human glioblastoma U87MG cells through suppression of cathepsin B and nuclear factor kappa B-mediated induction of matrix metalloproteinase 9. *Colloq. Inse.* **21(3)**: 252-60.
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth.* **65**: 55–63.

- Nicholson, D. W., Ali, A., Thornberry, N. A., Vaillancourt, J. P., Ding, C. K., Gallant, M., Gareau, Y. 1995. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature*. **376**: 37-43.
- Oukkache, N., Chgoury, F., Lalaoui, M., Alagón, A., Ghalim, N. 2013. Comparison between two methods of scorpion venom milking in Morocco. *JVATiTD*. **19**: 5.
- Ozawa, M., Barbault, H., Kemler, R. 1989. The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species. *EMBO J*. **8**: 1711–1717.
- Park, S. W., Kim, H. S., Hah, J. W., Jeong, W. J., Kim, K. H., Sung, M. W. 2010. Celecoxib inhibits cell proliferation through the activation of ERK and p38 MAPK in head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Colloq. Inse*. **21(9)**: 823-830.
- Peigneur, S., Sevcik, C., Tytgat, J., Castillo, C., D'Suze, G. 2012. Subtype specificity interaction of bactridines with mammalian, insect and bacterial sodium channels under voltage clamp conditions. *FEBS Journal*. **279**: 4025–4038.
- Perreault, F., Pedroso-Melegari, S., Henning da Costa, C., de Oliveira, A., Rossetto, F., Popovic, R., Matias, G. 2012. Genotoxic effects of copper oxide nanoparticles in Neuro-2A cell cultures. *Sci Total Environ*. **441**: 117–124.
- Polis, G. A. 1990. The biology of scorpions. Stanford University Press.
- Pogorelaya, N., Fomina, A. F., Veselovskii, N. S. 1985. Morphological differentiation of neuroblastoma cells induced by dimethylsulfoxide. UDC 591.881:616-006.487.

- Portt, L., Norman, G., Clapp, C., Greenwood, M. 2011. Anti-apoptosis and cell survival: A review. *Bioch. Biophys. Acta.* **1813**: 238–259.
- Prochnicka-Chalufour, A., Corzo, G., Satake, H., Martin-Eauclaire, M. F., Murgia, A. N., Prestipino, G., D'Suze, G., Possani, L. D., Delepierre, M. 2006. The solution structure of Discrepin, a new K⁺-channel blocking peptide from the sub-family α -KTx15. *Biochemistry.* **45(6)**: 1795 -1804.
- Ramírez-Bello, V., Sevcik, C., Peigneur, S., Tytgat J., D'Suze, G. 2014. Macrophage alteration induced by inflammatory toxins isolated from *Tityus discrepans* scorpion venom. The role of Na⁺/Ca²⁺ exchangers. *Toxicon.* **82**: 61–75.
- Rastogi, R. P., Sinha, R., Sinha, R. P. 2009. Apoptosis: molecular mechanisms and pathogenicity. *EXCLI Journal.* **8**: 155-181.
- Renvoize, C., Biola, A., Pallardy, M., Breard, J. 1998. Apoptosis: identification of dying cells. *Cell. Biol. Toxicol.* **14**: 111–120.
- Repnik, U., Stoka, V., Turk, V., Turk, B. 2012. Lysosomes and lysosomal cathepsins in cell death. *Biochim. Biophys. Acta.* **1824**: 22–33.
- Repnik, U., Turk, B. 2010 Lysosomal-mitochondrial cross-talk during cell death. *Mitochondrion.* **10**: 662–669.
- Rizzino, A., Gonda, M. A., Rapp, U. R. 1982. Dome formation by a retrovirus-induced lung adenocarcinoma cell line. *Cancer Res.* **45**: 1881-1886.
- Roberg, K., K^oagedal, K., O'llinger, K. 2002. Microinjection of Cathepsin D Induces Caspase- Dependent Apoptosis in Fibroblasts. *AJP.* **161(1)**: 89-96.

- Roberg, K., Öllinger, K. 1998. Oxidative stress causes relocation of the lysosomal enzyme cathepsin D with ensuing apoptosis in neonatal rat cardiomyocytes. *Am. J. Pathol.* **152**: 1151-1156.
- Rodríguez de la Vega, R. C., Merino, E., Becerril, B., Possani, L. D. 2003. Novel interactions between K⁺ channels and scorpion toxins. *Trends Pharmacol. Sciences.* **24**: 222- 227.
- Rojas-Runjaic, F. J. M., De Sousa, L. 2007. Catálogo de los escorpiones de Venezuela (Arachnida: Scorpions) *Bol. Soc. Ent. Ara.* **1(40)**: 281–307.
- Sano, J., Nagafuchi, S., Yamazaki, J., Oguma, K., Kano, R., Hasegawa, A. 2005. Effect of antineoplastic drugs on the expression of Bcl-2 and Bcl-xL genes in the feline T-cell leukemia cell line. *Res. Vet. Sci.* **79**: 197–201.
- Schneider, J. S., Huang, F. N., Vemuri, M. C. 2003. Effects of low-level lead exposure on cell survival and neurite length in primary mesencephalic cultures. *Neurotoxicology and Teratology.* **25**: 555–559.
- Schestkova, O., Geisel, D., Jacob, R. 2007. The catalytically inactive precursor of cathepsin D induces apoptosis in human fibroblasts and HeLa cells. *J. Cell. Biochem.* **101**: 1558-1566.
- Schrader, K., Huai, J., Jöckel, L., Oberle, C., Borner, C. 2010. Non-caspase proteases: Triggers or amplifiers of apoptosis?. *Cell Mol. Life Sci.* **67**: 1607–1618.
- Schulte-Hermann, R., Bursch, W., Low-Baselli, A., Wagner, A., Grasl-Kraupp, B. 1997. Apoptosis in the liver and its role in hepato- carcinogenesis. *Cell Biol Toxicol.* **13**: 339-348.

- Schwab, A., Reinhardt, J., Schneider, S. W., Gassner, B., Schuricht, B. 1999. K⁺ channel-dependent migration of fibroblasts and human melanoma cells. *Cell. Physiol. Biochem.* **9**: 126–132.
- Schwab, M., Westermann, F., Hero, B., Berthold, F. 2003. Neuroblastoma: biology and molecular and chromosomal pathology *The Lancet Oncol.* **4**: 472-480.
- Scudiero, D. A., Shoemaker, R. H., Paull, K. D., Monks, A., Tierney, S., Nofziger, T. H. 1988 Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other cell lines. *Cancer Res.* **48**, 4827–4833.
- Song, X., Zhang, G., Sun, A., Guo, J., Tian, Z., Wang, H., Liu, Y. 2012. Scorpion venom component III inhibits cell proliferation by modulating NF-kappa B activation in human leukemia cells. *Exp. Ther. Med.* **4**: 146–150.
- Soroceanu, L., Gillespie, Y., Khazaeli, M. B., Sontheimer, H. 1998. Use of chlorotoxin for targeting of primary brain tumors. *Cancer Res.* **58**: 4871–4879.
- Soroceanu, L., Manning, T. J. Jr., Sontheimer, H. 1999. Modulation of glioma cell migration and invasion using Cl⁻ and K⁺ ion channel blockers. *J. Neurosci.* **19**: 5942–5954.
- Soura, V., Stewars-Parker, M., Williams, T. L., Ratnayaka, J. A., Gorringer, K., Tuffin, J. 2012. Visualization of co-localization in Aβ42-administered neuroblastoma cells reveals lysosome damage and autophagosome accumulation related to cell death. *Biochem. J.* **441**: 579–590.

- Stoka, V., Turk, B., Turk, V. 2005. Lysosomal Cysteine Proteases: Structural Features and their Role in apoptosis. *IUBMB Life*. **57(4/5)**: 347 – 353.
- Sulic , S., Panic, L., Dikic, I., Volarevic, S. 2005. Deregulation of cell growth and malignant transformation. *Croat Med J*. **46**: 622–638.
- Teitz, T., Lahti, J. M., Kidd, K. 2001. Aggressive childhood neuroblastomas do not express caspase-8: an important component of programmed cell death. *J Mol Med*. **79**: 428–436
- Thomas, G. 2000. An encore for ribosome biogenesis in the control of cell proliferation. *Nat Cell Biol*. **2**: E71–E72.
- Tsushima, R. G., Borges, A., Backx, P. H. 1999. Inactivated state dependence of sodium channel modulation by beta-scorpion toxin. *Pflugers Arch*. **437(5)**: 661-668.
- Turk, B., Turk, V. 2009. Lysosomes as ‘suicide bags’ in cell death: myth or reality?. *J. Biol. Chem*. **284**: 21783– 21787.
- Vancompernelle, K., Van Herreweghe, F., Pynaert, G., 1998. Atractyloside-induced release of cathepsin B, a protease with caspase-processing activity. *FEBS Lett*. **438**: 150-158.
- Volarevic, S., Stewart, M. J., Ledermann, B., Zilberman, F., Terracciano, L., Montini, E., Grompe, M. y colaboradores. 2000. Proliferation, but not growth, blocked by conditional deletion of 40S ribosomal protein S6. *Science*. **288**: 2045–2047.
- Wang, W. X., Ji, Y. H. 2005. Scorpion venom induces glioma cell apoptosis *in vivo* and inhibits glioma tumor growth *in vitro*. *J. Neurooncol*. **73**: 1–7.

- Watari, H., Ogiso, Y., Abe, K., Arai, T., Yokoyama, T., Sakai, N., Fujita, H. y colaboradores. 1996. Dome formation induced by v-H-ras oncogene in a human choriocarcinoma cell line. *Placenta*. **17(7)**: 443-449.
- Yuan, X. M., Li, W., Dalen, H. 2002. Lysosomal destabilization in p53-induced apoptosis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. **99**: 6286-6291.
- Zargan, J., Sajad, M., Umar, S., Naime, M., Ali, S., Khan, H. A. 2011a. Scorpion (*Odontobuthus doriae*) venom induces apoptosis and inhibits DNA synthesis in human neuroblastoma cells. *Mol. Cell. Biochem*. **348**: 173–181.
- Zargan, J., Sajad, M., Umar, S., Naime, M., Ali, S., Khan., H. A. 2011c. Scorpion (*Androctonus crassicauda*) venom limits growth of transformed cells (SH-SY5Y and MCF-7) by cytotoxicity and cell cycle arrest. *Exp. Mol. Pathol*. **91**: 447–454.
- Zargan, J., Umar, S., Sajad, M., Naime, M., Ali, S., Khan, H. A. 2011b. Scorpion venom (*Odontobuthus doriae*) induces apoptosis by depolarization of mitochondria and reduces S- phase population in human breast cancer cells (MCF-7). *Toxicol. In. Vitro*. **25**: 1748–1756.
- Zerban, H., Radig, S., Kopp-Schneider, A., Bannasch, P. 1994. Cell proliferation and cell death (apoptosis) in hepatic preneoplasia and neoplasia are closely related to phenotypic cellular diversity and instability. *Carcinogenesis*. **15**: 2467-2473.
- Zhang, F. T., Xu, Z. S., Qi, Y. X. 1987. A preliminary research of the anti-neoplasia effects *in vitro* induced by *Buthus martensii* of Chinese drug-I. Observation of the effect on mice with tumor. *J. Gannan. Med. Coll*. **6**: 1–5.

- Zhang, Y. Y., Wu, L. C., Wang, Z. P., Wang, Z. X., Jia, Q., Jiang, G. S., Zhang, W. D. 2009. Anti-proliferation effect of polypeptide extracted from scorpion venom on human prostate cancer cells in vitro. *J. Clin. Med. Res.* **1**: 24–31.
- Zucchi, I., Bini, L., Albani, D., Valaperta, R., Liberatori, S., Raggiaschi, R., Montagna, C. y colaboradores. 2002. Dome formation in cell cultures as expression of an early stage of lactogenic differentiation of the mammary gland. *PNAS.* **99(13)**: 8661-8665.
- Zucchi, I., Montagna, C., Susani, L., Dulbecco, R. 1998. The rat gene homologous to the human gene 9 –27 is involved in the development of the mammary gland. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**: 1079–1084.
- www.cancer.net/cancer-types/neuroblastoma-childhood/statistics. [Consulta: 23 febrero de 2015].
- www.museumvictoria.com.au/melbournmuseum/discoverycentre/600-million-years/timeline/silurian/eurypterids/. [Consulta: 02 enero de 2015].