

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUIMICA



**CARACTERIZACION ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE UNA TOXINA AISLADA
DEL VENENO DE *Tityus discrepans* CON ACTIVIDAD ANTICANCERIGENA EN LA
LÍNEA CELULAR NEURO2A**

Trabajo Especial de Grado presentado
ante la Ilustre Universidad Central de
Venezuela, por el Br. Jorge A. López G.
para optar al título de Licenciado en
Química

Caracas, Junio 2016

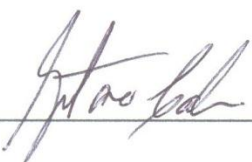
Yo, Dr. Gustavo Cabrera, Profesor Titular de la Escuela de Química de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela y la Dra. Gina D'Suze, Investigador Titular del Laboratorio de Neurofarmacología Celular del Centro de Biofísica y Bioquímica del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas.

Certificamos que, el presente Trabajo Especial de Grado, titulado:

“CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE UNA TOXINA AISLADA DEL VENENO DE *Tityus discrepans* CON ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA EN LA LÍNEA CELULAR NEURO2A”

Que presenta el Br. Jorge López, para aspirar al título de Licenciado en Química, se está realizando en el Laboratorio de Neurofarmacología Celular del Centro de Biofísica y Bioquímica del Instituto Venezolano de Investigación Científica, bajo nuestra dirección, durante los años 2015 y 2016, y con esta fecha autorizamos su presentación.

Caracas, Junio de 2016



Dr. Gustavo Cabrera



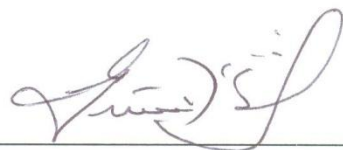
Dra. Gina D'Suze

Los abajo firmantes asignados por la Universidad Central de Venezuela, como integrantes del jurado examinador del Trabajo Especial de Grado titulado: "CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE UNA TOXINA AISLADA DEL VENENO DE *Tityus discrepans* CON ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA EN LA LÍNEA CELULAR NEURO2A". Presentado por el Br. Jorge A. López G., certificamos que este trabajo cumple con los requisitos exigidos por nuestra Magna Casa de Estudio para optar por el título de Licenciado en Química.



Dr. Gustavo Cabrera

Director



Dra. Gina D'Suze

Directora



Katiuska Chávez

Jurado



María Lorenzo

Jurado

RESUMEN

Palabras clave: veneno de escorpión, neuroblastomas, péptidos, cromatografía, actividad biológica.

La búsqueda de sustancias de origen natural con una posible actividad biológica ha sido una actividad recurrente del ser humano a través de su historia. Un ejemplo de esto, es el uso de sustancias como el veneno del escorpión en la medicina tradicional debido a la variedad de componentes biológicamente activos presentes en él. Entre ellos, se han descrito toxinas, específicamente del veneno de *Tityus discrepans*, con actividad anticancerígena. Por esto, en el siguiente trabajo se planteó como objetivo, estudiar y caracterizar la estructura y actividad anticancerígena de una toxina del veneno de *T. discrepans* sobre una línea celular cancerígena (Neuroblastoma).

De las cuarenta fracciones aisladas del veneno a través de CLAR-FR sólo tres de ellas, asignadas como F1, F19 y F36, inducen al menos el 70% de muerte celular. F1 fue repurificada por CLAR-FR y se determinó la presencia de al menos 11 subfracciones. A través de un ensayo con NA/BE se demostró, que todos los componentes poseen actividad anticancerígena similar, la cual depende de la concentración y el tiempo de exposición. Se determinó el tipo de muerte celular mediante tinción con NA/BE, determinándose que esta ocurre por apoptosis.

Se propuso por medio de los análisis espectroscópicos una estructura peptídica en la cual se evidenció la presencia de cuatro aminoácidos, debido a las frecuencias vibracionales observadas en los espectros. Se propuso que los aminoácidos que conforman el compuesto mayoritario de esta fracción serían Valina, Ácido glutámico, Glicina y Arginina en dicho orden. En conclusión, en este estudio se demostró que el veneno de *T. discrepans* contiene una toxina con actividad citotóxica sobre neuroblastomas. Esta toxina, F1, está compuesta por 11 subfracciones aisladas del veneno por CLAR-FR, todas con citotoxicidad semejante. Estas ejercen su acción apoptogénica en un tiempo óptimo de 2,5 h y se propone que la estructura más probable del componente mayoritario de esta fracción es el péptido de secuencia VEGA.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quien ha hecho posible todo esto, a mi madre. Tu quien hizo de mi la persona que soy hoy en día y que me ha dado el apoyo y las herramientas para llegar hasta acá, lo logramos. Te amo más que a nada en este mundo. A Delrosi Porras, Nancy Quintero y todos mis tíos por parte de la familia González. Gracias a ustedes he tenido la oportunidad de ser una persona de bien y un profesional. Su ejemplo es algo que esta vida me ha regalado y atesorare por siempre de cada uno de ustedes. A mi Padre, Ricardo López, y toda mi familia López, que me ha dado todo su apoyo incondicional hasta el último momento. Son los mejores

A mis tutores, Dra. Gina D'Suze y Dr. Gustavo Cabrera, que han dado todo por ayudarme a salir adelante, gracias por su tiempo, paciencia y enseñanzas. A todo el personal del Laboratorio de Neurofarmacología Celular del IVIC, Arnaldo, Patricia, Vanessa, Moisés, Zuleima y estudiantes, Muguete, Mariangel e Hiran. Gracias por todas las enseñanzas y la paciencia. Al señor Víctor por su valioso tiempo y asistencia en el área del estudio celular. Al Dr. Omar Estrada por su apoyo en la caracterización estructural y al desarrollo de esta tesis. A la Lic. Lúgia y al personal del laboratorio de RMN del IVIC, quienes hicieron todos sus esfuerzos hasta último momento para contribuir a este trabajo especial de grado.

A Estefanía Montilla, por estar para mí durante toda mi carrera universitaria siendo una pareja y una compañera única. No hay palabras que describan lo agradecido que estoy con todo lo que me has dado. Gracias

A todos mis compañeros de la carrera, que contribuyeron con su amistad, Génesis, David, Mafer, Rodrigo, Juan, y en especial a Neydimar y Sofía, que me han dado el tesoro tan valioso de poder contar con ustedes en las buenas y en las malas, me han dado su amistad y cariño, gracias. A cada uno de mis profesores, que han hecho de mí un profesional que siempre valorará la academia como un tesoro del cual no deseo alejarme nunca.

Por último, a mis hermanos José, Manuel, Andrés, Luis y Guillermo. Hermanos, gracias por creer en mí, son los mejores. Sin ustedes no lo habría logrado. Gracias

INDICE

	Pag.
Introducción	1
Revisión bibliográfica	2
1. El escorpión y su morfología	2
2. Distribución	4
3. Características del Veneno	6
4. Métodos espectroscópicos para el análisis de proteínas	17
4.1. Resonancia magnética nuclear	17
4.2. Espectroscopía de IR	20
4.3. Espectrometría de masas	21
5. Muerte Celular	22
5.1. Apoptosis	25
5.2. Necrosis	26
6. Neuroblastomas	27
Objetivos	30
Metodología experimental	31
Resultados y discusiones	36

Conclusiones	96
Recomendaciones	97
Referencias	98

INTRODUCCION

El estudio de las sustancias químicas obtenidas a partir de fuentes naturales ha llevado al descubrimiento de nuevos compuestos con utilidad biológica para los seres vivos. Estos han proporcionado una cantidad considerable de derivados con aplicabilidad farmacéutica, entre otras, lo que hace que la inversión en esta área sea de interés dada la posibilidad de desarrollarlos como nuevos compuestos para el tratamiento de enfermedades.

Los escorpiones son un grupo de animales que habitan la tierra desde hace más de 400 millones de años. Al adaptarse a los cambios geoclimáticos que ha sufrido la tierra han mantenido la mayoría de sus características morfológicas exceptuando su tamaño y probablemente la constitución de su veneno. Un par de glándulas situadas en el telson al final de su cola, son las que producen el veneno en estos arácnidos, el cual es una mezcla de agua, sales, pequeñas moléculas, péptidos y proteínas. Venezuela posee la mayor diversidad de especies de escorpiones descritas en Suramérica, 184 en total, de las cuales solo el género *Tityus* reúne 56, y es la especie *Tityus discrepans* la más estudiada.

El veneno de escorpión contiene más de 200 componentes, de los cuales los más estudiados son los activos en canales iónicos, que son los responsables del síndrome de envenenamiento escorpiónico. En la última década se han aislado y caracterizado otros compuestos del veneno con actividades antibacterianas, antimicóticas, anticancerígenas, activos en la hemostasia y curarizantes.

REVISION BIBLIOGRAFICA

El escorpión y su morfología

Los escorpiones pertenecen al Phylum *Arthropoda*, Subphylum *Chelicerata*, clase *Arachnida*, orden *Scorpionida*, con 22 familias y aproximadamente 1.500 especies distribuidas en todo el mundo ^[1]. Se data su existencia desde antes de los 400 millones de años, en ese período han mantenido la mayoría de sus características morfológicas, excepto el tamaño y probablemente la constitución de su veneno ^[2]. Su alimentación está basada en insectos, arañas y algunos crustáceos, también presentan canibalismo. En ocasiones cuando las condiciones no son favorables pueden durar varios meses sin comer.

Los *Buthidae* son la familia de escorpiones más extensa que existe, incluyendo 90 géneros (uno de ellos extinto) y 1011 especies. Se encuentra extensamente distribuida alrededor del mundo, excepto en la Antártida y Nueva Zelanda, sus especies habitan en zonas tropicales, subtropicales y parte en regiones templadas ^[3].

Las características morfológicas más distintivas de la especie *Tityus discrepans* (Td), objeto de estudio (Ilustración 1) son: longitud total de los machos 70.91 mm y las hembras 59.82 mm; longitud del segmento caudal V: machos 9.30 mm y hembras 8.13 mm; segmentos caudales IV y V de color negro y el resto del cuerpo de color castaño rojizo ^[4].

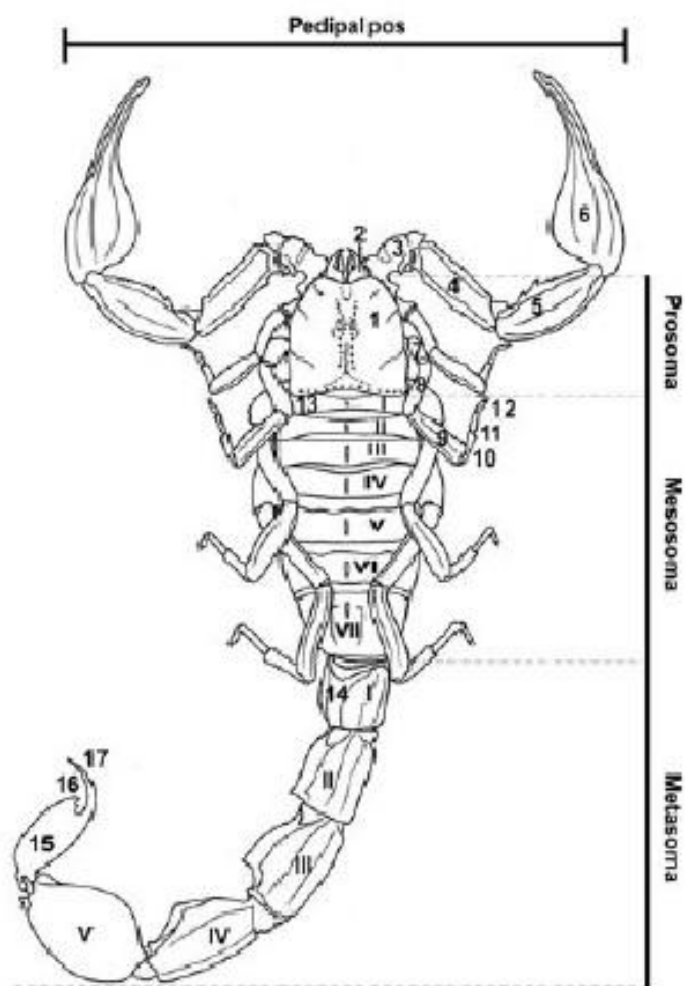


Ilustración 1: Esquema dorsal de la morfología externa de un escorpión ^[4]. (1) Prosoma, (2) Quelíceros, (3) Trocánter del pediplado, (4, 8) Fémur, (5, 9) Tibia, (6) Quela, (7) Trocánter de las patas, (10) Pretarso, (11) Basitarso, (12) Telotarso, (13) Mesosoma (tergitos I a VII), (14) Segmentos caudales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

Distribución

Venezuela ocupa el primer lugar en América del Sur en cuanto a diversidad de especies de escorpiones. Hasta los momentos se han clasificado 184 especies, agrupadas en 5 familias (*Buthidae*, *Chactidae*, *Euscorpiidae*, *Hemiscorpiidae* y *Scorpionidae*) y 17 géneros. De estas, 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) que corresponden al 28,3% de la escorpio-fauna descrita en el país ^[4-5].

El género *Tityus* es exclusivamente neotropical, distribuido desde Panamá hasta Argentina incluyendo algunas islas del Caribe. En Venezuela, se encuentra distribuido a lo largo y ancho del país, específicamente en zonas montañosas o pie de monte con vegetación húmeda (Ilustración 2). La especie *T. discrepans* habita en todo el Distrito Metropolitano abarcando el sistema montañoso de la costa (ramal litoral y del interior) desde el Parque Nacional Henry Pittier hasta el Cabo Codera. Así también los sistemas montañosos de los estados colindantes, Aragua, Vargas, Miranda y el norte del estado Guárico en el Parque Guatopo ^[4]. La toxicidad de sus venenos sumado a la co-distribución con los humanos ha generado la mayoría de los casos graves y letales de emponzoñamiento escorpiónico en el país.

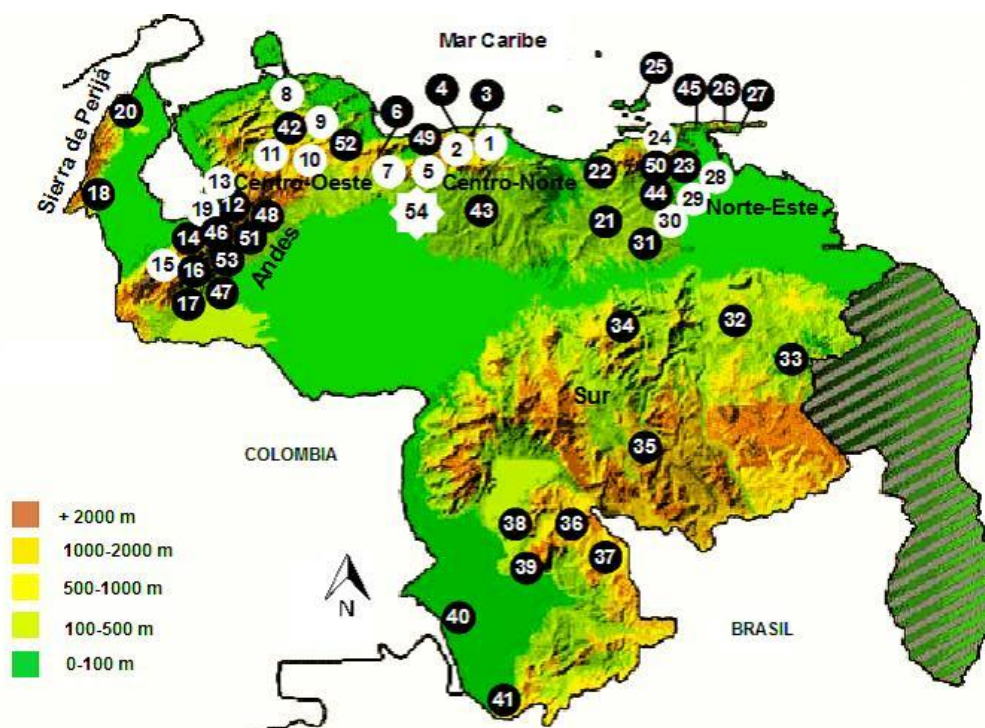


Ilustración 2: Distribución geográfica de las 54 especies del género *Tityus* descritas en Venezuela. Tomado de D'Suze y col., 2015 ^[6]. Los círculos blancos corresponden a las especies involucradas en emponzoñamientos fatales o graves, los círculos negros a las especies venenosas aun no reportadas 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. isabelceiliae*, (3) *T. lancinii*, (4) *T. osmanus*, (5) *T. pittieri*, (6) *T. Rojasi*, (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. riocauensis*, (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. dora*, (53) *T. ahincoi*, (54) *T. clathratus*.

El síndrome de emponzoñamiento escorpiónico es una sintomatología compleja que incluye trastornos neurológicos y cardiovasculares, con complicaciones variadas que incluyen pancreatitis aguda, edema agudo del pulmón, síndrome de dificultad respiratoria por escorpionismo, trastornos de la coagulación y trastornos del balance de citoquinas pro-inflamatorias. El escorpionismo en Venezuela se caracteriza por inducir una respuesta sistémica con variedad de complicaciones, las cuales dependen de la especie de escorpión, de la cantidad de veneno inoculado y de la sensibilidad del afectado. Estos venenos contienen tanto las toxinas responsables del síndrome de envenenamiento escorpiónico como otras inocuas al ser humano ^[6].

Características del veneno

El aparato venenoso de los escorpiones consiste en un par de glándulas unidas, incluidas en el telson, último segmento del post-abdomen o cola. Las glándulas están rodeadas por una capa muscular estriada que facilita y regula la eyección del veneno. Esta habilidad explica en parte la variación de la intensidad de los síntomas y la existencia de emponzoñamientos blancos o secos, es decir, sin la inoculación de veneno. El veneno es una secreción compuesta de proteínas y péptidos de bajo peso molecular, activos la mayoría de ellos sobre canales iónicos de Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , y Cl^- de células excitables y no excitables. Estas neurotoxinas están consideradas entre los venenos más potentes conocidos, su letalidad varía según la especie y algunos autores postulan que dicha variabilidad se debe a la coevolución entre presa y depredador, que ha producido toxinas con alta especificidad según su dieta ^[2,7-8]. Los venenos de escorpión del mismo género tienen componentes similares; las toxinas tienen alto porcentaje de identidad en sus secuencias de aminoácidos, características estructurales y también son antigénicamente muy similares ^[9].

De manera general los componentes tóxicos el veneno son denominados toxinas las cuales varían en naturaleza y cantidad de un escorpión a otro. El veneno contiene además algunas enzimas como metaloproteasas e hialorunidasas, así como toxinas de las que depende la producción de dolor en el sitio de la picadura. Una vez ocurrida ésta, localmente no hay liberación de bradiquinina, histamina ni prostaglandinas ^[10-12]. El grupo de toxinas que han sido más estudiadas son los polipéptidos que reconocen los canales iónicos y receptores en las membranas excitables y no excitables, son perjudiciales para diferentes organismos, incluido el hombre ^[13].

Los péptidos en general, son polímeros lineales de aminoácidos (Ilustración 3). Según la cantidad de enlaces peptídicos que posee y del nivel de complejidad dentro de la estructura, estos pueden clasificarse como polipéptidos o como proteínas. Un enlace peptídico se refiere al enlace formado por el ataque del grupo amino de un aminoácido A al grupo carboxílico del aminoácido B. Dependiendo del sustituyente R enlazado al aminoácido, se definirá el tipo de conformación que poseerá el péptido o la proteína ^[14]. La función que ejercerá cada proteína o polipéptido dependerá de su nivel de organización, la cual es determinada por la secuencia de aminoácidos que la conforman. El nivel de organización se refiere al nivel de complejidad de la proteína. A medida que aumenta el grado de complejidad, se observa la combinación estructural generando arreglos tridimensionales que definen la distribución espacial de la proteína (Ilustración 4).

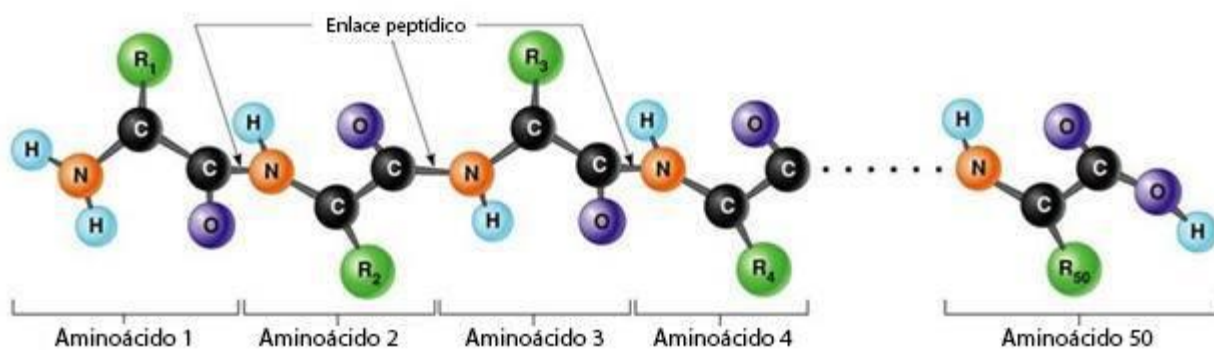


Ilustración 3: Estructura general de un polipéptido

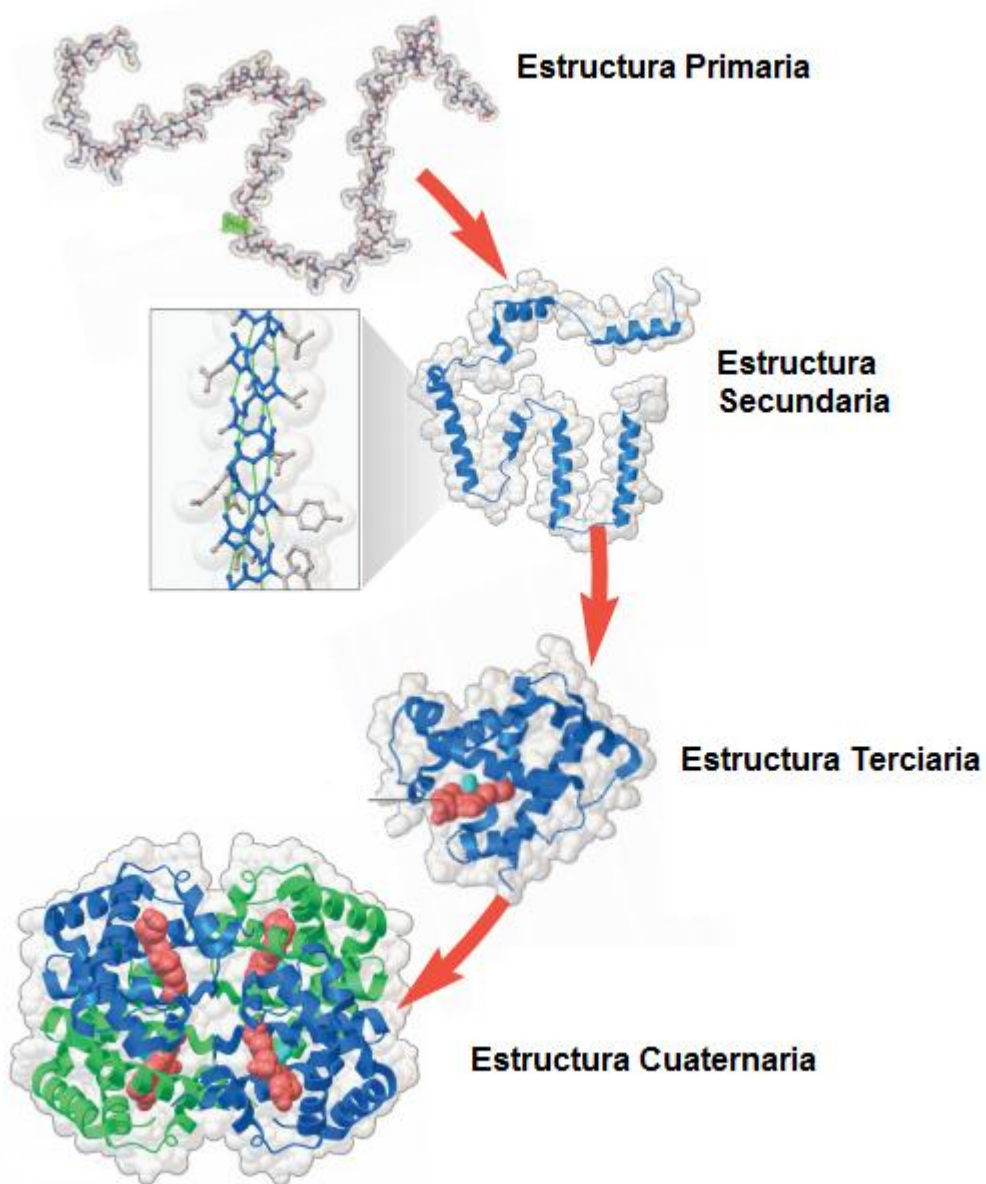


Ilustración 4: Conformación general de un polipéptido

Del género *Tityus* se han aislado y caracterizado funcional y estructuralmente proteínas, en su mayoría de bajo peso molecular, globulares, con una conformación tipo α/β , estructuradas mediante puentes disulfuro. Todas las toxinas específicas activas en canales de Na^+ se componen de 60 a 76 residuos de aminoácidos (aa) estabilizados por cuatro puentes disulfuro. Mientras que las activas en los canales de K^+ se dividen en las de cadena corta conformadas por 31 a 39 aa estabilizadas por tres o cuatro enlaces disulfuro y las de cadena larga conformadas por aproximadamente 80 aa estabilizados por cuatro puentes disulfuro. Las toxinas activas en canales de Na^+ son moduladoras del canal, las activas en canales de K^+ son bloqueadoras de estos canales, todas ellas incluso, las activas en canales de Cl^- , actúan desde la cara extracelular del canal. Las activas en canales de Ca^{2+} actúan algunas desde la parte externa y otras intracelularmente. La clorotoxina, específica para canales de Cl^- , tiene sólo 36 residuos de aminoácidos, pero contiene cuatro puentes disulfuro.

A pesar del hecho de que la estructura primaria de las toxinas de escorpión puede ser muy diferente entre sí, existe un motivo estructural conservado entre estas familias de proteínas, formado por alfa hélices y una hoja beta con 2 a 3 hebras, mantenidos por puentes disulfuro. Algunas excepciones las constituyen la toxina excitatoria de insectos del *Buthotus judaicus*, donde se observaron dos segmentos cortos alfa helicoidales, en lugar de uno y las toxinas lineales sin puentes disulfuros presentes en varias especies de escorpiones ^[15-19]. Se puede observar en la ilustración 5 la conformación de algunas proteínas del grupo de toxinas activas sobre canales de Na^+ . En la Tabla 1 se encuentran reflejados algunos péptidos sin puentes de disulfuros PSPD (NDBP's en inglés) aislados de diferentes especies de escorpiones con su actividad biológica asociada ^{[13], [20-21]}.

Tabla 1. Lista de PSPD funcionalmente caracterizadas con su correspondiente número de aminoácidos, punto isoeléctrico, carga, actividad biológica y especie de escorpión ^[20].

NDBPs	Aminoácidos	Punto Isoelectrico	Carga	Actividad Biológica	Especie de escorpión
Peptido T	13	6.65	0	Potenciador de brandicinina	<i>Tityus serrulatus</i>
K 12	21	6.52	0	Potenciador de brandicinina	<i>Buthus occitanus</i>
Hadrurina	41	11.09	5	Antimicrobial, hemolítico	<i>Hadrurus aztecus</i>
Pandinina 1	44	10.49	4	Antimicrobial, hemolítico	<i>Pandinus imperator</i>
Pandinina 2	24	10.80	3	Antimicrobial, hemolítico	<i>Pandinus imperator</i>
Opistoporina 1	44	10.58	4	Antimicrobial, inmunomodulador, hemolítico	<i>Opistophtalmus carinatus</i>
BmKb 1	18	9.67	1	Antimicrobial	<i>Mesobuthus martensii</i>
BmKn 2	13	9.69	1	Antimicrobial, hemolítico	<i>Mesobuthus martensii</i>
IsCT	13	9.69	1	Antimicrobial, hemolítico	<i>Opistophtalmus carinatus</i>
IsCT2	13	9.69	1	Antimicrobial, hemolítico	<i>Opistophtalmus carinatus</i>
Parabuto porina	45	10.75	7	Antimicrobial, inmunomodulador, hemolítico	<i>Parabuthus schlechteri</i>
Mucroporina	17	9.69	1	Antimicrobial	<i>Lychas mucronatus</i>
Meucin-13	13	9.69	1	Antimicrobial, hemolítico, citolítico	<i>Mesobuthus eupeus</i>
Meucin-18	18	10.80	3	Antimicrobial, hemolítico, citolítico	<i>Mesobuthus eupeus</i>
Imcroporina	17	10.1	1	Antimicrobial, hemolítico, citolítico	<i>Isometrus maculatus</i>
StCT1	14	6.34	0	Antimicrobial, hemolítico	<i>Scorpiops tibetanus</i>
Meucin-24	24	10.96	4	Antimalarial	<i>Mesobuthus eupeus</i>
Meucin-25	25	11.13	4	Antimalarial	<i>Mesobuthus eupeus</i>
Im-1	56	10.82	7	Antimicrobial, hemolítico, citolítico	<i>Isometrus maculatus</i>
HP 1090	13	10.80	2	Antiviral	<i>Heterometrus petersii</i>
Vejovine	47	10.97	4	Antimicrobial, hemolítico	<i>Vaejovis mexicanus</i>
Ctriporina	19	10.80	2	Antimicrobial	<i>Chaerilus tricostatus</i>
BmKbpb	47	10.82	7	Antimicrobial, hemolítico, potenciador de brandicina	<i>Mesobuthus martensii</i>
VmCT1	13	10.1	1	Antimicrobial, hemolítico	<i>Vaejovis mexicanus</i>
VmCT2	13	10.1	1	Antimicrobial, hemolítico	<i>Vaejovis mexicanus</i>
AamAP1	18	9.72	2	Antimicrobial, hemolítico	<i>Androctonus amoreuxi</i>
AamAP2	18	9.72	2	Antimicrobial, hemolítico	<i>Androctonus amoreuxi</i>
StCT2	14	9.88	2	Antimicrobial	<i>Scorpiops tibetanus</i>
HsAP	29	10.75	3	Antimicrobial, hemolítico	<i>Heterometrus spinifer</i>
Css54	25	11.25	4	Antimicrobial, hemolítico	<i>Centruroides suffusus suffusus</i>
UyCT1	14	9.53	2	Antimicrobial, hemolítico	<i>Urodacus yaschenkoi</i>
UyCT2	13	9.55	2	Antimicrobial, hemolítico	<i>Urodacus yaschenkoi</i>
UyCT3	13	9.69	2	Antimicrobial, hemolítico	<i>Urodacus yaschenkoi</i>
UyCT5	13	9.69	2	Antimicrobial, hemolítico	<i>Urodacus yaschenkoi</i>
Pantinina-1	14	9.55	1	Antimicrobial, hemolítico	<i>Pandinus imperator</i>
Pantinina-2	13	9.69	1	Antimicrobial, hemolítico	<i>Pandinus imperator</i>
Pantinina-3	13	9.69	1	Antimicrobial, hemolítico	<i>Pandinus imperator</i>
Mauriporina	48	10.82	6	Anticancerígeno	<i>Androctonus mauritanicus</i>
TsAP-1	17	9.69	1	Antimicrobiano, anticancerígeno	<i>Tityus serrulatus</i>
TsAP-2	17	9.69	1	Antimicrobiano, hemolítico, anticancerígeno	<i>Tityus serrulatus</i>

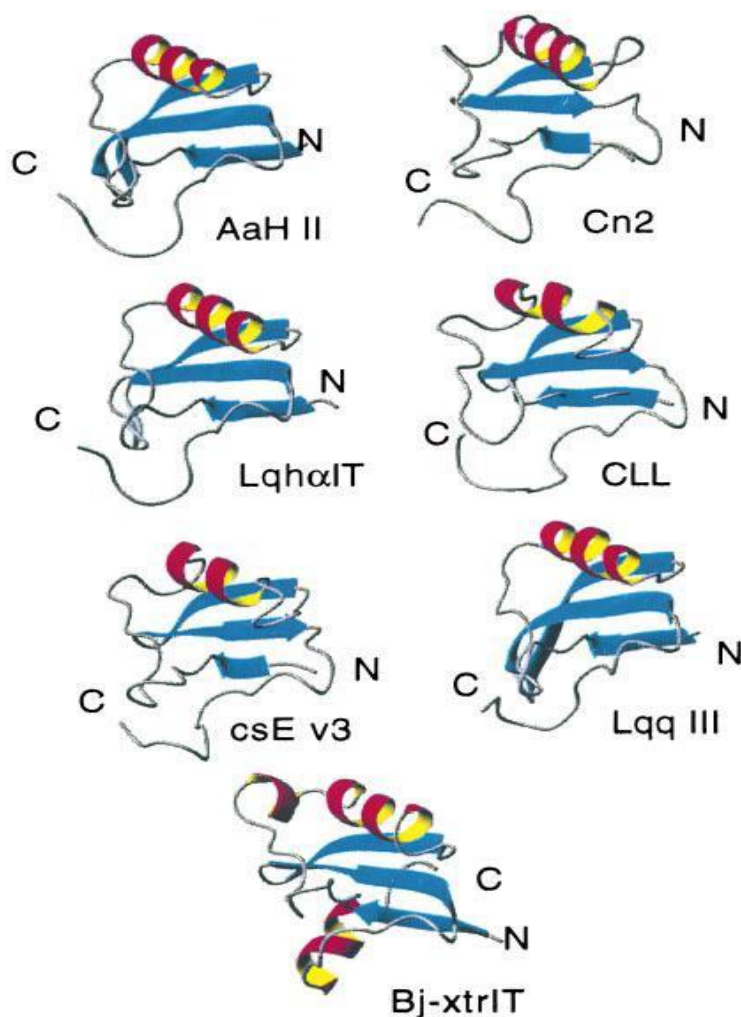


Ilustración 5: Tomado de Possani y col. ^[13] Plegamientos generales de algunas toxinas representativas sobre canales de Na⁺. Todas las toxinas se encuentran orientadas de manera similar con sus N- y C- terminales indicados.. Los números de acceso para el Protein Database (PDB) son 1PTX para AhHII; 1CN2 para Cn2, 1LQH/1LQI para LqhαIT, 1SN3 para CsEv3, 1LQQ para LqqIII y 1BCG para Bj-xtrIT. AaHII es una alfa toxina clásica, mientras que Cn2 es una beta toxina, ambas altamente activas en mamíferos. LqhαIT es una toxina de insecto y CLL es una toxina de crustáceo. La letalidad de CsEv3 fue inicialmente reportada en grillos, mientras que LqqIII es una toxina tipo alfa que produce inactivación en canales de sodio en insectos, pero también compite por el enlace de la toxina tipo alfa anti mamífero más potente. Bj-xtrIT es una toxina excitatoria de insectos. Es la única con dos segmentos de alfa hélices.

Cuando el veneno de Td es separado mediante una columna de fase reversa acoplada a un equipo de CLAR se obtienen 58 fracciones, las cuales a su vez agrupan por lo menos a 205 componentes. Los valores de masa molecular de esos componentes se encuentran entre 272 y 57908 uma, determinados mediante espectrometría de masa de ionización suave (MALDI-TOF) y de la espectrometría de masas por ionización de nano electrospray con trampa de iones (nano-ESI-ITMS). En la Ilustración 6 se puede observar el perfil de separación del veneno de Td por cromatografía de fase reversa ^[12].

La distribución de pesos moleculares en el veneno de Td mostró una alta proporción de péptidos o toxinas de bajo peso molecular (<5 kDa), la mayoría de los péptidos dentro de este intervalo son aquellos que bloquean canales de K⁺ (2,500-4,500 Da). Los péptidos que modulan los canales de Na⁺ tienen pesos moleculares entre 6000 y 8000 Da. En el veneno de *T. discrepans*, estas toxinas son los más abundantes en concentración, pero no necesariamente en diversidad ^[22].

Más de 90 péptidos aislados del veneno de *T. discrepans* tienen su secuencia total o parcialmente determinada mediante secuenciación directa de Edman y/o determinados por análisis de la secuencia de nucleótidos de los genes que los codifican. La Tabla 2 muestra los números de acceso UniProt de 34 toxinas aisladas, con secuencias de aminoácidos completas y sus nombres personalizados. En la ilustración 7 se muestran las estructuras tridimensionales de 4 toxinas aisladas de *T. discrepans*. La presencia de una α -hélice y de hojas- β con 2 a 3 hebras se mantiene, en concordancia a lo expuesto en la conformación presentada en la ilustración 5 ^[22].

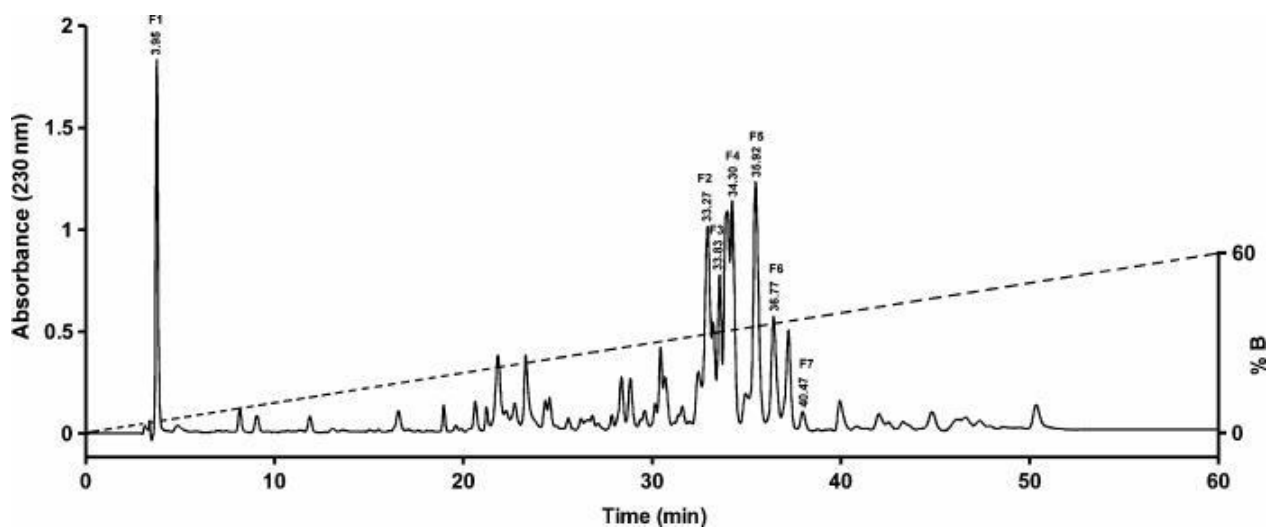


Ilustración 6. Fraccionamiento del veneno: perfil cromatográfico del veneno fraccionado de *T. discrepans* en una columna analítica de fase reversa C18 en un HPLC con un flujo de 1mL/min usando un gradiente lineal de la solución A [H_2O + 0,12% ácido trifluoroacético (TFA)] a un 60% de solución B (acetonitrilo (ACN) + 0,10% de TFA) en 60 min detectado a una longitud de onda de 230 nm. Las toxinas con actividad funguicida se encuentran identificadas entre F1-F7 con sus respectivos tiempos de retención ^[23].

Tabla 2. 34 toxinas de escorpiones venezolanos con sus números de acceso UniProt ^[15-19].

Nombre	UniProt	Clase
Ard	P0C1X7	NaScTx de Insecto
Bact-1	P0CF39	Bacterial, NaScTx de insecto
Bact-2	P0CF37	Bacterial, NaScTx de mamífero
TdNa1	C9X4J9	NaScTx putativa
TdNa2	C9K4K0	NaScTx putativa
TdNa3	C9X4K1	NaScTx putativa
TdNa4	P0C1X7	NaScTx putativa
TdNa5	C9X4K3	NaScTx putativa
TdNa6	C9X4K4	NaScTx putativa
TdNa7	C9X4J8	NaScTx putativa
TdNa8	C9X4K6	NaScTx putativa
TdNa9	C9X4K7	NaScTx putativa
TdNa10	C9X4K8	NaScTx putativa
Td1	Q1I180	NaScTx putativa
Td2	Q1I179	NaScTx putativa
Td3	Q1I177	NaScTx putativa
Td4	Q1I174	NaScTx putativa
Td5	Q1I169	NaScTx putativa
Td6	Q1I167	NaScTx putativa
Td7	Q1I164	NaScTx putativa
Td8	Q1I163	NaScTx putativa
Td9	Q1I178	NaScTx putativa
Td10	Q1I176	NaScTx putativa
Td11	Q1I173	NaScTx putativa
Td12	Q1I172	NaScTx putativa
Disc	P84777	α KTx
TdK1	P59925	α KTx
TdK2	P0C1X5	α KTx
TdK3	P0C1X6	α KTx
TdKIK	Q0GY43	β KTx putativa
TdiβKTx	Q0GY44	β KTx putativa
Tdd	P0CF77	defensina putativa
Tz1	Q2NME3	NaScTx putativa
Tz2	Q1I165	NaScTx putativa

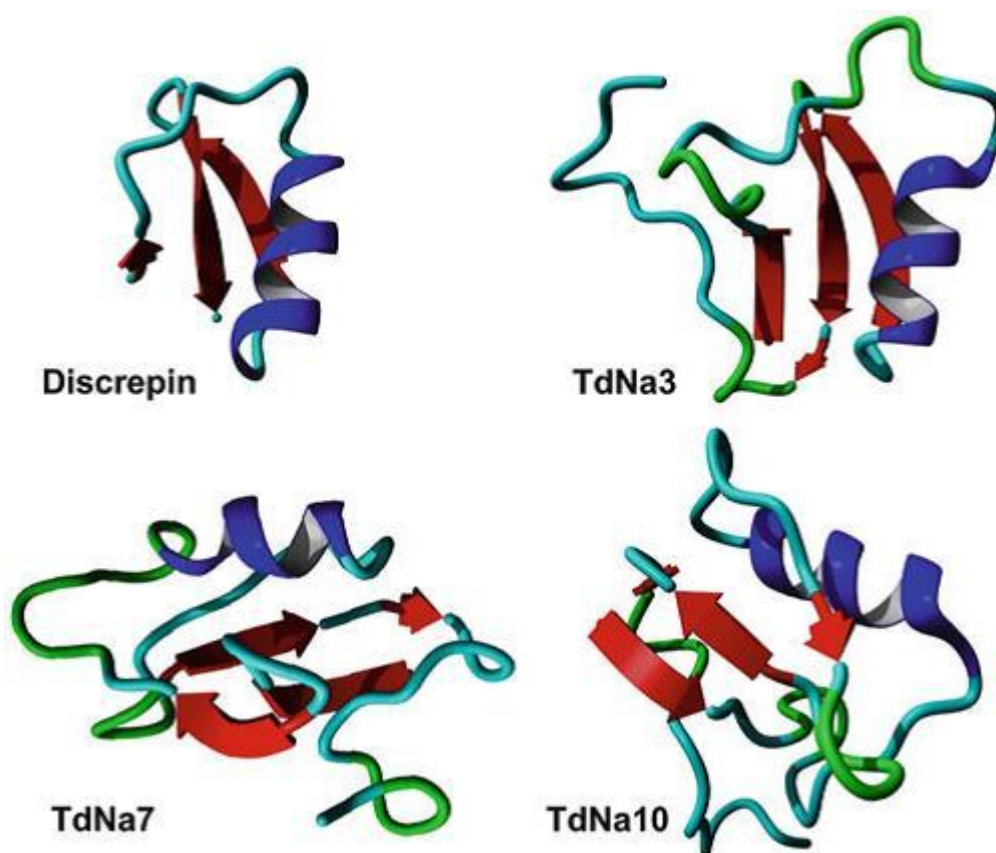


Ilustración 7. Estructura tridimensional de 4 toxinas de *T. discrepans*. La estructura de la Discrepina fue determinada por RMN (código PDB: 1AXK) y las estructuras de TdNa3, TdNa7 y TdNa10 fueron modeladas *in silico*. En las 4 imágenes, la estructuras secundarias están coloreadas de la siguiente forma: azul, α -hélice; verde, giros- β ; rojo, hojas- β ; cian, segmentos sin estructuras ^[15-19].

En el trabajo realizado en 2011 por Galax Joya y col. ^[23] se describe un grupo de toxinas aisladas del veneno de Td con actividad fungicida, asignadas con la notación F(1-7). De estas, la fungitoxina F1 es la que se escogió en el presente trabajo de grado para caracterizarla funcional y estructuralmente. Las fungitoxinas con sus pesos moleculares determinados por EM se encuentran reflejadas en la Tabla 3. Se determinó que por los medios regulares de digestión bajo la metodología de Simpson, la F₁ no produjo ningún tipo de aminoácido, impidiendo la realización de una secuenciación, y por consiguiente, se desconoce si dicha fracción es una proteína de bajo peso molecular o algún tipo de molécula orgánica pequeña. Debido a lo anterior, para la caracterización estructural de esta fracción, se propone realizar un análisis mediante métodos espectroscópicos como Resonancia Magnética Nuclear (RMN), Infrarojo (IR) y Espectrometría de Masa (EM).

Métodos espectroscópicos para el análisis de proteínas

Resonancia magnética nuclear (RMN)

Con los datos de la RMN es posible determinar tanto la estructura secundaria como la terciaria de una proteína. Sin embargo, es un requisito fundamental contar con la estructura primaria con antelación para facilitar el análisis de los espectros de RMN. Es factible determinar la estructura cuaternaria, pero es una tarea muy compleja. Para estos casos sólo se mencionará que es requisito indispensable que la proteína se enriquezca isotópicamente con el átomo de hidrógeno pesado (el deuterio o ²H), además de con ¹³C y ¹⁵N ^[24].

Tabla 3. Resultados de la espectrometría de masas de las diferentes fracciones. MT: Masa teórica, ME: Masa experimental (expresado en uma), SC: Secuencia cubierta (en %), PE: Péptidos Emparejados ^[23].

Fracción	MT	ME	SC	PE
F1		1060.1		
F2	7298.46	7328.85	15	1
F3	7288.33	7279.45	17	3
F4	7288.33	7268.48	17	3
F5	7118.15	7104.61	50	3
F6	6927.89	6924.61	26	2
F7	6835.99	6823.28	36	2

Cuando se obtiene un espectro de RMN de una proteína, las señales se ensanchan debido al movimiento lento de estas moléculas en el medio acuoso. Mientras más rápido sea el movimiento molecular en el disolvente, las señales son más finas. Este ensanchamiento de las señales junto con el traslape entre ellas provocan que los espectros monodimensionales de una proteína sean imposibles de interpretar. Para lograr la interpretación de los espectros de RMN es requisito indispensable la obtención de espectros multidimensionales. La conceptualización matemática necesaria para comprender los experimentos multidimensionales de RMN está fuera de los objetivos de este trabajo ^[25]. Con estos experimentos es posible determinar qué núcleos dentro de una molécula se encuentran acoplados entre sí. Este conocimiento nos permite determinar el número y tipo de protones que se encuentran a dos o a tres enlaces de distancia.

La representación gráfica de un espectro monodimensional es una representación en dos dimensiones. Un espectro en dos dimensiones debería ser una representación en tres; sin embargo, los espectros en dos dimensiones se grafican como diagramas de contornos para que la representación sea de dos dimensiones solamente y se facilite su interpretación. Los experimentos en dos dimensiones se pueden clasificar en homonucleares y heteronucleares. La interpretación de este tipo de espectros es muy sencilla. Los experimentos homonucleares, como el COSY, muestran una serie señales con las coordenadas iguales, a estas se le llama señales en la diagonal, las cuales corresponden a las señales del espectro monodimensional. Las señales que se localizan fuera de la diagonal son las importantes. Las coordenadas de ellas son los desplazamientos químicos de los protones que se encuentran acoplados escalaramente a dos y a tres enlaces de distancia. Con esta información es posible asignar cada una de las señales de los protones en la molécula. Para ello, es necesario

utilizar el desplazamiento químico de las señales que están correlacionando ^[24].

Los experimentos en dos dimensiones ayudan a interpretar muchas señales que se encuentran traslapadas; sin embargo, ello es posible sólo cuando la molécula no es muy grande. Muestras de proteínas constituidas por 50 aminoácidos son factibles de determinar sus estructuras con experimentos en dos dimensiones. Cuando la proteína es mayor, resulta muy complicada y compleja la interpretación de los espectros de RMN. Para solucionar este problema se emplean experimentos heteronucleares en dos y en tres dimensiones.

Los diferentes experimentos de RMN específicos para proteínas se han diseñado a partir de las características químicas de las mismas. El experimento más importante que se aplica es el HSQC (coherencia cuántica única heteronuclear en español). Este experimento correlaciona los núcleos de protones que se encuentran a un enlace de un núcleo de nitrógeno. En el caso de las proteínas esta situación se da una vez para cada aminoácido, en su enlace peptídico. Así, en el espectro HSQC de una proteína aparecerá una señal por cada aminoácido ^[26].

Espectroscopia de infrarrojo (IR)

La espectroscopia infrarroja empezó a utilizarse en la determinación de la estructura secundaria de péptidos en 1950, permitiendo desde entonces complementar los datos estructurales. Una ventaja que presenta la espectroscopia de infrarrojo es que permite trabajar tanto en disolución como en estado sólido o gel. Al estudiar péptidos mediante Infrarrojo por transformadas de Fourier (IR-FT sus siglas en inglés) se pueden observar nueve bandas de absorción características de este tipo de esqueleto carbonado, algunas de las cuales son útiles para el estudio conformacional de péptidos. La banda más utilizada en este sentido es la denominada “banda amida I”, situada entre

1600 y 1700 cm^{-1} , que se debe mayoritariamente a los estiramientos del enlace C=O (80%) y C-N (20%) del grupo amida. Frecuentemente se utiliza agua deuterada para realizar la medida de estas estructuras para evitar la vibración de las moléculas de agua, dando un ligero desplazamiento de la banda amida I, dando lugar a la denominada banda amida I' ^[27].

El análisis de la estructura secundaria presente en una proteína mediante IR-FT se basa en dos parámetros. Por un lado, la frecuencia máxima de las bandas nos indica que tipo de estructura tenemos, mientras que el área se puede relacionar con el contenido en dicha estructura. En la tabla 4 se muestra un resumen del rango de las frecuencias observado para diferentes tipos de estructuras secundarias. En general, la frecuencia a la que se observa una banda tipo amida I depende de la clase de puente de hidrógeno en el que se encuentre involucrado el grupo acilo o carbonilo de la amida. Cuanto más fuerte es el puente de hidrógeno que forma, menor densidad electrónica presenta el acilo o el carbonilo y, por tanto, aparece a frecuencias más bajas. Esto explica la gradación que se muestra en la tabla 4, donde las estructuras β , con enlaces inter e intramoleculares, presentan valores de frecuencia más bajos ^[27].

Espectrometría de masas

La EM es una técnica analítica esencial en el contexto del estudio de proteínas debido a su alta capacidad de análisis, su sensibilidad y su precisión para determinar masas moleculares de proteínas, información que permite corroborar información sobre una determinación estructural de una proteína ^[28]. Los espectrómetros de masas utilizados en el análisis de proteínas o péptidos pueden ser divididos básicamente en dos elementos:

- 1) Fuente de iones que genera e introduce los iones analitos en el instrumento:
habitualmente se utilizan dos tipos de técnicas de ionización:

-Ionización ESI (Electrospray Ionisation): Ionización por electronebulización.

-Ionización MALDI: Matriz-Assisted Laser Desorption/Ionization (desorción/ionización mediante láser asistida por matriz). Esta fuente de ionización suele asociarse a un analizador de tiempo de vuelo (TOF, Time-Of- Flight) en el que los iones se separan en función de su relación masa-carga tras ser acelerados en un campo eléctrico, o a un analizador TOF/TOF que proporciona un mejor enfoque de los iones y, por tanto, mayor resolución y precisión másicas. En el primer TOF los iones son acelerados a bajo voltaje, favoreciendo la fragmentación metaestable. Mediante un pulsador se selecciona un determinado ion padre y sus iones fragmento, que son acelerados a un potencial mayor y separados en el segundo TOF.

- 2) Detector para medir las masas de los iones generados.

Muerte Celular

La muerte celular es la pérdida de estructura o energía en la célula ^[29]. La muerte ocurre debido a la incapacidad de las células para revertir los daños sufridos por algún agente de daño. Existen dos modalidades principales de la muerte celular en las células nucleadas, la apoptosis y la necrosis. La primera usualmente es programada y puede ser inducida por factores externos o por daños ocurridos en el interior de la célula; la segunda es generalmente inducida por factores externos ^[30] (Ilustración 8).

Tabla 4. Correlación entre las señales de IR observadas y el tipo de estructura al que son asignadas ^[27].

Estructura Secundaria	Banda amida I'
Estructura extendida, lámina β	1640-1615 cm^{-1} (banda secundaria a 1680- 1670 cm^{-1})
Estructura amiloide, β antiparalelo	$\sim 1630 \text{ cm}^{-1}$ (banda secundaria menos intensa a $\sim 1695 \text{ cm}^{-1}$)
Desordenado	1649-1641 cm^{-1}
α Hélice	1660-1650 cm^{-1}
Giros	$>1660 \text{ cm}^{-1}$

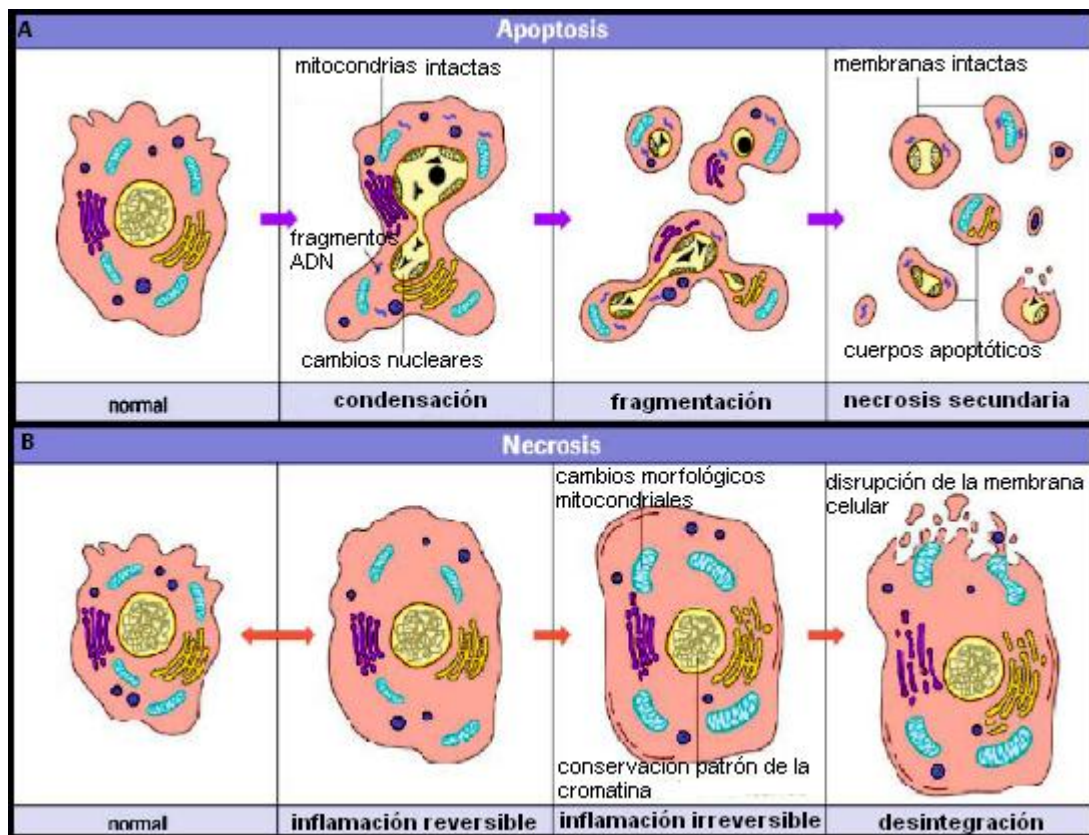


Ilustración 8: Tipos de muerte celular

Apoptosis

Se define como la muerte celular que se acompaña de un balanceo de la célula, con retracción de los pseudópodos, reducción del volumen celular (pícnosis), condensación de la cromatina, fragmentación del núcleo, con escasa o nula modificación ultraestructural de los organelos citoplasmáticos, burbujas de membrana plasmática y mantención de la membrana plasmática hasta que el proceso haya finalizado. Frecuentemente la fragmentación del ADN es utilizada como sello para definir apoptosis, pero la apoptosis puede ocurrir sin la fragmentación oligonucleosomal e incluso sin activación de caspasas. Los organelos involucrados en la muerte celular por la vía apoptótica son la mitocondria, los lisosomas y el retículo endoplasmático ^[30]. Existen dos vías principales de iniciación de apoptosis, la vía extrínseca mediada por un receptor de muerte asociado a la membrana celular y la vía intrínseca mediada por daño mitocondrial.

Vía extrínseca: Las vías de señalización extrínsecas que inician la apoptosis implican interacciones mediadas por el receptor transmembrana. Estos implican receptores de muerte que son miembros del factor de necrosis tumoral (TNF) superfamilia de genes de receptor. Los miembros de la familia comparten dominios extracelulares similares ricos en cisteína del receptor de TNF y tiene un dominio citoplásmico de aproximadamente 80 aminoácidos llamado el "dominio de muerte". Este dominio de muerte juega un papel crítico en la transmisión de la señal de la muerte de la superficie celular a las vías de señalización intracelular. Hasta la fecha, los ligandos mejor caracterizados y receptores de muerte correspondientes incluyen FasL / FasR, TNF- α / TNFR1, Apo3L / DR3, Apo2L / DR4 y Apo2L / DR5 ^[29].

Vía intrínseca: Las vías de señalización intrínsecas que inician la apoptosis implican una gran variedad de estímulos no mediados por el receptor que producen señales

intracelulares que actúan directamente sobre los blancos dentro de la célula y son eventos iniciados vía mitocondria. Los estímulos que inician la vía intrínseca producen señales intracelulares que pueden actuar ya sea en una manera positiva o negativa. Señales negativas implican la ausencia de ciertos factores de crecimiento, hormonas y citoquinas que pueden conducir a un fallo de la supresión de programas de muerte, iniciando así la apoptosis. En otras palabras, es la retirada de los factores, la pérdida de supresión de apoptosis, y la posterior activación de la apoptosis. Otros estímulos que actúan de una manera positiva incluyen, pero no se limitan a, radiación, toxinas, hipoxia, hipertermia, infecciones virales, y los radicales libres ^[29].

Necrosis

La alternativa a la muerte celular apoptótica es la necrosis, que se considera ser un proceso tóxico donde la célula es una víctima pasiva. Pero ya que la necrosis se refiere a los procesos de degradación que se producen después de la muerte celular, es considerado por algunos como un término inadecuado para describir un mecanismo de muerte celular. Por lo tanto, oncosis se utiliza para describir un proceso que conduce a la necrosis celular con cariólisis y la hinchazón, mientras que la apoptosis conduce a la muerte celular con el encogimiento celular, picnosis, y cariorrexis. Por lo tanto, los términos "muerte celular oncocítica" y "necrosis oncocítica" se han propuesto como alternativas para describir la muerte celular que se acompaña de hinchazón celular ^[29].

Se caracteriza por la pérdida de integridad de la membrana celular resultando en la liberación del contenido citoplásmico en el tejido circundante, y el envío de señales quimiotácticas con eventual reclutamiento de células inflamatorias. Dado que las células apoptóticas no liberan sus constituyentes celulares en el tejido intersticial que rodea y son fagocitados rápidamente por los macrófagos o las células normales adyacentes,

esencialmente no hay reacción inflamatoria. También es importante señalar que picnosis y cariorrhexis no son exclusivos de apoptosis y puede ser una parte del espectro de cambios citomorfológicos que se producen con necrosis. La Tabla 4 compara algunas de las principales características morfológicas de apoptosis y necrosis ^[30].

La característica fundamental que distingue la mayoría de las formas de necrosis de la apoptosis es la pérdida rápida de los potenciales de membrana. Esto puede ser consecuencia de depleción de la energía celular, daño en los lípidos de membrana y/o pérdida de la función de bombas iónicas o canales homeostáticos. Entre ellos hay sinergia, ya que la alteración de uno produce un efecto en la función de los otros, siendo difícil definir cuál ocurre primero ^[31].

Neuroblastomas

El neuroblastoma es un tumor sólido extracraneal frecuente en niños, el cual representa el 15% de todas las muertes de oncología pediátricas. La malignidad se deriva de células de la cresta neural del sistema nervioso simpático y tiene un resultado clínico extremadamente heterogéneo, que van desde regresión espontánea hasta tumores altamente agresivos. Aproximadamente, el 60% de los tumores primarios de neuroblastoma se localizan en la médula suprarrenal y los ganglios paraespinales del abdomen, mientras que otros sitios primarios comunes pueden ser el cuello, el pecho y la pelvis. Desafortunadamente, más de la mitad de los pacientes con neuroblastoma presentan tumores metastásicos, con difusión típicamente a la médula ósea, huesos e hígado ^[32].

Tabla 4. Comparación de las características morfológicas de apoptosis y necrosis ^[30].

Apoptosis	Necrosis
Células individuales o pequeños grupos de células	A menudo en células contiguas
Contracción de la célula y convolución	Hinchazón de la célula
Picnosis y cariorexis	Cariolisis, picnosis y cariorrexis
Membrana celular intacta	Membrana de células rotas
Citoplasma retenido en cuerpos apoptóticos	Citoplasma liberado
Sin inflamación	La inflamación suele estar presente

El tratamiento de los niños con neuroblastoma es lento pero en constante mejoría, reflejado en las leves mejorías de la tasa de supervivencia en pacientes con enfermedad de alto riesgo y en las estrategias exitosas de reducción de tratamiento basado en la estratificación de riesgo adecuada en los casos de enfermedad de riesgo bajo e intermedio. Hay dos grandes retos en la investigación clínica del neuroblastoma: la ausencia de progreso aceptable en las tasas de curación de los pacientes con neuroblastoma de alto riesgo y el sobretratamiento potencial de otros pacientes. Por otra parte, existe una creciente evidencia de que los pacientes que se curan hoy corren un riesgo considerable de presentar complicaciones tardías del tratamiento que han recibido. Hay una gran necesidad de modalidades de tratamiento adicionales e innovadoras, en particular para los niños con neuroblastoma de alto riesgo ^[33].

OBJETIVOS

Objetivo general

Caracterizar la estructura y determinar la actividad anticancerígena de la fracción F₁ del veneno de *Tityus discrepans*.

Objetivos específicos

- Aislar los componentes del veneno de *Tityus discrepans* mediante cromatografía líquida de alta resolución usando fase reversa
- Determinar la actividad anticancerígena de la fracción F1 y sus componentes sobre la línea tumoral Neuro-2A.
- Caracterizar el tipo de muerte celular inducida por F1 y su componente activo sobre la línea tumoral Neuro-2A.
- Caracterizar la estructura del componente activo mediante métodos espectroscópicos como RMN, IR y EM.

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Recolección del veneno de *T. discrepans*.

Escorpiones adultos de la especie *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. Dichos lotes fueron disueltos en agua destilada y centrifugados durante 30 minutos a 15.000 g en una centrífuga refrigerada (Eppendorf MR Microcentrifuge, 5417R; Alemania) a 4 °C.

Determinación proteica

El contenido proteico del sobrenadante se estimó espectrofotométricamente (Eppendorf Biophotometer plus) asumiendo que una unidad de absorbancia a 280 nm es equivalente a 1 mg/mL de proteína de acuerdo a la Ley de Lambert y Beer ^[34]. El sobrenadante se liofilizó centrifugándolo (Speed Vac SC110) al vacío a -56 °C y el producto seco se guardó a -80 °C hasta el momento de su uso.

Purificación de las toxinas

El sobrenadante liofilizado se resuspendió en agua bidestilada y se centrifugó durante 30 minutos a 15.000 g (Eppendorf 5417R) a 4 °C. Tres miligramos de veneno

fueron separados en un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) de inyección automática (Waters 2695) a través de una columna de fase reversa C₁₈ analítica (250 x 10 mm, Grace Vydac Hesperia, CA. EE.UU). Como fase móvil se usaron dos soluciones: solución A [agua grado CLAR con 0,12% de ácido trifluoroacético (TFA)] y solución B [acetonitrilo (ACN) con 0,10% de TFA]. La elución de los componentes del veneno se realizó bajo un gradiente lineal de 0 a 60% de la solución B en 60 minutos a un flujo de 1 mL/min y se detectó a una longitud de onda de 230 nm ^[35] empleando un detector de arreglo de fotodiodos (Waters 2998). Los componentes del veneno se recolectaron manualmente, liofilizaron y almacenaron a -80°C. Posteriormente, la fracción a ser caracterizada fue sometida a una cromatografía sucesiva a través de una columna de fase reversa C₁₈ analítica en un equipo de CLAR de inyección manual (Waters 1525) bajo un gradiente lineal de 0 a 5% de la solución B en 60 minutos a un flujo de 1 mL/min, los componentes de dicha fracción se recolectaron manualmente, liofilizaron y almacenaron a -80 °C.

Cultivo de la línea celular Neuro-2A.

La línea celular Neuro-2A (ATTC CCL-131TM) fue originalmente extraída del tejido cerebral del ratón *Mus musculus*. Esta línea celular 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 el medio Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) y se preparó siguiendo las instrucciones del fabricante. El medio fue suplementado con ampicilina 100 U/mL y estreptomycin 100 U/mL, con 10 % de suero fetal bovino (SFB) inactivado por calor. Las células fueron crecidas hasta alcanzar aproximadamente un 60% de confluencia en una incubadora (NAPCO 5200) a 37 °C con 5 % de CO₂, cambiando a medio fresco cada 3 días. Al momento de repicar las células, el medio fue retirado del frasco de cultivo de 75 cm³ y las células fueron

despegadas agregando 2 mL de mezcla tripsina:EDTA (1:1). Se descartó la tripsina:EDTA, se agregaron 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 de 75 cm³.

Ensayos de viabilidad celular

Las células Neuro-2a fueron utilizadas para examinar el efecto anticancerígeno de las fracciones aisladas por CLAR-FR a 1 µg/µL y la fracción activa a distintas concentraciones (0,01; 0,1; 0,4; 0,8; 1,0 y 1,2 µg/µL). En placas (NuncTM, USA) de cultivo de 96 pozos, se sembraron 2x10⁴ células/pozo (Neuro-2a) en medio DMEM suplementado y se incubaron a 5 % CO₂ 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/porozo de la fracción en DMEM. Se incubaron durante 24 h a 37° C y 5% CO₂. A cada pozo se le adicionó 25 µL de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT, Sigma Chemicals, St. Louis, USA) en PBS (solución salina taponada con fosfato) a pH 7,4 a una concentración de 2,5 µg/µL y se incubó por 4 h (37° C a 5% CO₂). 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 Dodecilsulfato sódico (DSS) al 20% (Bio Dad, California, U.S.A), se dejó toda la noche en oscuridad a temperatura ambiente. Los cristales de formazán obtenidos 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 por apoptosis o necrosis

La línea celular Neuro-2a se cultivó 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 a distintas concentraciones (0; 1 y 1,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) en medio DMEM durante 2.5h, y a una misma concentración (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) a distintos tiempos (2.5h, 5h y 17h) en una cámara húmeda. El resto de los componentes de la fracción se estudiaron con la misma metodología a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ durante 2.5h y 5h de exposición a las células. El tipo de muerte celular inducida se determinó mediante epifluorescencia con tinción del ADN con BE/NA (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ / 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en PBS determinando simultáneamente el porcentaje de muerte por necrosis y por apoptosis^[36-38]. Para ello el número total de células en cada foto se cuantificó con el paquete Java de procesamiento de imágenes ImageJ (versión 1.80_60k) de dominio público (Instituto Nacional de Salud, Bethesda, MA, EE.UU.) con el plugin “Cell counter”, luego se identificaron y contaron las células apoptóticas y las necróticas y se calcularon los porcentajes de apoptosis y necrosis para cada campo, a través de las siguientes fórmulas:

$$\% \text{Apoptosis} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de células apoptóticas} \times 100}{\text{n}^\circ \text{ de células totales}}$$

$$\% \text{Necrosis} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de células necróticas} \times 100}{\text{n}^\circ \text{ de células totales}}$$

Estadística

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 de porcentaje y apoptosis fueron presentados como la mediana y sus intervalos de confianza calculados por el método de valores extremos Moses, la significación estadística de los resultados se evaluó con el método de Kruskal y Wallis^[39].

Estudios espectroscópicos

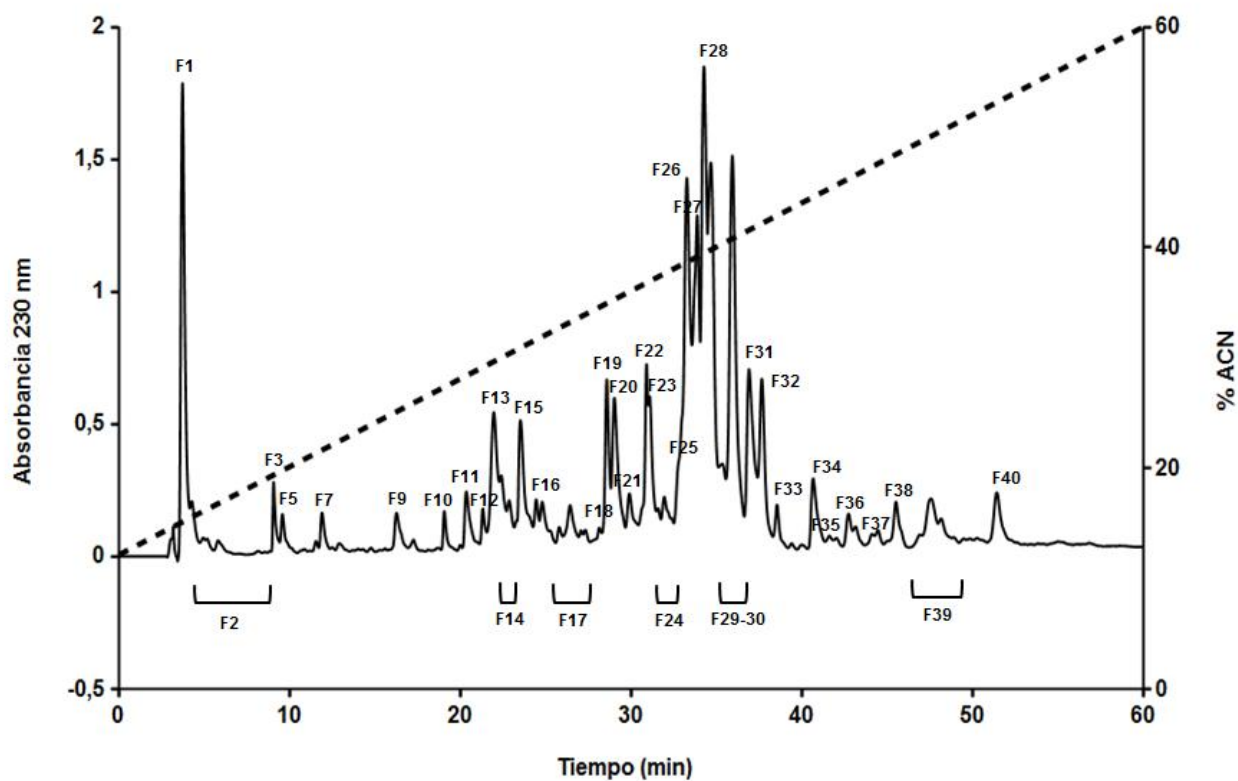
La muestra purificada de la toxina liofilizada fue llevada en un tubo Eppendorf para la determinación de sus espectros de RMN e IR-FT en el Centro de Química del IVIC. Los espectros obtenidos fueron analizados para la caracterización estructural de la muestra.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Separación de los componentes del veneno

El veneno de *T. discrepans* se aisló a través de estimulaciones eléctricas del telson del animal, previamente anestesiado con frío, lo que permite la extracción aproximada del 100 % del veneno presente en las glándulas. Se trabajó con lotes de ordeños de más de 100 individuos, ya que existen diferencias cualitativas significativas intraespecies ^[38]. Trabajar con lotes de ordeños de numerosos individuos de la misma especie, asegura la presencia de todas las proteínas que esta produce, disminuyendo la variación entre lotes 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. Esta longitud de onda se escogió para observar los componentes del veneno de menor peso molecular que no contienen aminoácidos aromáticos. Se obtuvieron 40 fracciones que eluyeron entre 3,0 y 52,0 min las cuales fueron denominadas con la letra F que indica fracción y con números arábigos crecientes dependiendo del tiempo de elución. Los perfiles cromatográficos obtenidos de más de 200 corridas realizadas no mostraron diferencias cualitativas entre ellos (resultados no mostrados).



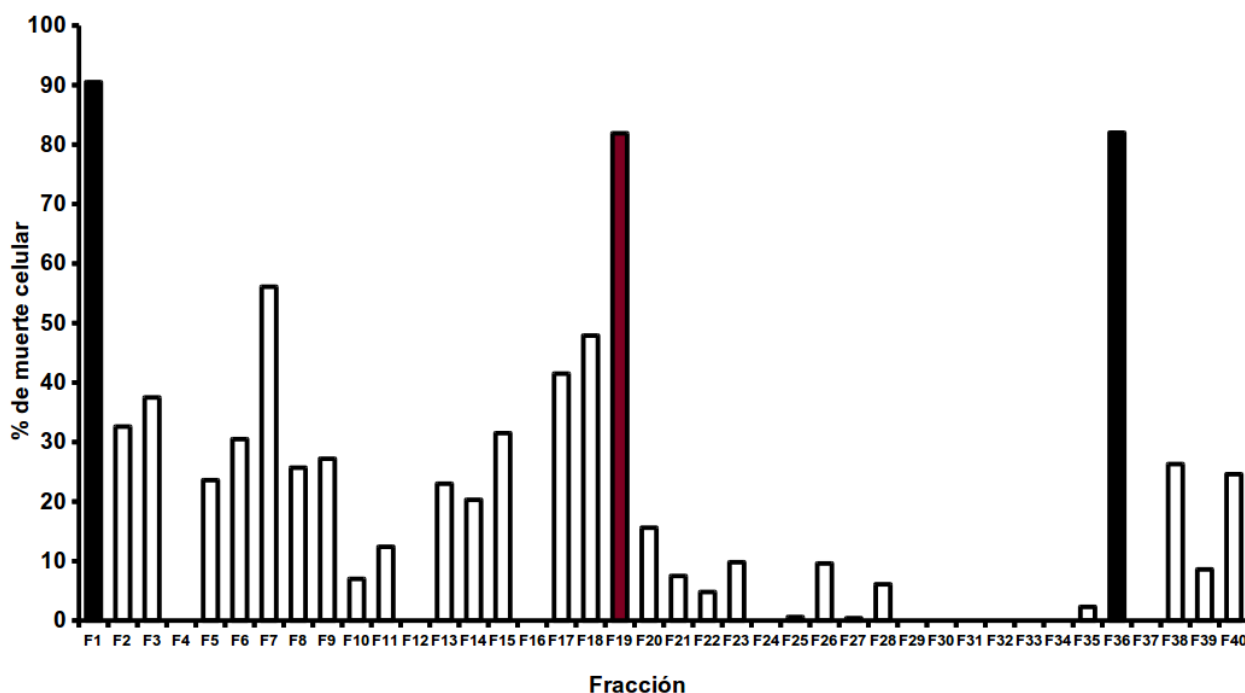
Gráfica 1: Perfil cromatográfico del veneno de *T. discrepans* separado por CLAR-FR. La elución de las fracciones se realizó a 1 mL/min durante 60 min en un gradiente lineal del solvente A ($\text{H}_2\text{O} + 0,12\%$ TFA) a 60 % del solvente B (ACN + 0,1 % TFA). La ordenada representa la absorbancia medida a los 230 nm y la abscisa el tiempo de elución. Las fracciones fueron recolectadas manualmente de F1 a F40. F1 fue la fracción objeto de estudio.

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 aminoácidos que conforman las estructuras primarias de estas. En la CLAR-FR eluyen primero aquellas estructuras con mayor polaridad 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 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, generando una competencia entre el ACN y el agua por el sitio de unión de la proteína inmovilizada en la fase estacionaria, debilitando las interacciones no covalentes entre la proteína con la fase estacionaria y ocasionando su consecutiva elución. La función del TFA en el medio es la de promover la formación de cargas en las estructuras eluidas, aumentando las interacciones entre los analitos de interés con el eluyente.

La sensibilidad de CLAR produce una mejor separación que las cromatografías convencionales y con ella se disminuye el número de pasos de repurificación, evitando la pérdida de material. El perfil cromatográfico del veneno de *T. discrepans* es complejo, este es parecido a los perfiles cromatográficos de otras especies de *Tityus*, los cuales han sido obtenidos en condiciones experimentales similares y se pueden catalogar como huellas digitales que permiten diferenciarlos por especie. A su vez, este perfil es semejante a otros perfiles cromatográficos ya reportados en otros trabajos con la misma especie, lo que indica su alta reproducibilidad. En el veneno de *T. discrepans* se han identificado componentes con diversas actividades, pero hasta ahora, sólo con actividad anticancerígena fueron reportadas las Neopladinas 1 y 2 las cuales poseen actividad sobre la línea celular de cáncer de seno SKBR3 y se ha evidenciado además su actividad anticancerígena *in vivo* en tumores implantados ortotópicamente en ratones

(resultados actuales del Laboratorio, aún no publicados). Además, se determinó que la F19 induce apoptosis en la línea celular de neuroblastomas Neuro2A. Las Neopladinas se aislaron utilizando la misma metodología por CLAR-FR utilizada en el presente trabajo, sin embargo para aislar a las neopladinas se usó una columna C4 indicada para proteínas de alto peso molecular; tanto la F19 como la F1 del presente trabajo se aislaron con una C18 analítica.

El estudio de 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 evidenció que sólo F1, F19 y F36, indujeron más del 80% de muerte celular (Gráfica 2). La F4, F5, F8 a F16, F20 a F35 y F37 a F40 indujeron un porcentaje de muerte celular menor al 30%. La F2, F3, F6, F7, F15, F17 y F18 indujeron un porcentaje de muerte celular entre 30 y 60%. ^[40].

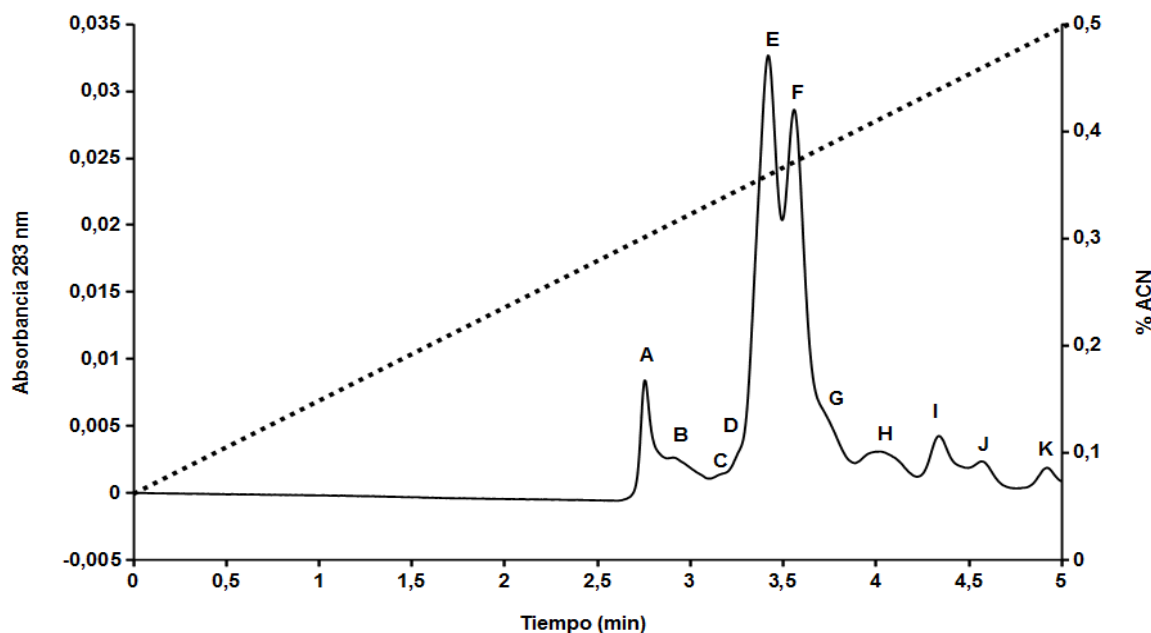


Gráfica 2: Porcentaje de muerte celular en Neuro-2a inducido por las fracciones del veneno separadas por CLAR-FR en un ensayo con MTT. La fracciones 1, 19 y 36 indujeron una muerte mayor al 60 % (barras de color negro y rojo)

^[40].

El ensayo colorimétrico con MTT ofrece una medida rápida, simple y precisa de la viabilidad celular. 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.

Al repurificar F1 disminuyendo el porcentaje de acetonitrilo por minuto en el gradiente de elución de 1 % ACN/min a un 0,08 % ACN/min, se observó que F1 era un pico unitario, sin embargo, al observar el cromatograma obtenido a diferentes longitudes de ondas, se aprecia a 283 nm que F1 está constituida por once (11) componentes. La Gráfica 3 muestra el perfil cromatográfico característico de la repurificación de F1 medido a 283 nm, cuyos componentes fueron denominados con letras desde A hasta K, manteniendo la denominación inicial de F1 con tiempos de elución de 2,76; 2,94; 3,19; 3,28; 3,43; 3,57; 3,76; 4,05; 4,34; 4,59 y 4,95 min respectivamente. Los componentes mayoritarios de F1 son F1_E y F1_F.



Gráfica 3: Perfil cromatográfico de la repurificación de F1 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 (H₂O + 0,12 % TFA) a 5 % del solvente B (ACN + 0,1 % TFA). A los 5 minutos de elución se observó la separación del último componente, por lo que las repurificaciones fueron detenidas posteriormente a dicha elución. La ordenada representa la absorbancia medida a los 283 nm y la abscisa el tiempo de elución. Los picos fueron recolectados manualmente.

La riqueza bioquímica del veneno de *T. discrepans* se evidenció en el análisis proteómico del mismo, el cual arrojó la identificación de 205 componentes con masas moleculares entre 272 y 57.908 Da ^[12]. En la presente investigación se siguió la misma metodología utilizada en los trabajos previos del laboratorio (Gráfica 1), pero en la separación de los componentes de la F1 (Gráfica 2), se disminuyó el gradiente utilizado en la separación del veneno como se mencionó anteriormente. Esto permitió que el intercambio matriz-proteína-fase móvil fuese más específico y que las pequeñas diferencias de polaridad entre los compuestos presentes en la fracción permitiera la separación de los mismos. F1 se ha descrito como una toxina antifúngica (F1) con masa molecular de 1060.1 Da sin una secuencia conocida ^[23]. En dicha investigación,

los autores no lograron separar mediante CLAR-FR los distintos componentes de la F1, pues la repurificación fue monitoreada solamente a 230 nm, longitud en la cual solo se observa un pico unitario. Adicional a esto, al someter la fracción a una secuenciación automática de Edman, no se obtuvo ningún resultado, lo que sugería dos posibilidades: (1) la naturaleza del compuesto no es de origen peptídico o (2) la cadena del amino terminal del péptido se encuentra amidada. Las longitudes de onda de mayor absorbancia para cada fracción fue de 210 nm para F1_A y F1_B, 257 nm para F1_C y F1_D, 243 nm para F1_E, 270 nm para F1_F, 265 nm para F1_G, 260 nm para F1_H, 283 nm para F1_I y F1_J y 230 nm para F1_K. Estos datos fueron determinados a partir de la revisión de los cromatogramas obtenidos por medio del detector de arreglo de fotodiodos, el cual facilita la revisión de un mismo cromatograma a distintas longitudes de onda.

Cultivo de la línea celular Neuro-2a

En la Ilustración 9 se muestra la morfología de las Neuro-2a a distintos porcentajes de confluencia. Estas células tienen una morfología parecida a fibroblastos, son planas con citoplasma extenso y cromatina relajada. Al ser cultivadas, se adhieren con facilidad y extienden sus neuritas al área circundante (Ilustración 9 A). Las células en división pueden formar aglomerados celulares o domos. A alta confluencia > 80 % (Ilustración 9 B) 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 se observó nuevamente una morfología típica semejante a fibroblastos ^[40].

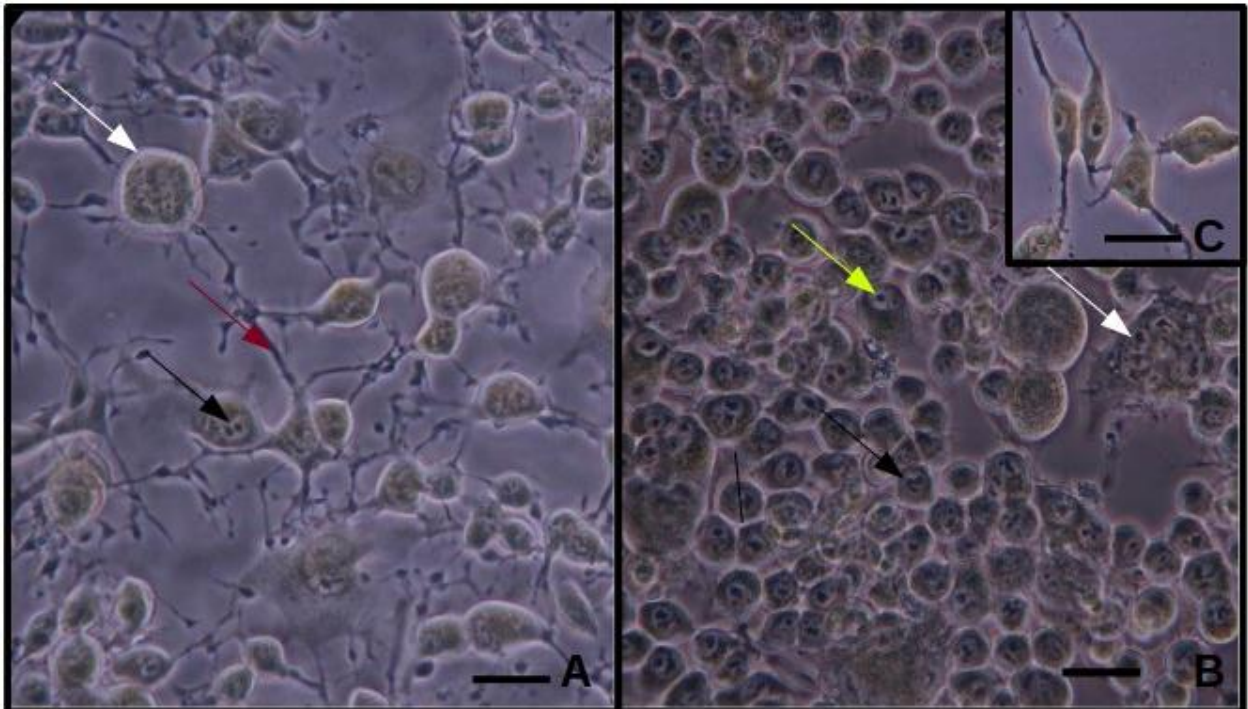


Ilustración 9: Microfotografías de la línea celular Neuro-2a cultivadas en medio DMEM suplementado. A: Células al 40% de confluencia. B: Células al 80% de confluencia. C: Células repicadas de B. Flecha amarilla: nucleolos; flecha blanca: domos; flecha negra: núcleo y flecha roja: neuritas. Barra de escala 50 μm ^[40].

Efecto de F1 y sus componentes sobre Neuro-2a.

1) Tipo de muerte celular y tiempo de exposición

Para estudiar el mecanismo mediante el cual F1 indujo la muerte en los neuroblastomas, se utilizó el ensayo de NA/BE. Este ensayo midió 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 entonces el efecto de F1 y sus componentes sobre las Neuro-2a durante 2.5, 5 y 17 h de exposición a 1µg/µL. La Ilustración 10 muestra las microfotografías de Neuro-2a tomadas en distintos campos al azar, expuestas a F1 (Ilustración 10A) y sus diferentes subfracciones (Ilustración 10B). Debido a la poca cantidad de F1_K obtenida, no se realizaron los ensayos con dicha fracción.

Al añadir las fracciones F1, F1_(ABC) y F1_(DE) al medio, este cambió de color a una tonalidad rojiza. Esta observación indica que la toxina debe poseer en su estructura algún elemento que acidifique el medio, ya que este presenta un indicador que permite evaluar el pH presente en el medio, el cual cambia a color rojo al estar en pH ácido.

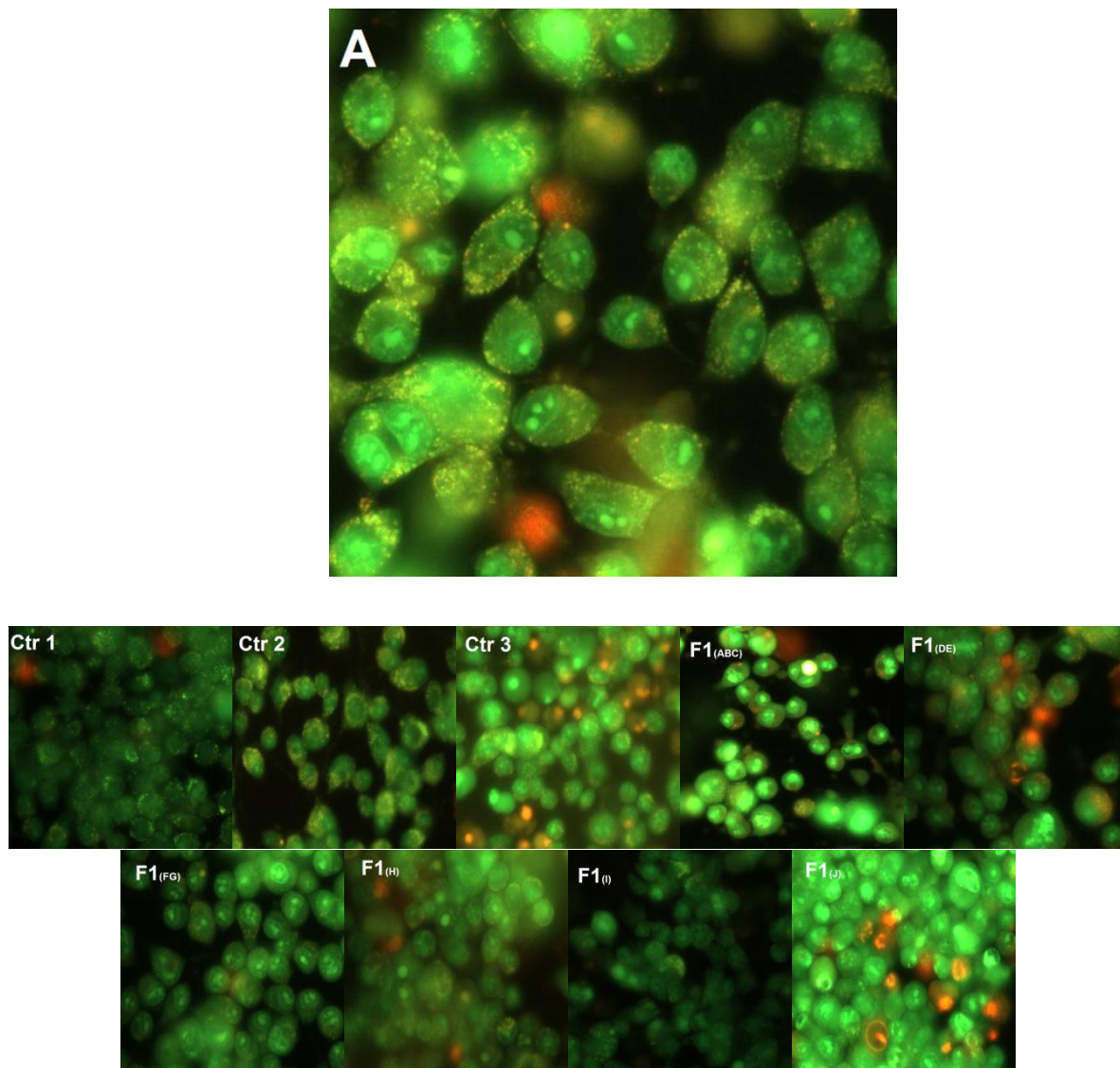


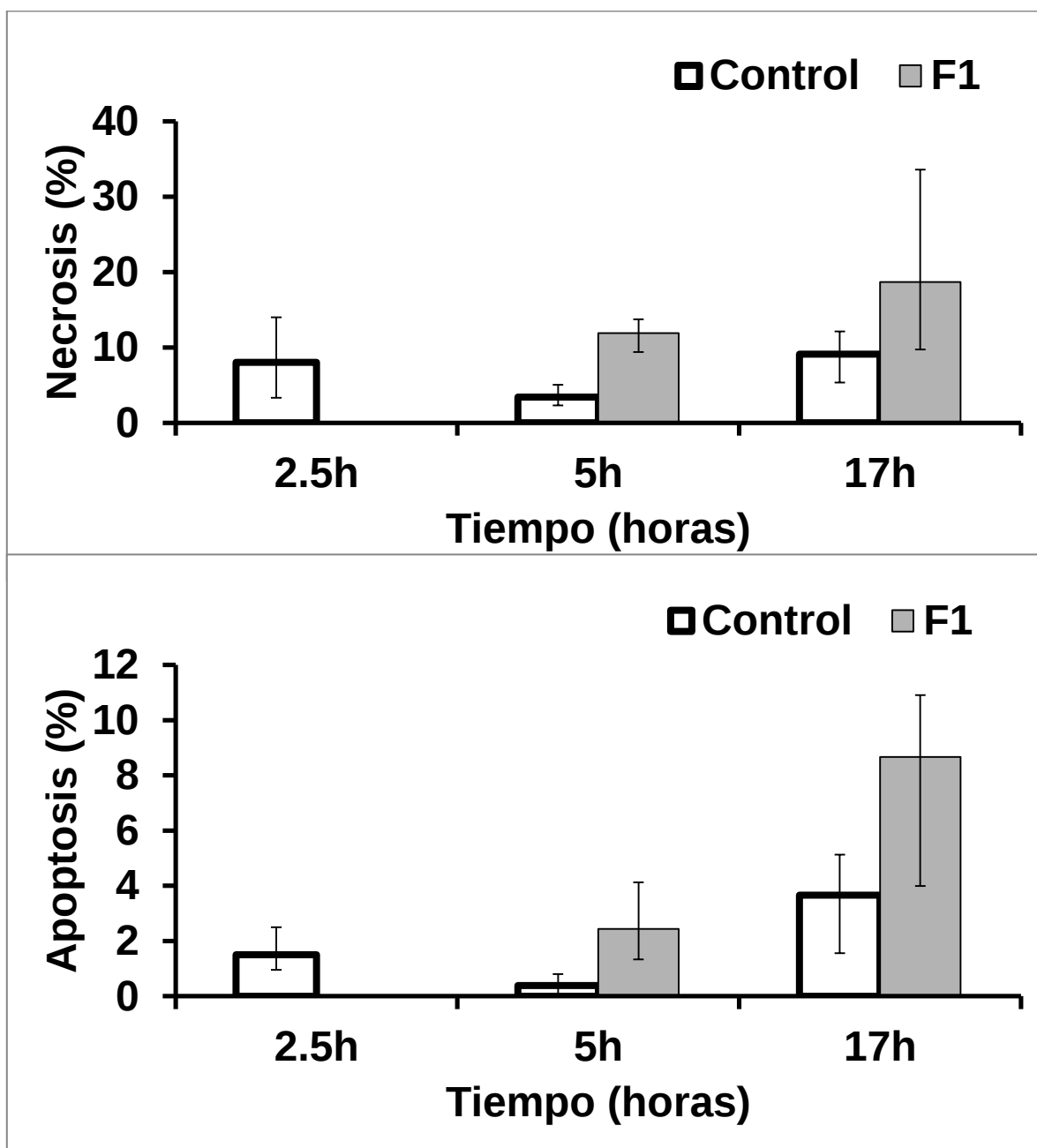
Ilustración 10A Efecto de F1 y B) subfracciones durante 2,5; 5 y 17h de exposición sobre las Neuro-2a a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Las microfotografías muestran a las Neuro-2a teñidas con NA/BE. Ctr1: control 2.5h; Ctr2: control 5h; Ctr3: control 17h; F1 5 h; F1_(ABC) 2,5h; F1_(DE) 2,5h; F1_(FG) 2,5h; F1_(H) 5h; F1_(I) 2,5h; F1_(J) 2,5h. En todas las microfotografías se observan células vivas de color verde, células necrosadas de color rojo, células apoptóticas de color verde brillante. Escala de 50 μm .

La Gráfica 4A y 4B muestran el porcentaje de necrosis y apoptosis respectivamente, inducido por F1 a $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ en un tiempo de 2,5; 5 y 17h de exposición. Las Gráficas 5 y 6 muestran el porcentaje de necrosis y apoptosis respectivamente, inducido por F1 y sus componentes a $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ durante 2.5 y 5h de exposición. Se observó que F1 aumentó significativamente el porcentaje de necrosis y apoptosis dependiendo del tiempo de exposición a la toxina. Además, el porcentaje de necrosis observado a 17h fue muy elevado respecto a los controles. Esto sugiere dos cosas, 1) el tipo de muerte celular inducido por F1 es típicamente por necrosis o 2) la necrosis que estamos observando son las células necrosadas que murieron por apoptosis a tiempos cortos, pero debido a que 17h es un tiempo de exposición muy prolongado no se pudo observar la apoptosis. Es por lo que se redujeron los tiempos de exposición a la toxina a 2,5 y 5 h, con la finalidad de determinar el tipo de muerte celular. Los valores obtenidos de muerte por apoptosis y necrosis a las 17h concuerdan con los valores obtenidos en el ensayo de citotoxicidad con MTT, en el cual se observó un 90% de muerte inducida por F1 a las 24h.

Para el tiempo de exposición de 5 horas, se incluyeron algunos componentes aislados de F1, en los cuales se mantuvieron valores significativos de necrosis que no permitían reconocer el tipo de muerte celular inducido por la toxina, por lo que se redujo el tiempo de exposición a la mitad. Los porcentajes de necrosis y apoptosis observados para F1 y sus componentes a 2,5 y 5 horas a $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ se muestran en la tabla 5. En el análisis estadístico para verificar diferencias significativas al exponer las células a F1 se comparó con los resultados del control 1 (Gráficas 4A y 4B). Para el ensayo de comparación entre el control, F1 y subfracciones, fueron utilizados los valores del control 2 (Gráficas 5 y 6).

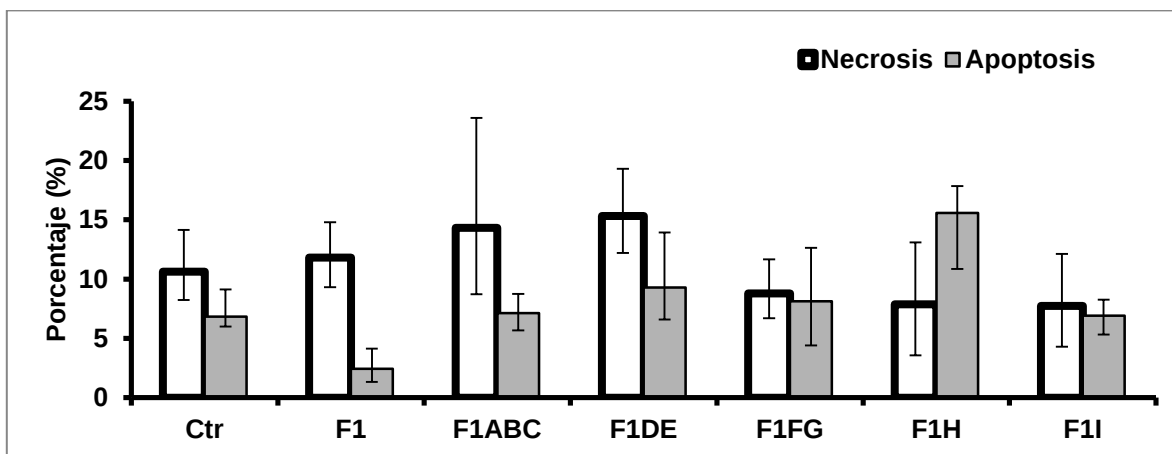
Tabla 5. Porcentajes de necrosis y apoptosis observados para F1 y sus componentes a 2,5 y 5 horas de exposición a 1 µg/µL. Ctr1: Control 1; Ctr2: Control 2; %N: porcentaje de necrosis; %A: porcentaje de apoptosis. Los resultados representan la mediana de al menos 100 células contadas por campo al azar con sus intervalos de confianza al 95%

Fracción	Tiempo					
	2,5 horas		5 horas		17 horas	
	%N	%A	%N	%A	%N	%A
Ctrl	-	-	3,40 (2,29; 5,03)	0,38 (0,00; 0,80)	9,13 (5,34; 12,12)	3,67 (1,56; 5,13)
Ctrl	8,04 (3,32;14)	1,50 (0,96; 2,50)	10,63 (8,24; 14,15)	6,82 (6,00; 9,13)	-	-
F1	-	-	11,89 (9,38; 13,74)	2,44 (1,33; 4,12)	18,68 (9,74; 33,60)	8,67 (3,99; 10,90)
F1(ABC)	2,74 (1,10; 4,52)	5,60 (2,68; 11,95)	14,32 (8,73; 23,60)	7,14 (5,66; 8,76)	-	-
F1(DE)	6,23 (3,99; 8,62)	5,04 (3,33; 7,26)	15,33 (12,19; 19,31)	9,30 (6,59; 13,92)	-	-
F1(FG)	3,52 (2,05; 5,22)	1,61 (0,88; 2,69)	8,78 (6,70; 11,66)	8,13 (4,41; 12,63)	-	-
F1(H)	-	-	7,87 (3,58; 13,10)	15,58 (10,85; 17,86)	-	-
F1(I)	-	-	7,74 (4,29; 12,11)	6,92 (5,31; 8,26)	-	-
F1(J)	10,03 (9,43; 10,65)	6,55 (4,35; 7,18)	-	-	-	-

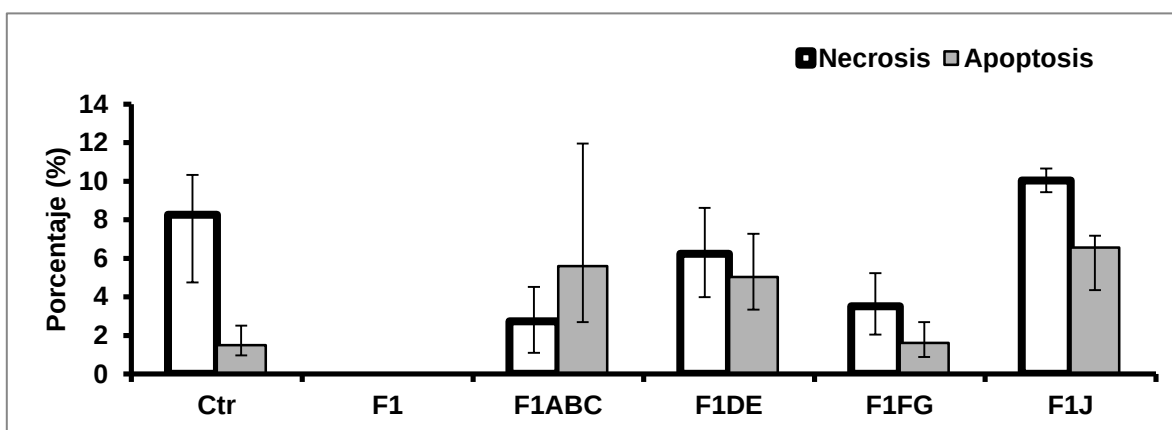


Gráfica 4A: Porcentaje de necrosis y **B)** apoptosis inducida en Neuro-2a por F1 (gris) a $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ durante 5 y 17 h de exposición. Las barras blancas muestran los controles. Los resultados representan la mediana de al menos 100 células contadas por campo al azar con sus intervalos de confianza al 95%.

Es de hacer notar que el cambio en los valores entre los controles es debido a un aumento significativo de la presencia de bacterias en el medio de incubación de las células, las cuales generan un estrés al medio celular y por consiguiente un aumento en la población de células no viables. La presencia de bacterias en el medio de cultivo es controlada con el uso de antibióticos, como se puede observar en el control 1, donde a 5 horas el porcentaje de muerte celular se encuentra en los valores esperados para un control, mientras que para el cultivo realizado como control 2 para los ensayos de citotoxicidad con las subfracciones de F1, se observa que estos controles difieren de manera significativa. Se determinó que la presencia de bacterias en el medio de incubación fue debido a que las bacterias habían generado resistencia a los antibióticos empleados, se buscó el origen de la contaminación y al no encontrar nada se cambió el antibiótico, a partir de ese momento se eliminó la presencia de bacterias en el medio. Esta información fue obtenida posterior al análisis de citotoxicidad, por lo que el ensayo de citotoxicidad con las subfracciones (donde todas las células se encuentran expuestas a la presencia de bacterias) es analizado empleando el control 2.



Gráfica 5: Porcentaje de necrosis (blanco) y apoptosis (gris) inducida en Neuro-2a por F1 y sus componentes a 1 µg/µL durante 5 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%.



Gráfica 6: Porcentaje de necrosis (blanco) y apoptosis (gris) inducida en Neuro-2a por F1 y sus componentes a 1 µg/µL durante 2,5 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%.

Todas las subfracciones mostraron una actividad apoptogénica, en menor y mayor medida, con pocas diferencias significativas entre ellas. Los resultados del efecto de la variación del tiempo de exposición a F1 y sus componentes demostraron que el efecto apoptogénico se ve pronunciado a las 2,5 h de exposición sobre los neuroblastomas. En el resto de los tiempos se observó un efecto muy pronunciado en la inducción de muerte celular, por lo que las condiciones de 5 y 17 h de exposición a la toxina no son óptimas para estudiar el efecto anticancerígeno en este tipo de células. La fracción $F1_{(H)}$ fue la que indujo el mayor porcentaje de apoptosis, pero con poca significancia estadística, en comparación a las demás subfracciones y respecto a los valores del control. Los valores de necrosis a 2,5 horas se mantienen elevados debido a la presencia de bacterias. Sin embargo es de hacer notar que en los ensayos de las subfracciones el efecto que generan estas toxinas es mayormente apoptogénico, dado que $F1_{(ABC)}$, $F1_{(DE)}$ y $F1_{(J)}$ inducen una apoptosis mayor que los valores de apoptosis del control.

Era de esperarse que a partir de las 2.5 h, el índice de muerte celular siguiera aumentando en función del tiempo. Se presume que la disminución de la proporción de muerte a las 5 y 17 h en comparación a las 2,5 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.

2) Efecto de F1 sobre MA104

La Ilustración 11 muestra el efecto de F1 a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ durante 2.5 h de exposición sobre las células de riñón de mono (MA104). Se observó que no hay diferencia significativa entre las células control y las expuestas a la toxina.

La Gráfica 7 muestra el efecto sobre el porcentaje de apoptosis y necrosis inducido por F1 a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ durante 2.5 h de exposición sobre las MA104. Se obtuvo que el porcentaje de apoptosis en las MA104 para F1 de 0,00 (0,00; ,000) % mientras que para el control fue de 0,00 (0,00; 0,00) %. Para el porcentaje de necrosis, se obtuvo un 2,04 (1,20; 2,78) % para F1 y para el control de 3,92 (3,06; 4,49) %. No se observó alguna diferencia significativa en comparación al control para ningún tipo de muerte celular.

A fin de estudiar si F1 y su componente mayoritario tenían efecto citotóxico en células sanas, se estudió su efecto sobre cultivos primarios de células de riñón de mono MA104. Los resultados demuestran que F1 no tiene un efecto apoptogénico dosis-dependiente en estas células, ya que el porcentaje de apoptosis y de necrosis se mantuvo semejante al control, lo cual indica que ningún componente de F1 tiene actividad sobre estas células sanas, otorgándole a esta fracción ventaja como droga anticancerígena.

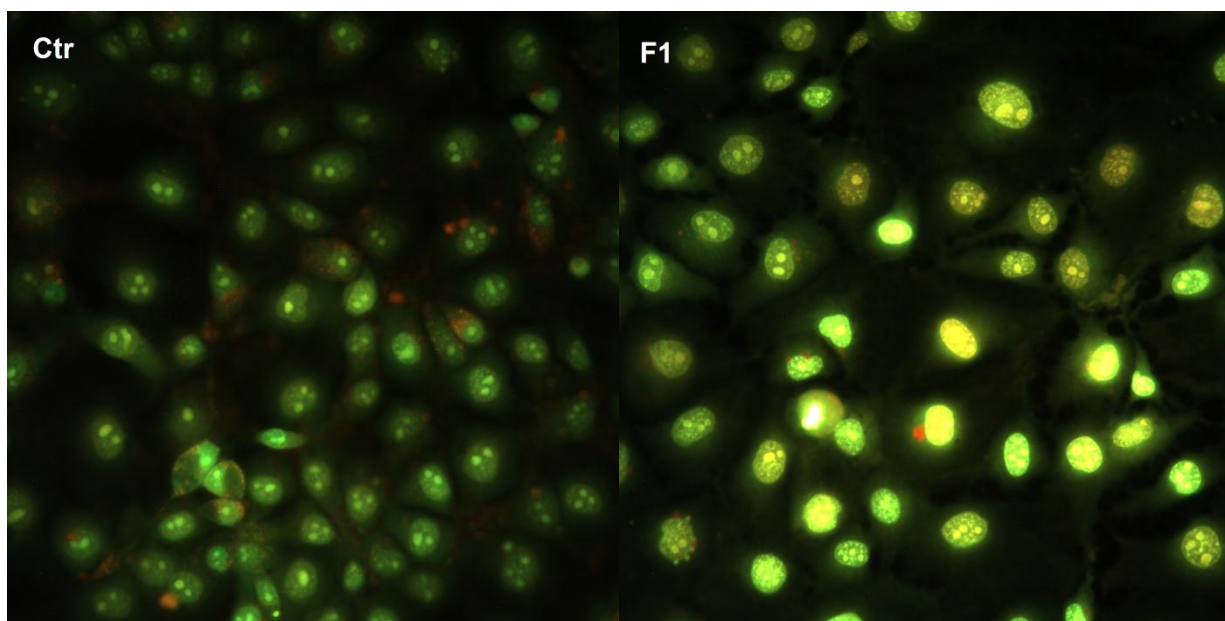
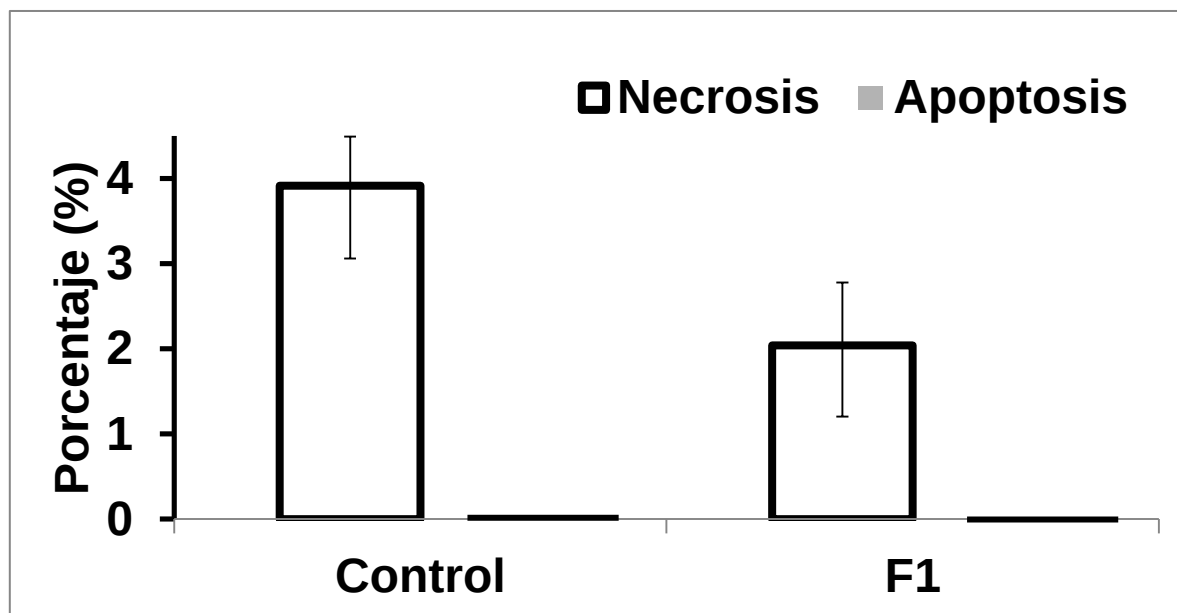


Ilustración 11 Microfotografías de MA104 expuestas durante 2.5 h a F1 a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Ctr: control; Se observan células viables de color verde. Escala 50 μm



Gráfica 7: Efecto de F1 en el porcentaje de apoptosis de MA104 durante 2.5 h de exposición. El efecto de F1 se estudió 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. La columna blanca muestra el control. Los resultados representan la mediana de al menos 10 células contadas por campo con su intervalo de confianza al 95 %

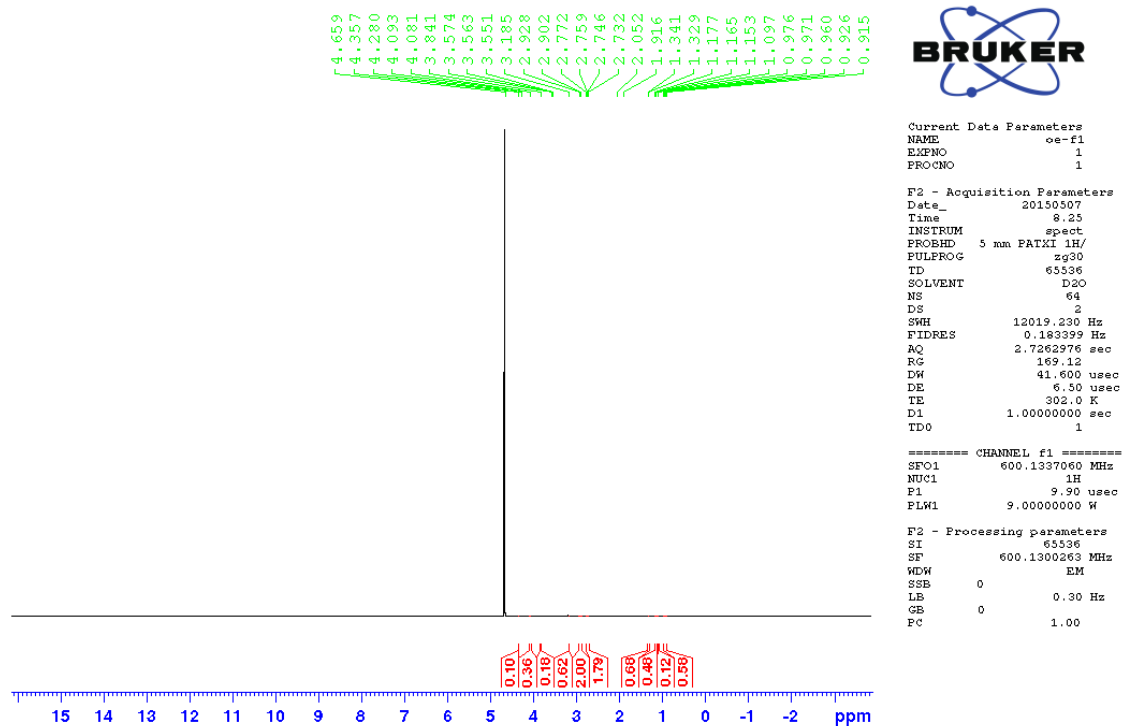
Caracterización estructural

1) Análisis de los espectros de RMN- ^1H

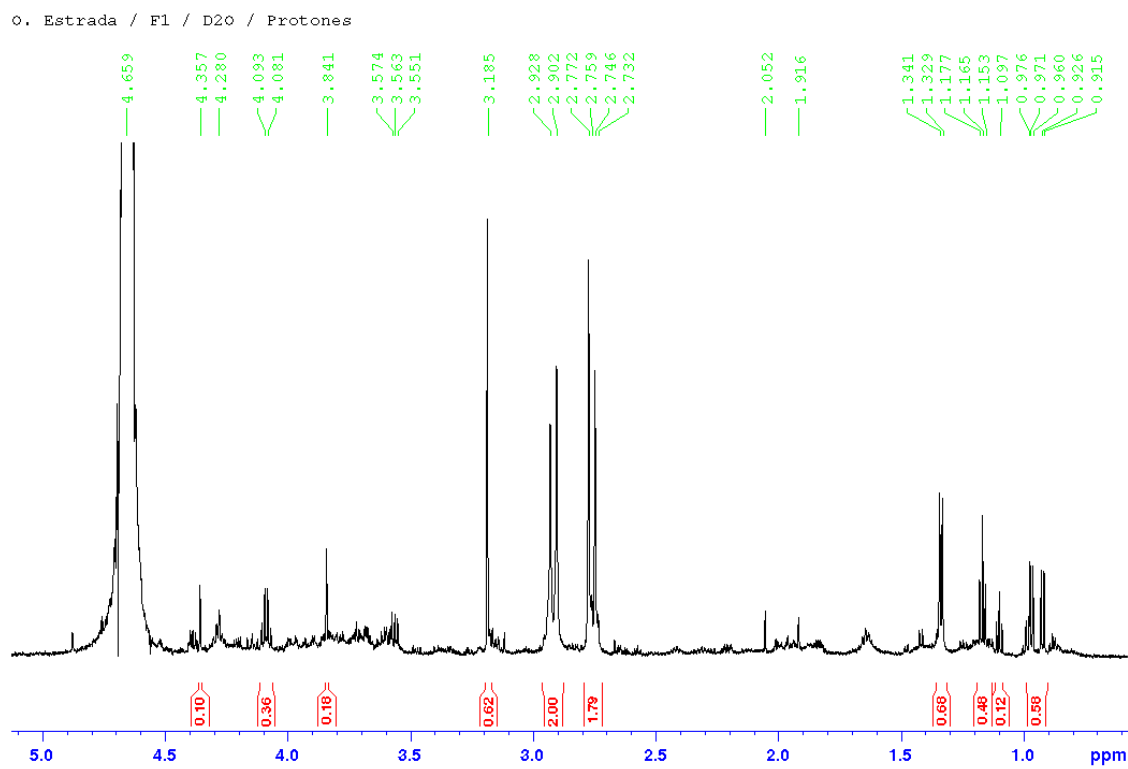
Los distintos espectros de RMN- ^1H son presentados entre las Gráficas 12 y 29.

De la gráfica 12 a la gráfica 16, se presentan los espectro de RMN de protones para la muestra F1, con sus subsiguientes ampliaciones, obtenidos en un espectrómetro de 600 MHz, denominado espectro N1. En el espectro obtenido, se observan las señales de protones alifáticos entre 0 y 4 ppm, entre 6 y 8 ppm se observan los protones aromáticos. Debido a que los espectros fueron tomados en agua deuterada (D_2O) no se observa la presencia de protones acídicos, ya que los protones lábiles se intercambian por átomos de deuterio y los espectros de ^1H contienen sólo las líneas de resonancia (señales) de los átomos de hidrógeno no lábiles unidos a átomos de carbono. De la gráfica 17 a la gráfica 21, se presentan los espectros de RMN de protones para la muestra F1, con sus subsiguientes ampliaciones, obtenidos en el resonador de 600 MHz, obtenidos con una supresión de solvente, denominado espectro N2.

O. Estrada / F1 / D2O / Protones

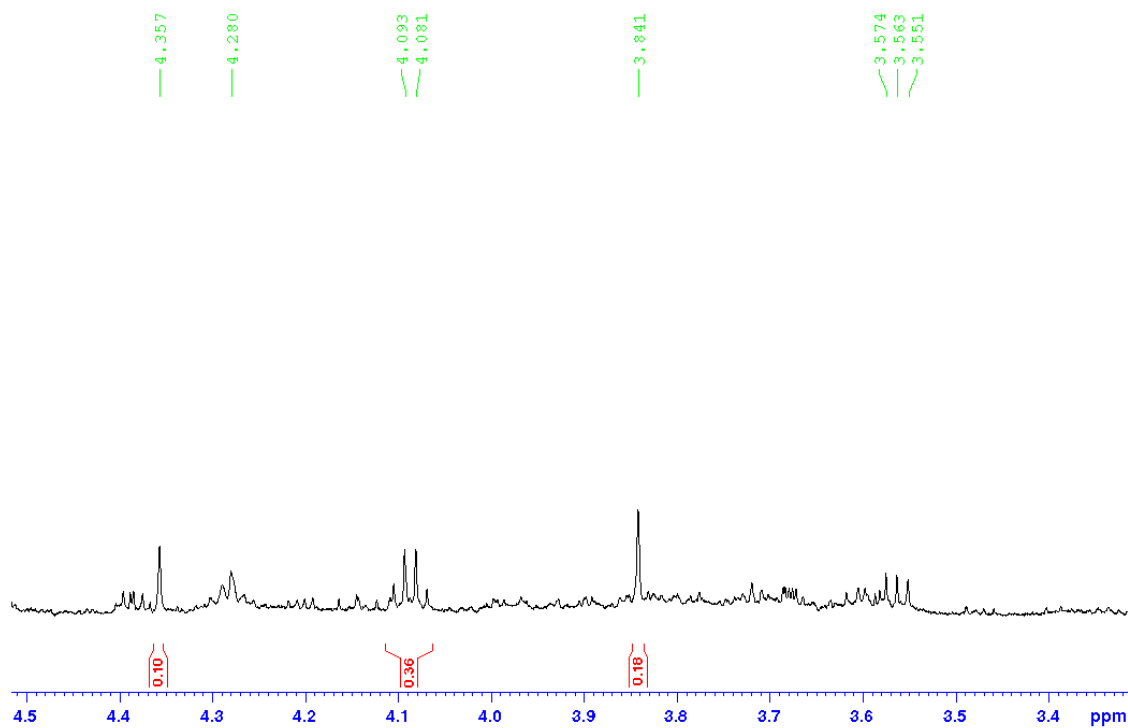


Gráfica 12: Espectro N1 de RMN-¹H.

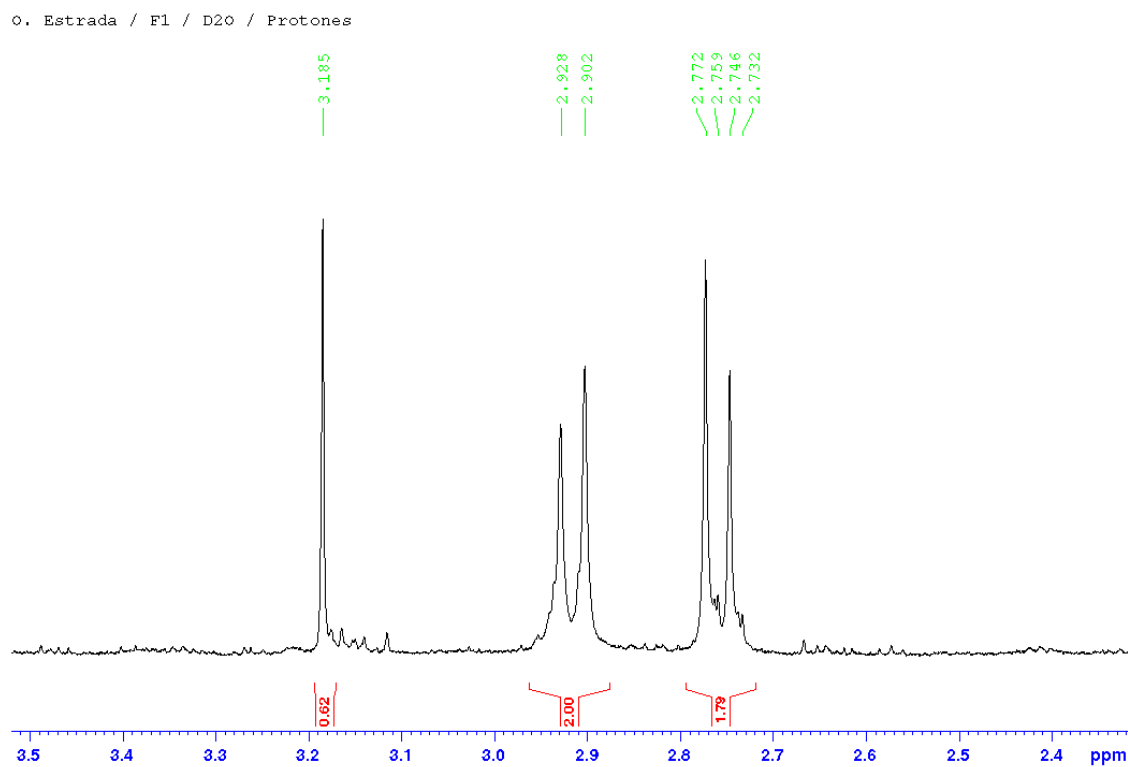


Gráfica 13: Ampliación del espectro N1 entre 0 y 5 ppm.

O. Estrada / F1 / D2O / Protones

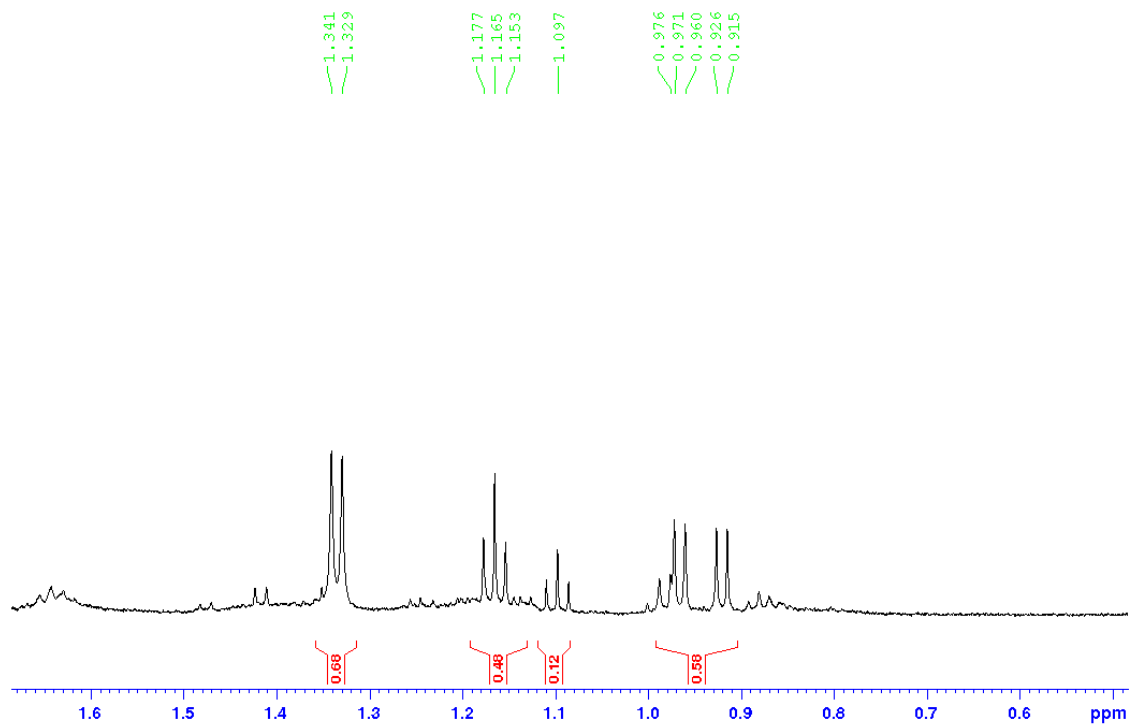


Gráfica 14: Ampliación del espectro N1 entre 3.3 y 4.5 ppm.



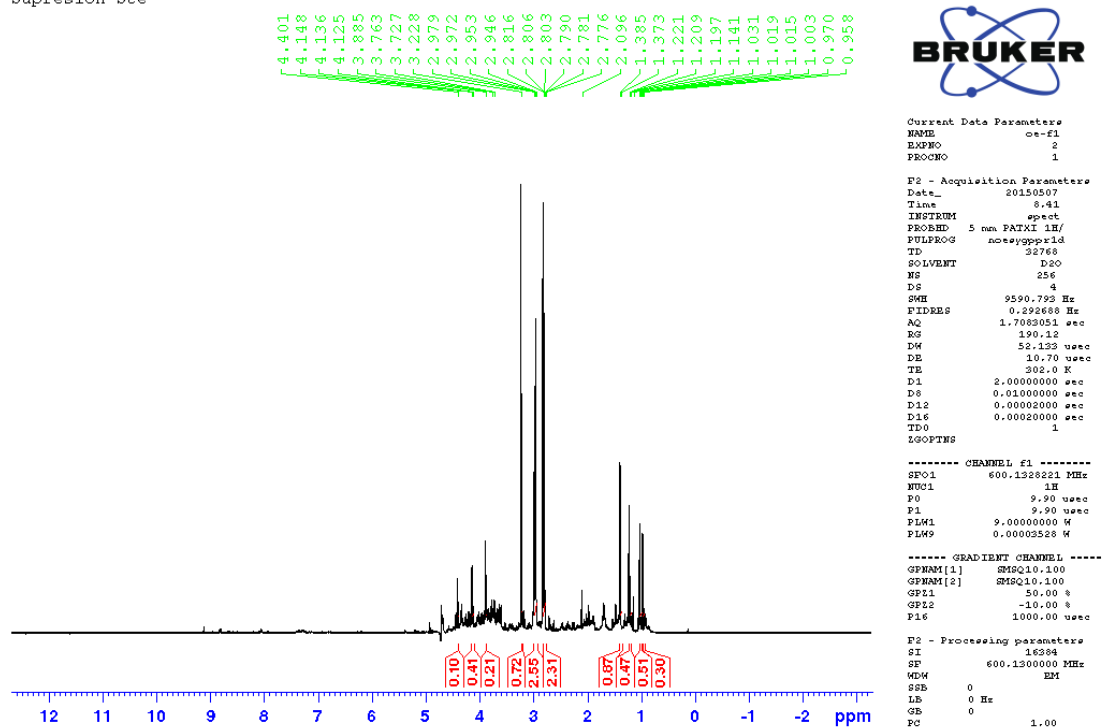
Gráfica 15: Ampliación del espectro N1 entre 2.3 y 3.5 ppm.

O. Estrada / F1 / D2O / Protones

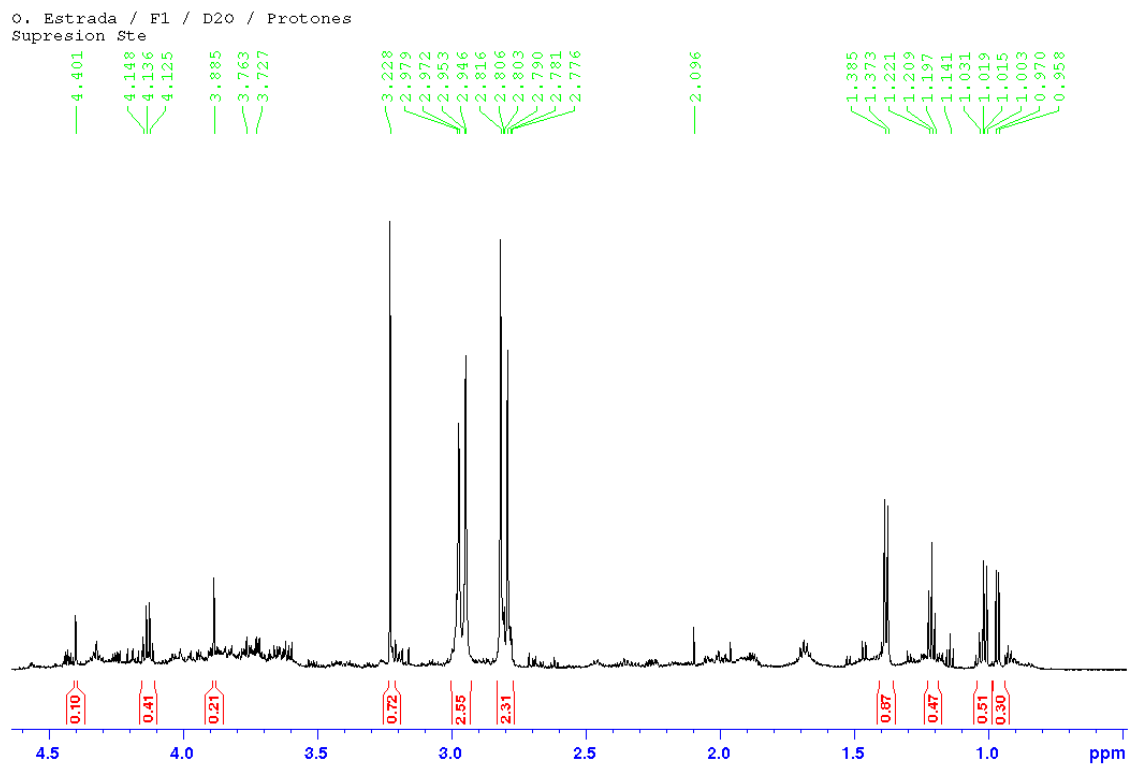


Gráfica 16: Ampliación del espectro N1 entre 0.5 y 1.7 ppm.

O. Estrada / F1 / D2O / Protones
Supresion Ste

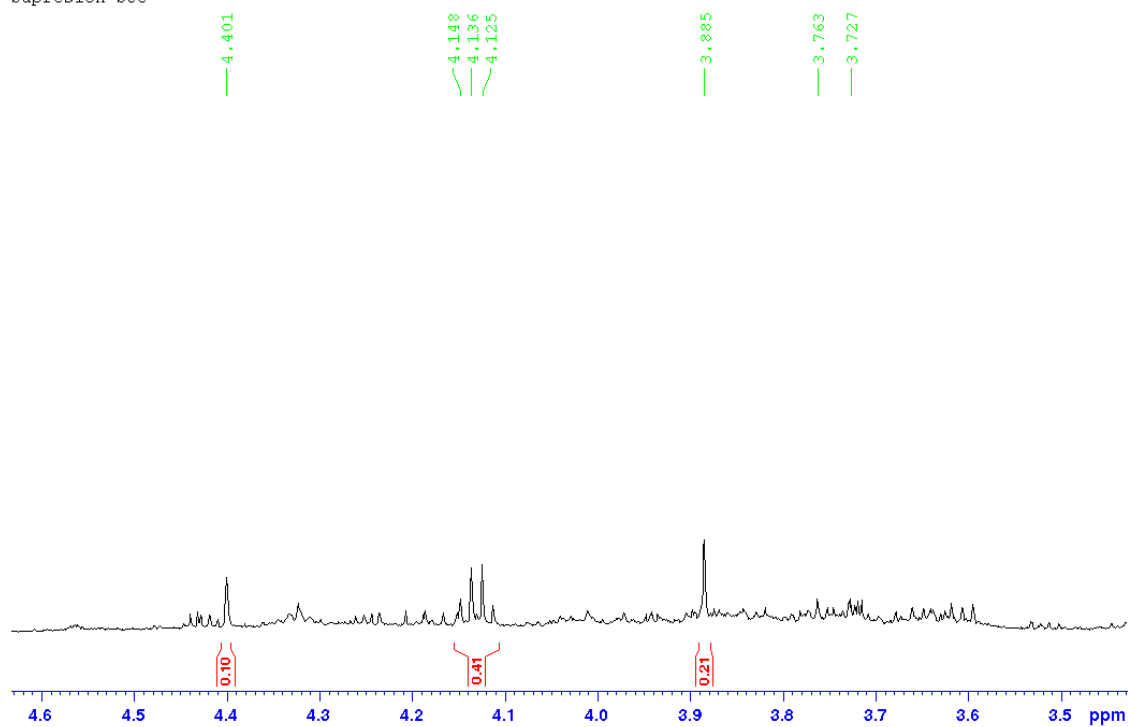


Gráfica 17: Espectro N2 de RMN-¹H.

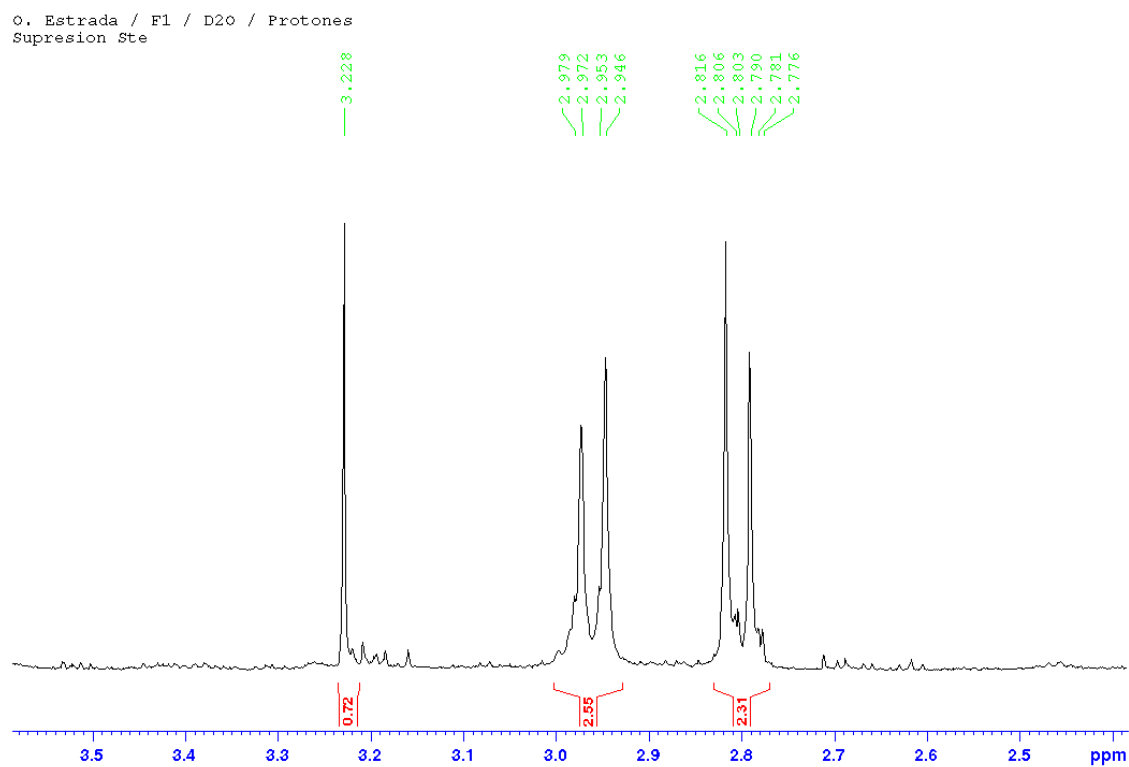


Gráfica 18: Ampliación del espectro N2 entre 0 y 4.

O. Estrada / F1 / D2O / Protones
Supresion Ste

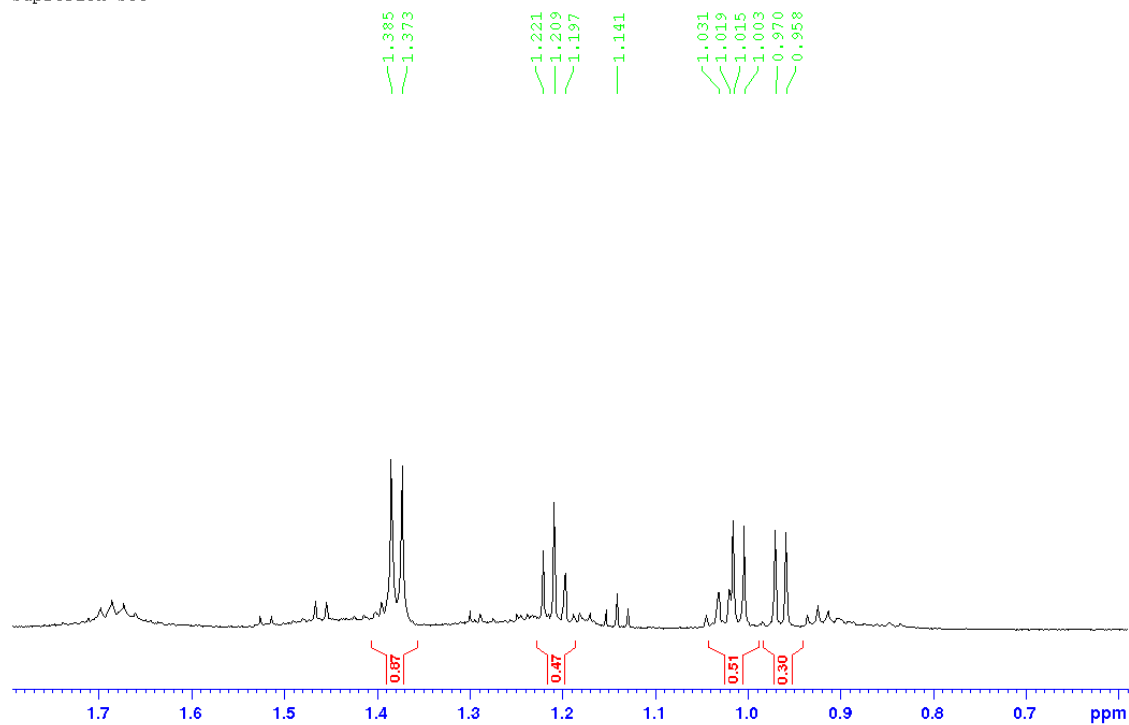


Gráfica 19: Ampliación del espectro de N2 entre 3.4 y 4.6 ppm.



Gráfica 20: Ampliación del espectro de N2 entre 2.4 y 3.5 ppm.

O. Estrada / F1 / D2O / Protones
Supresion Ste



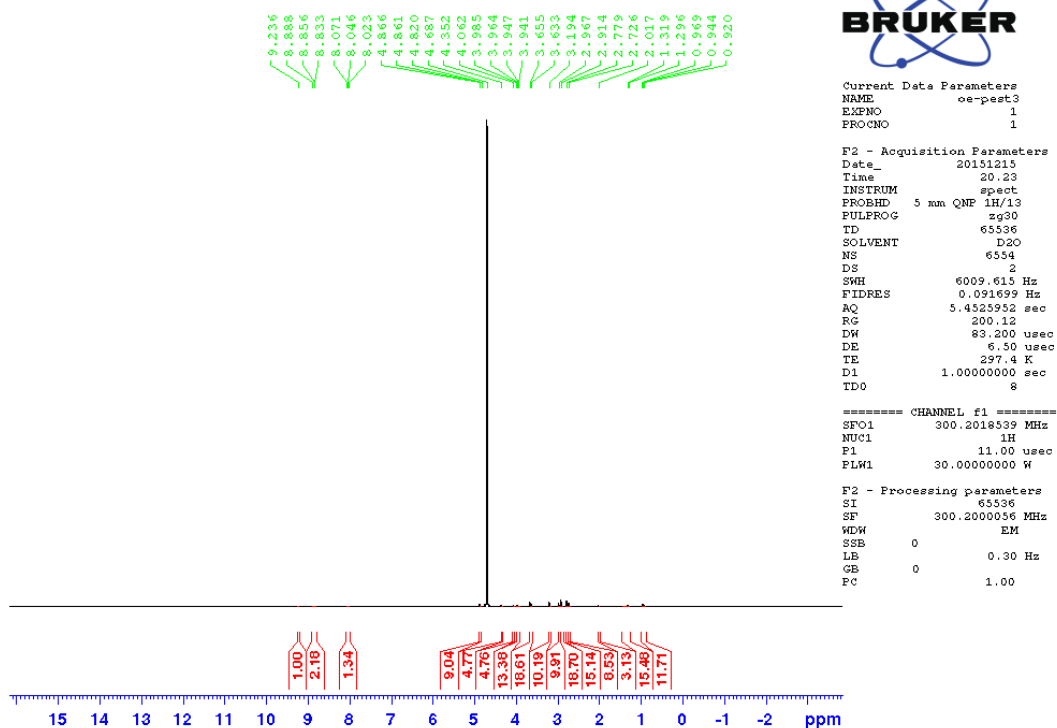
Gráfica 21: Ampliación del espectro N2 entre 0.6 y 1.7 ppm.

La posible composición de la muestra F1 es de origen proteico, por lo que las señales características de los grupos R de los aminoácidos que forman parte de la estructura deben estar presentes en las señales del espectro. Estas señales no deben sufrir mayores alteraciones en sus desplazamientos químicos ya que estos grupos se mantienen sin modificación a lo largo de la formación de los enlaces peptídicos y puede considerarse que no existe influencia significativa de los grupos carboxilo o amino-terminal. Esta información es corroborada realizando una estimación de espectros por medio de un modelador en línea (http://www.nmrdb.org/new_predictor/index.shtml?v=v2.34.2) el cual permite estimar teóricamente las señales de los protones de estos grupos R de los aminoácidos y son comparados con los valores reportados en la bibliografía ^[41].

Los protones alfa de los aminoácidos se encuentran presentes en una zona entre 3.5 ppm y los 5 ppm, mientras que los protones no intercambiables de la amida (-NH) son desplazados a la zona aromática a campo alto entre los 7,5 y 8,5 ppm ^[42-45] por lo que la identificación de señales características en estas zonas permite identificar la cantidad de aminoácidos y su correlación. Entre la zona del espectro donde se encuentran las señales características de los protones alfa de los aminoácidos se encuentra la señal del solvente, interfiriendo el reconocimiento de los protones alfa presentes en la muestra por lo que la siguiente medida se realizó con supresión de solvente de manera que permitiese reconocer las posibles señales presentes. En la ampliación del espectro, podemos ver que las señales a campo alto obtenidas en el espectro N1 y el espectro N2, se mantienen en los picos observados de 0.95ppm, 1.1 ppm, 1.15ppm, 1.3ppm, 2.8 ppm, 2.9 ppm, 3.2ppm, 3.9 ppm, 4.15 ppm y 4.4ppm.

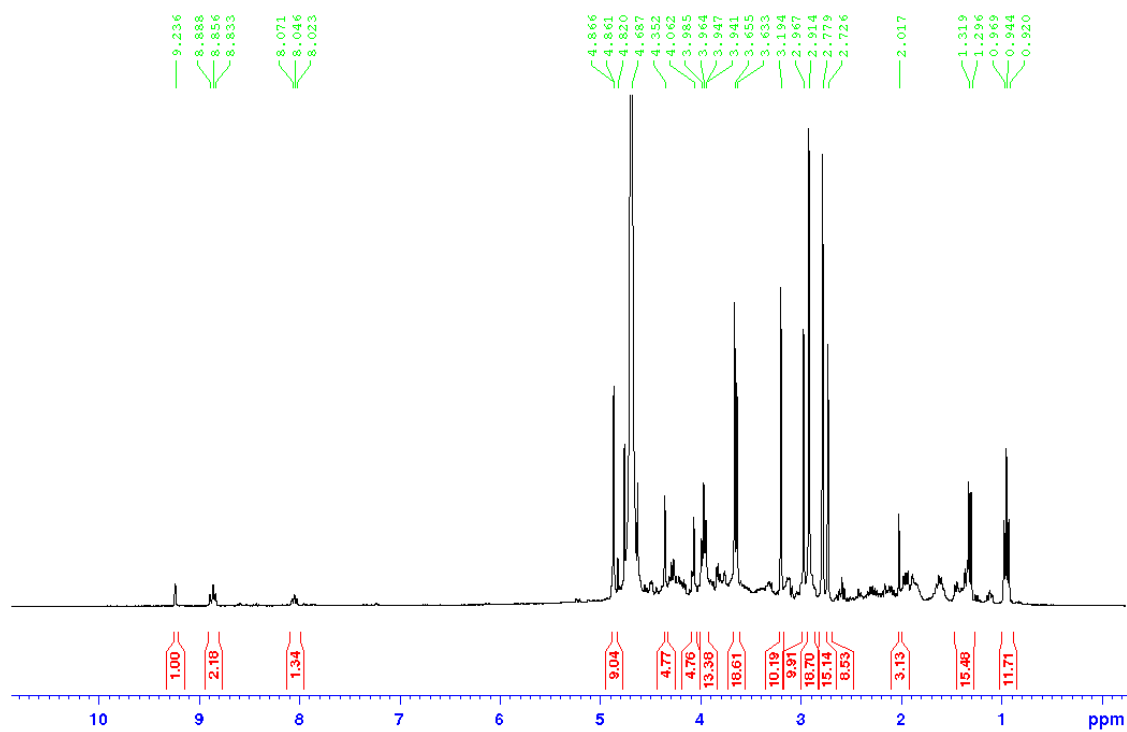
Los espectros obtenidos posteriormente fueron tomados con un espectrómetro de 300 MHz. De la gráfica 22 a la gráfica 25 se observan los espectros medidos a la muestra F1 con sus diferentes ampliaciones, denominados como espectro N3. De la gráfica 26 a la gráfica 29 se observan los espectros medidos a la muestra F1 por supresión de solvente con sus diferentes ampliaciones, denominados como espectro N4.

O. Estrada / Pest-3 / D2O / Protones

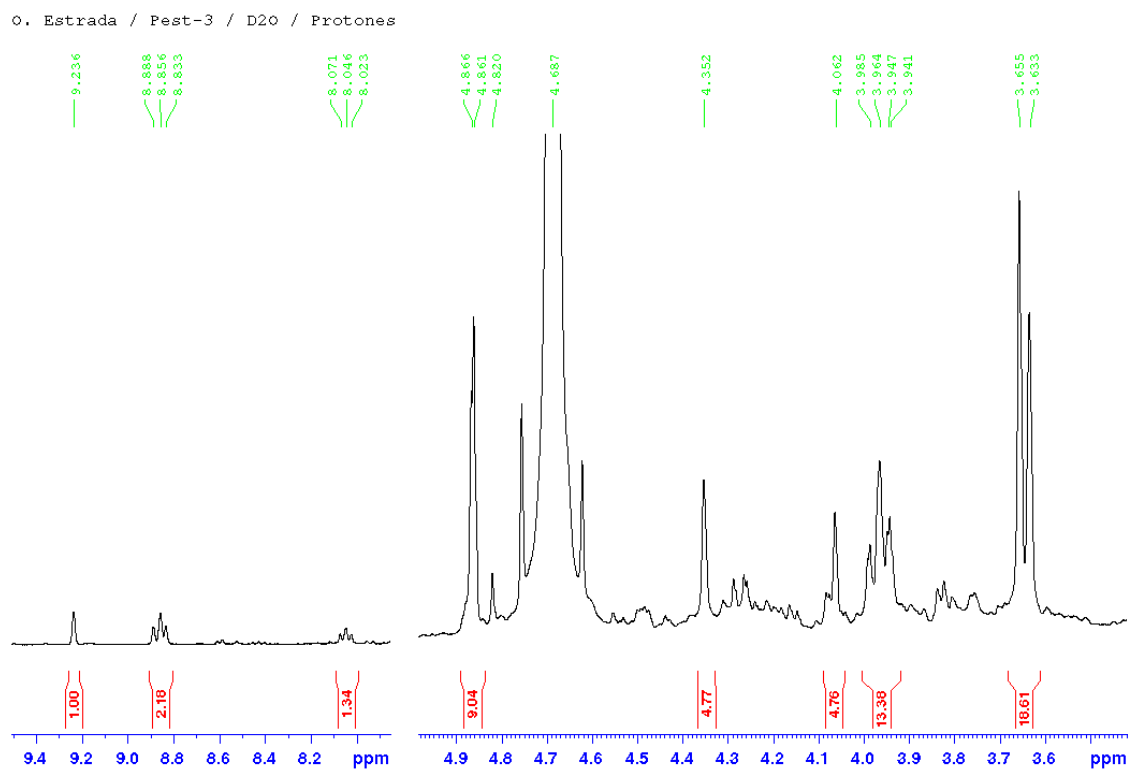


Gráfica 22: Espectro N3 de RMN-¹H.

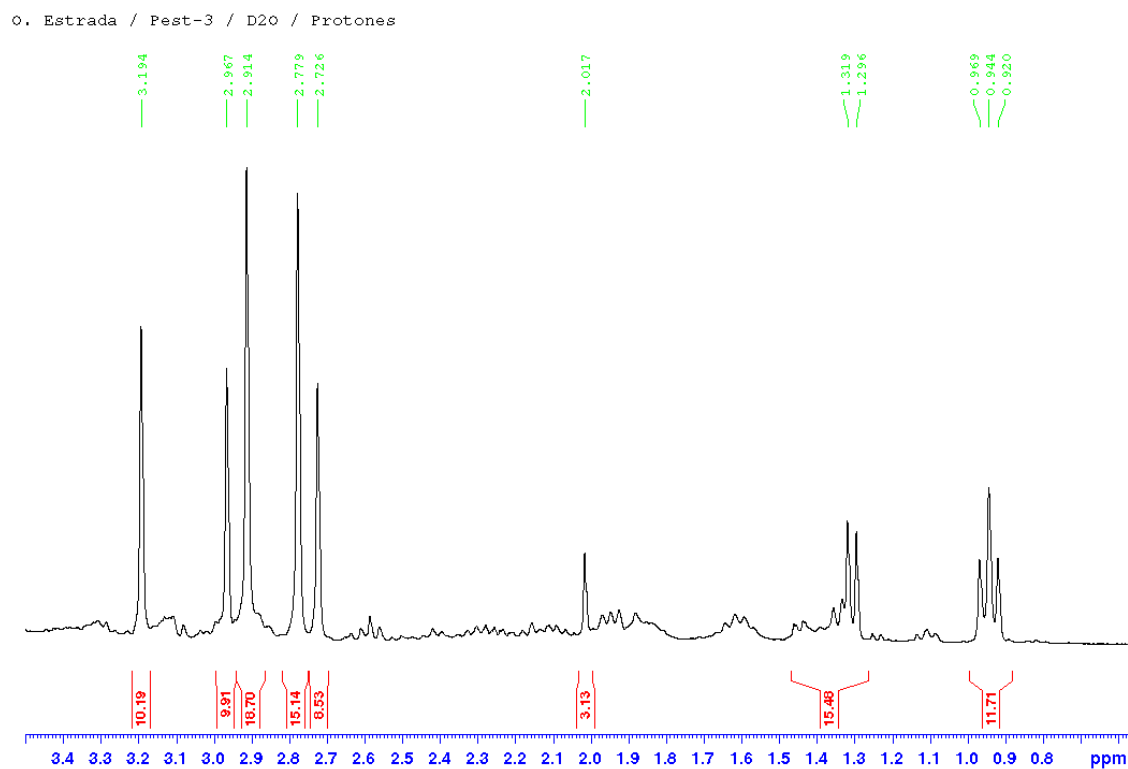
O. Estrada / Pest-3 / D2O / Protones



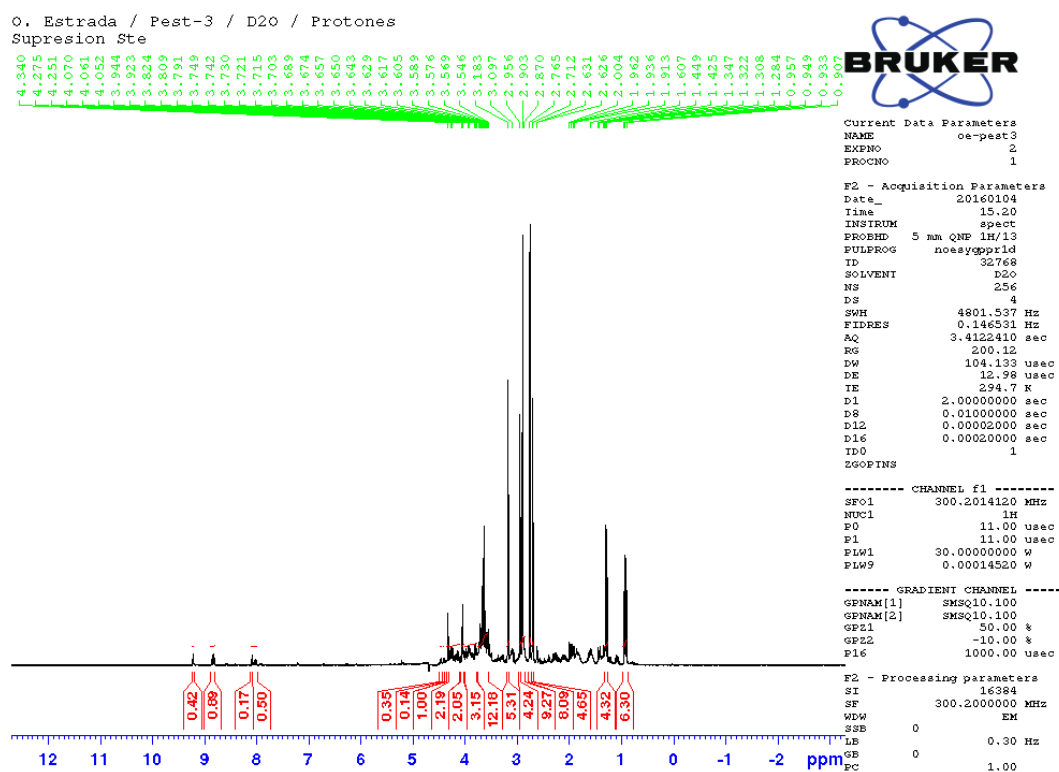
Gráfica 23: Ampliación del espectro N3 entre 0 y 10 ppm.

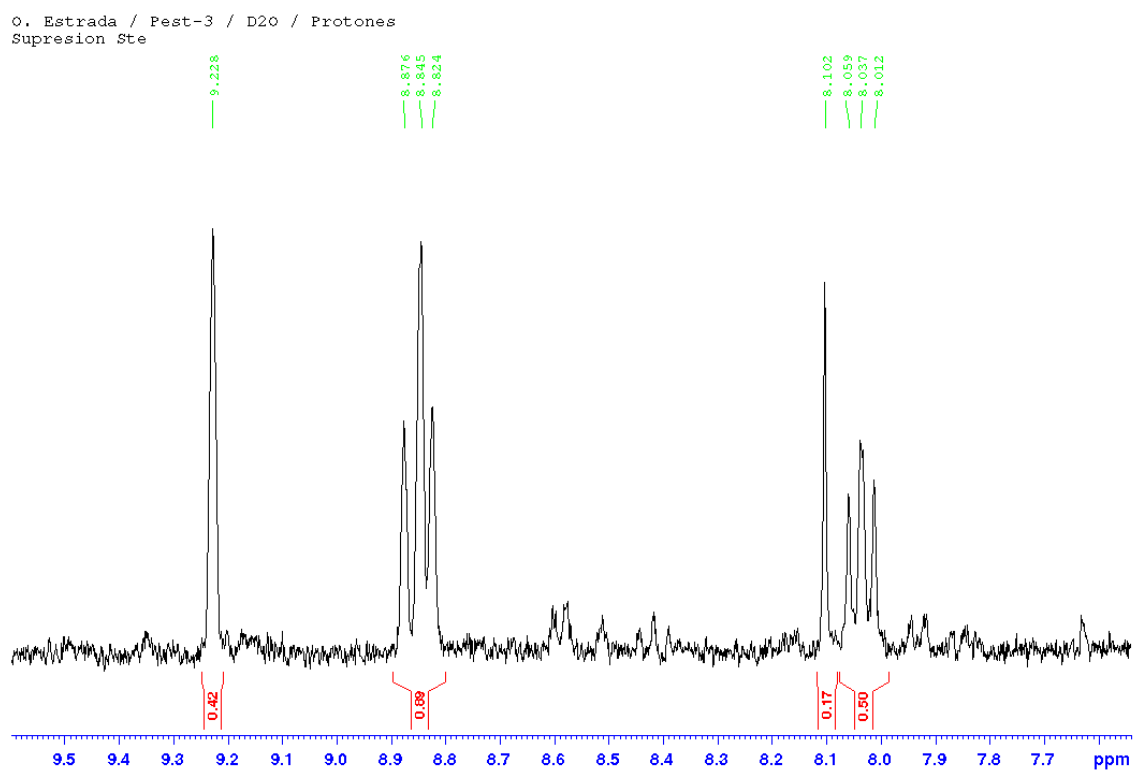


Gráfica 24: Ampliación del espectro N3 entre 3.5 y 4.9 ppm, incluyendo la zona de campo bajo de 8.1 a 9.4 ppm.



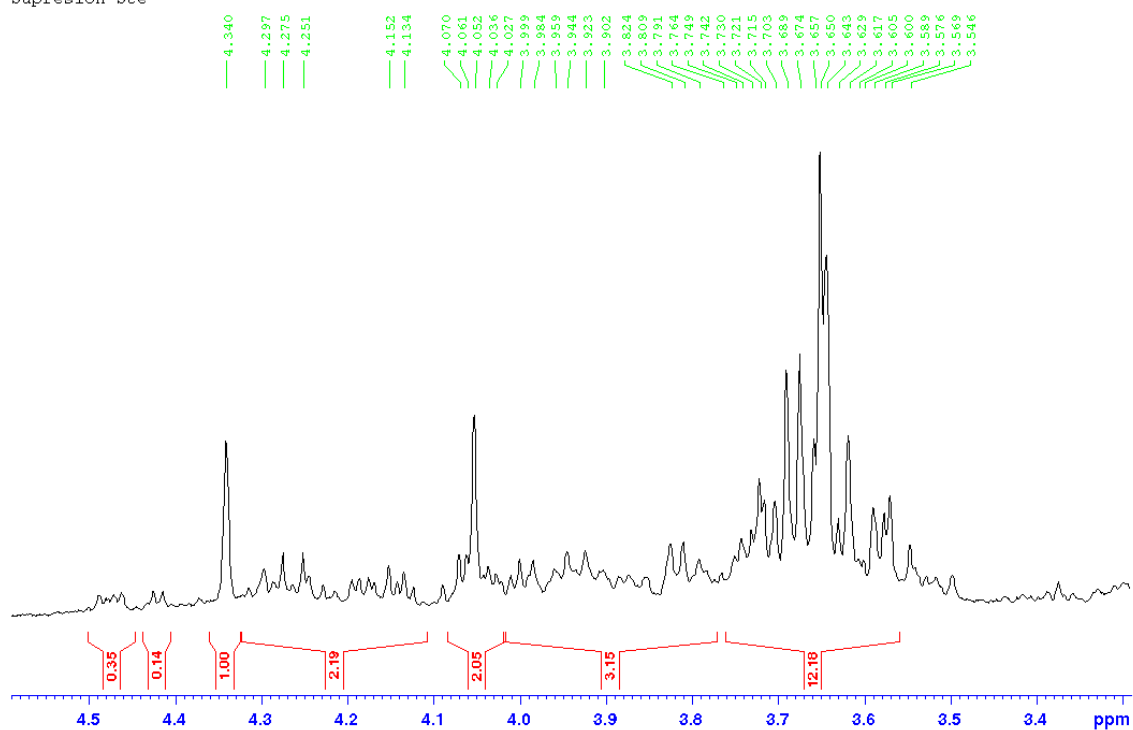
Gráfica 25: Ampliación del espectro N3 entre 0.6 y 3.4 ppm.

Gráfica 26: Espectro N4 de RMN-¹H.



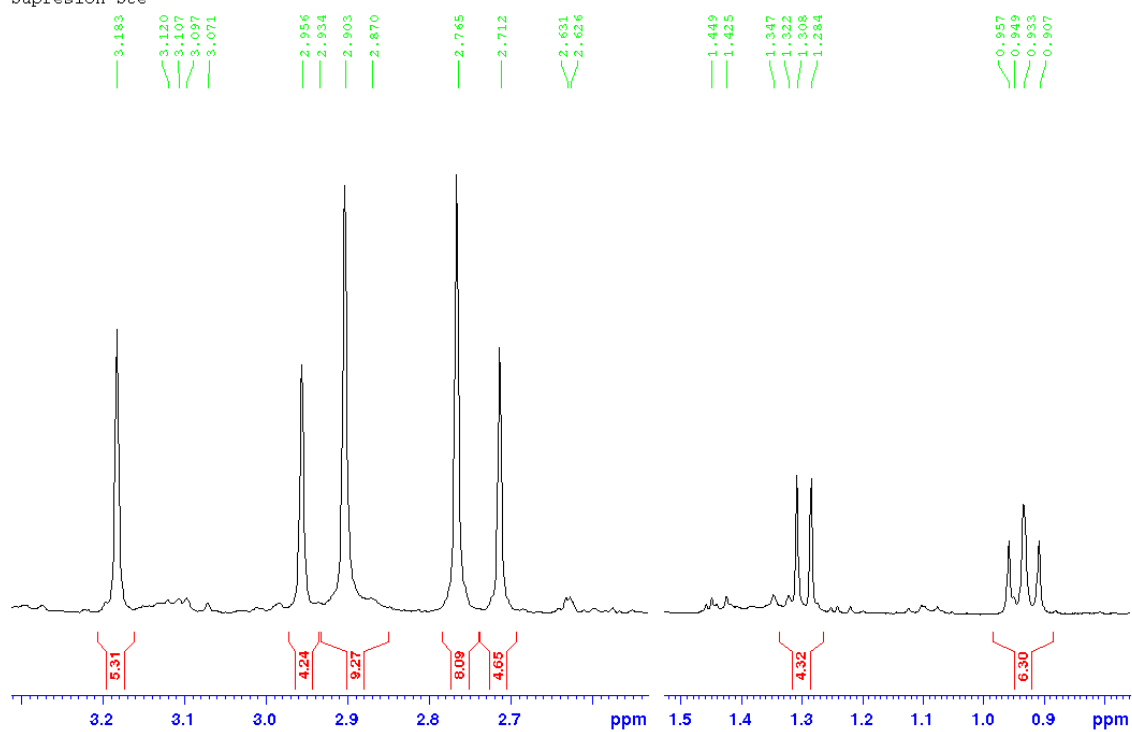
Gráfica 27: Ampliación del espectro N4 entre 7.6 y 9.5 ppm.

O. Estrada / Pest-3 / D2O / Protones
Supresion Ste



Gráfica 28: Ampliación del espectro N4 entre 3.3 y 4.5 ppm.

O. Estrada / Pest-3 / D2O / Protones
Supresion Ste

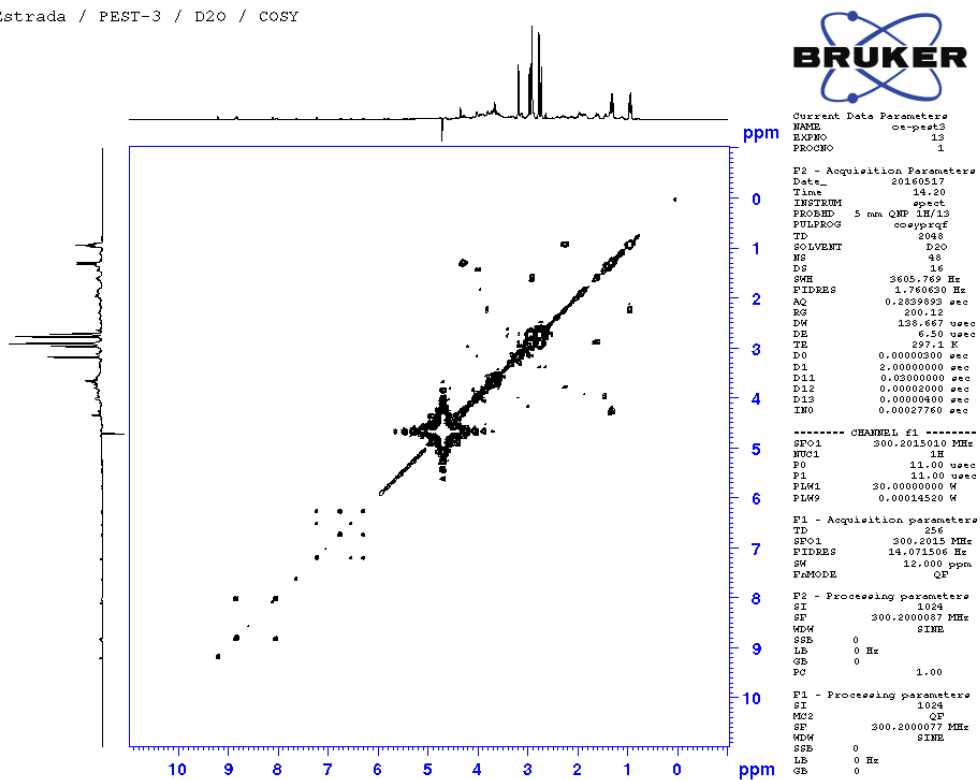


Gráfica 29: Ampliación del espectro N4 entre 0.8 y 1.5 ppm, incluyendo la zona de campo alto de 2.6 a 3.2 ppm.

Para el espectro N3 se observa la interferencia del solvente en la región de señales de los hidrógenos alfa, por lo que se requiere la supresión del mismo para poder reconocer las posibles señales solapadas en dicha zona. En el espectro N4 se puede observar la presencia de señales superpuestas en la región de los hidrógenos alfa, por lo que la resolución de las señales no es tan efectiva como para los espectros N1 y N2. Se observa la presencia de los picos característicos de la muestra ligeramente desplazados, pero con igual multiplicidad, por lo que se puede inferir que estos picos son los que componen el compuesto mayoritario de la fracción F1, los cuales estarían relacionados con la subfracción F1_(DE) y F1_(FG).

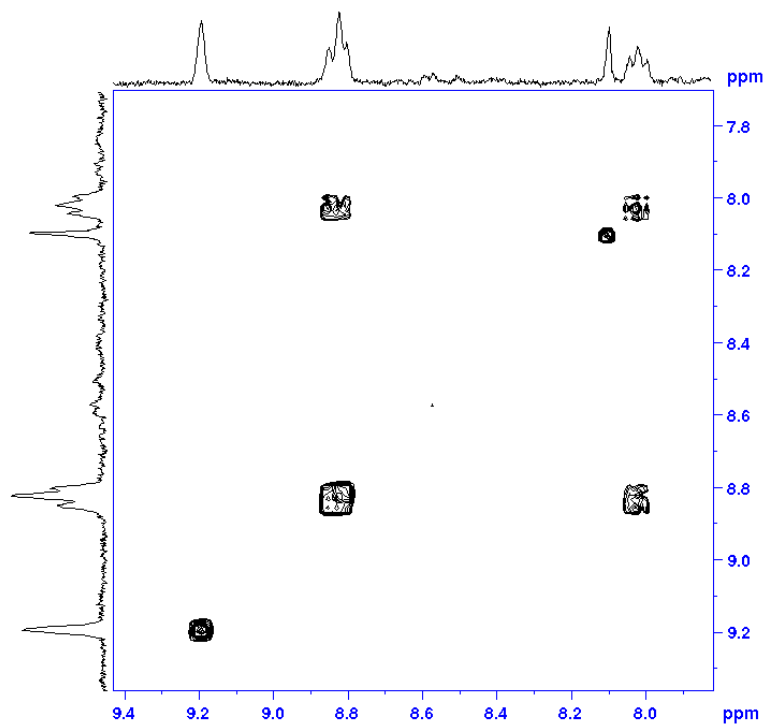
La presencia de señales débiles características de los protones no intercambiables de la amida en la zona de campo bajo del espectro, permite relacionar la presencia de los posibles aminoácidos presentes en la estructura. Dependiendo de la correlación observada entre las señales se podrá proponer la presencia y la posible combinación entre las unidades de aminoácido presentes en el péptido. De la gráfica 30 a la 36 se observan los espectros de correlación homonuclear (COSY) y de la gráfica 37 a la 44, los espectros de correlación homonuclear total (TOCSY).

O. Estrada / PEST-3 / D2O / COSY



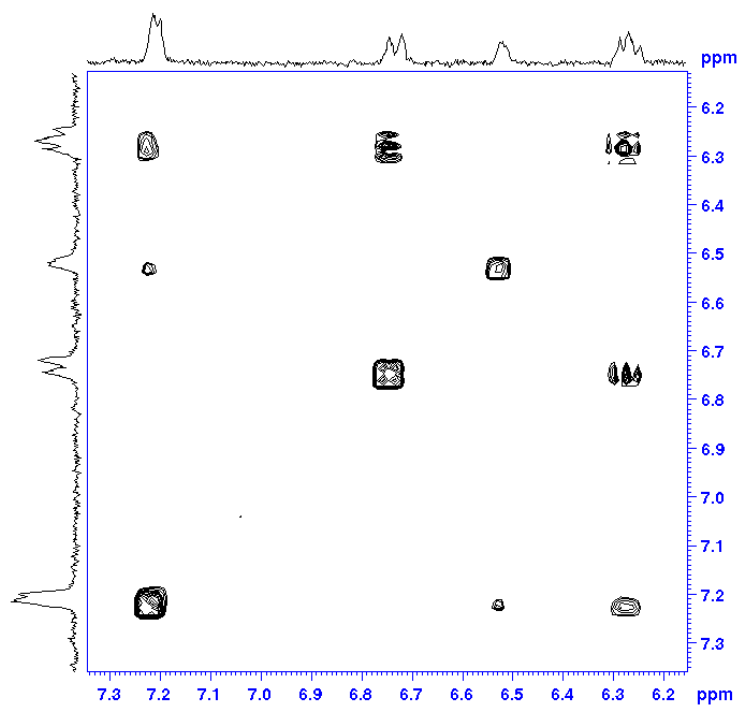
Gráfica 30. COSY de F1 medido a 300 MHz.

0. Estrada / PEST-3 / D2O / COSY



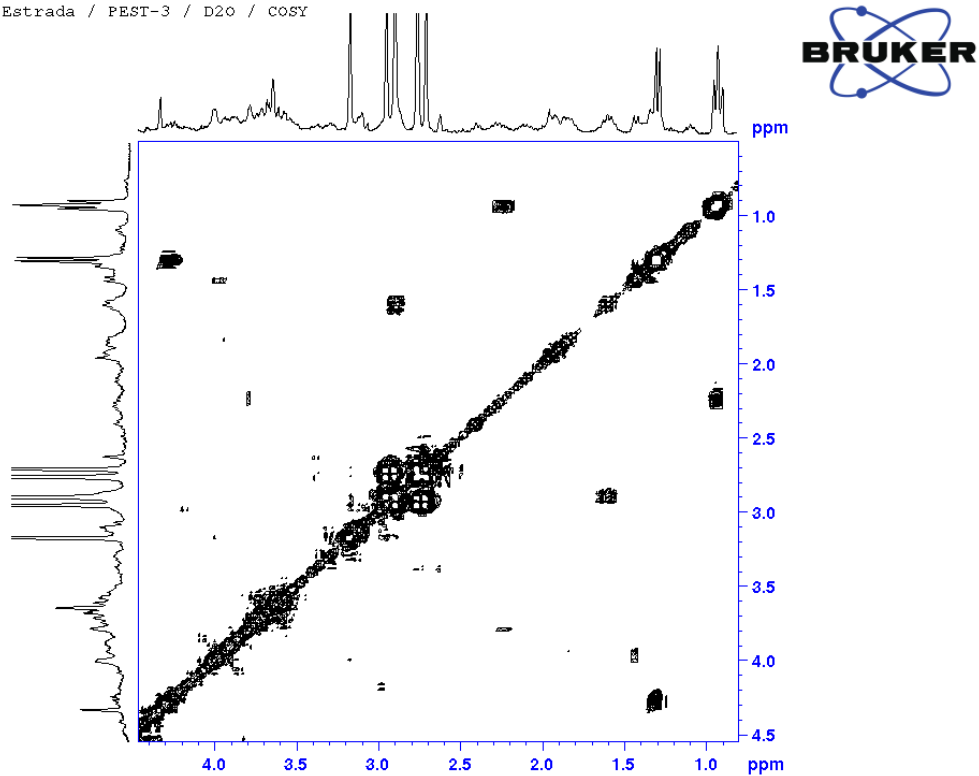
Gráfica 31. Ampliación del COSY entre las zonas de 7,8 y 9,2 ppm contra 8,0 y 9,4 ppm.

0. Estrada / PEST-3 / D2O / COSY



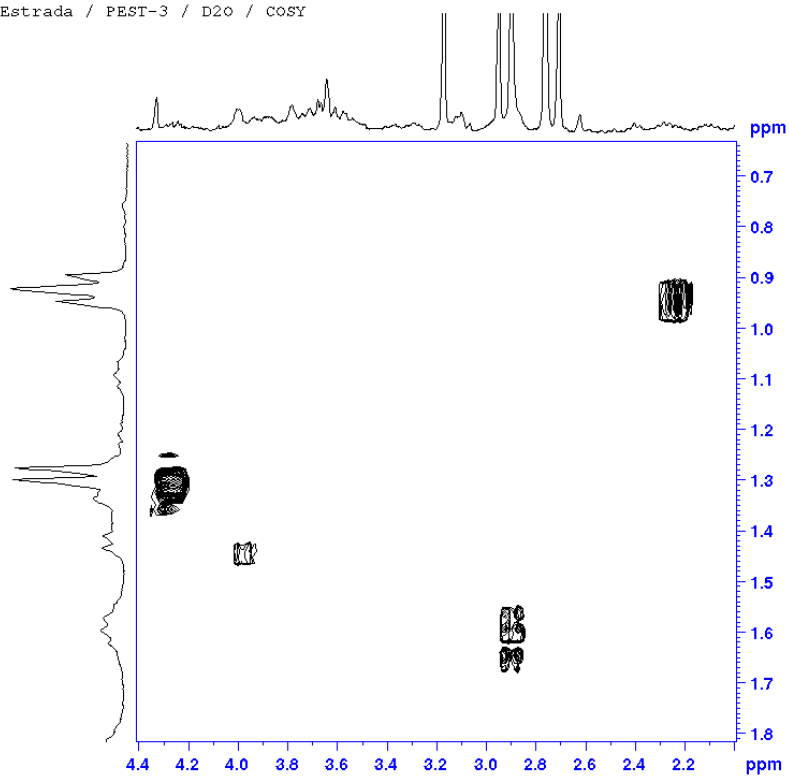
Gráfica 32. Ampliación del COSY entre las zonas de 6,2 y 7,3 ppm contra 6,2 y 7,3 ppm.

o. Estrada / PEST-3 / D2O / COSY



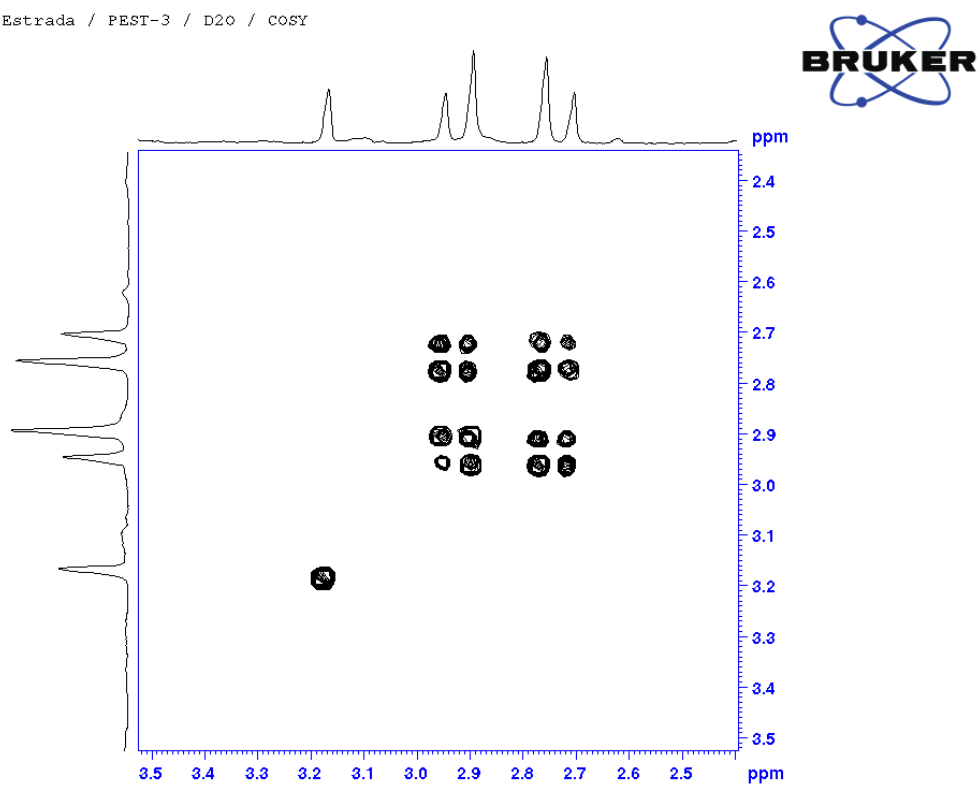
Gráfica 33. Ampliación del COSY entre las zonas de 1,0 y 4,5 ppm contra 1,0 y 4,0 ppm.

O. Estrada / PEST-3 / D2O / COSY



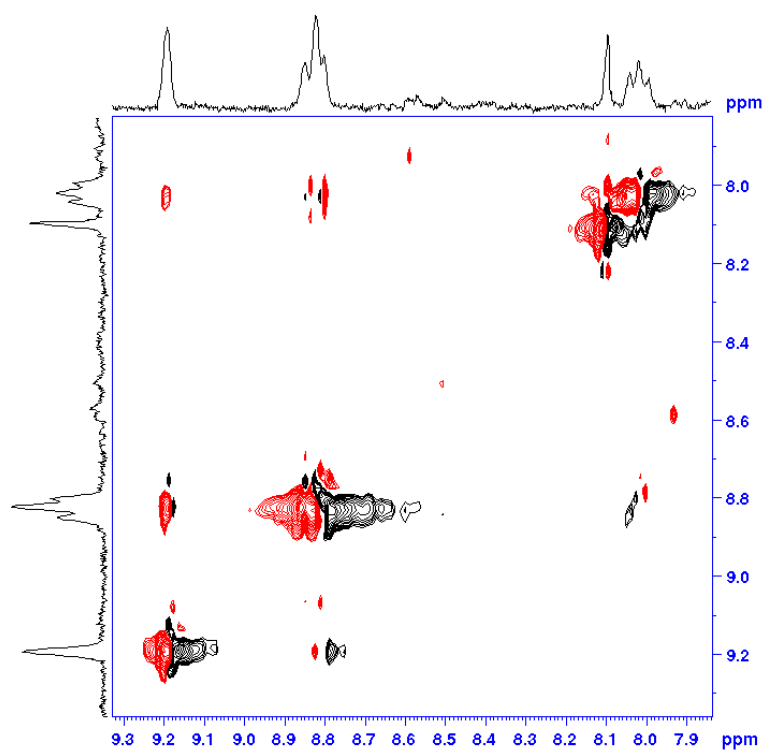
Gráfica 34. Ampliación del COSY entre las zonas de 0,7 y 1,8 ppm contra 2,2 y 4,4 ppm.

O. Estrada / PEST-3 / D₂O / COSY



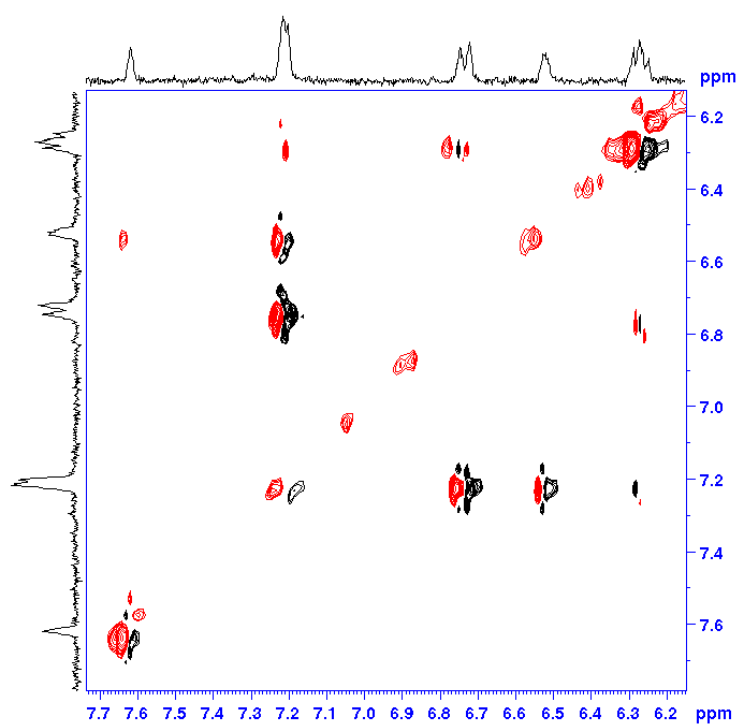
Gráfica 35. Ampliación del COSY entre las zonas de 2,4 y 3,5 ppm contra 252 y 3,5 ppm.

o. Estrada / PEST-3 / D2O / TOCSY



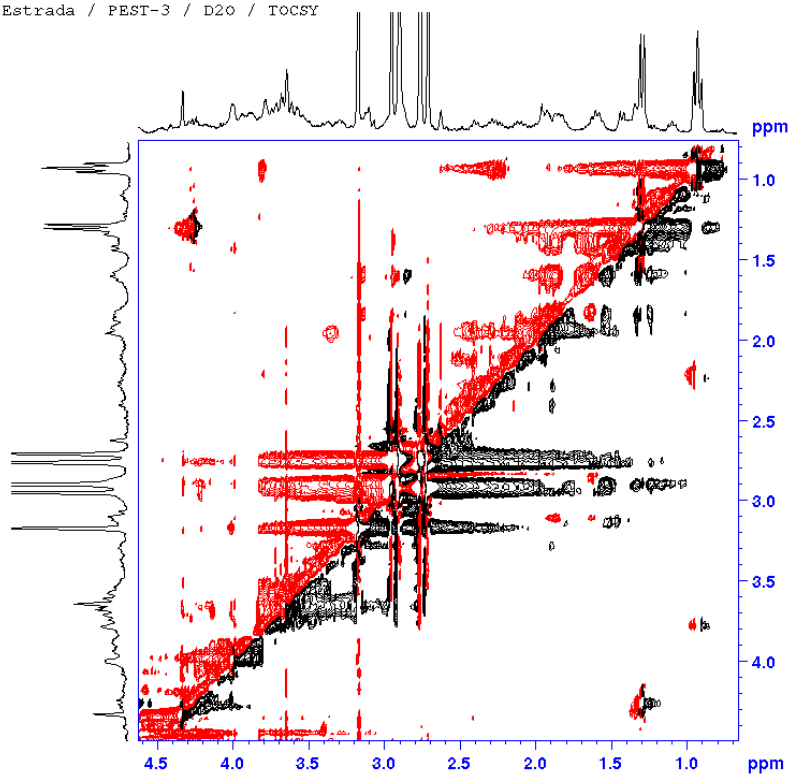
Gráfica 37. Ampliación del TOCSY entre las zonas de 8,0 y 9,2 ppm contra 7,9 y 9,3 ppm.

o. Estrada / PEST-3 / D2O / TOCSY



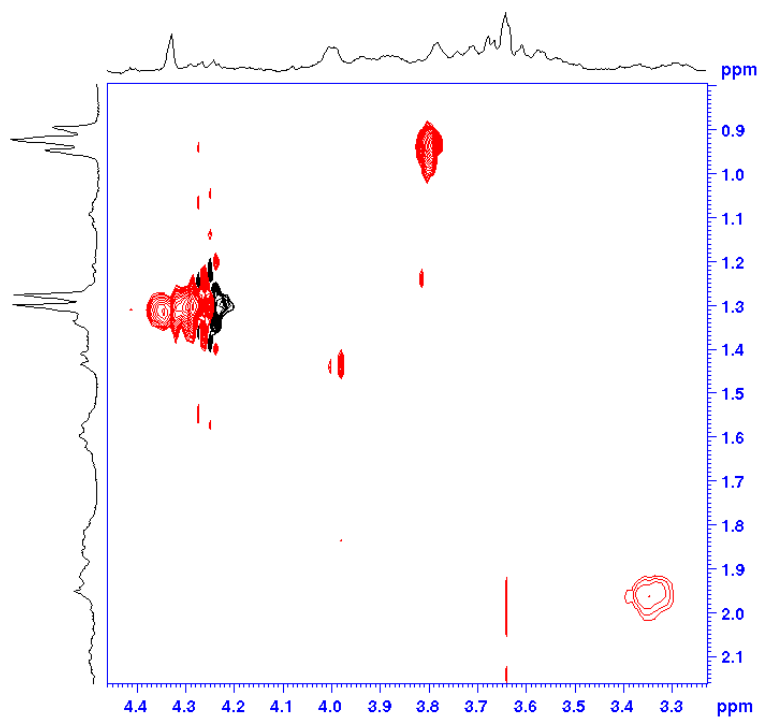
Gráfica 38. Ampliación del TOCSY entre las zonas de 6,2 y 7,4 ppm contra 6,2 y 7,7 ppm.

O. Estrada / PEST-3 / D2O / TOCSY



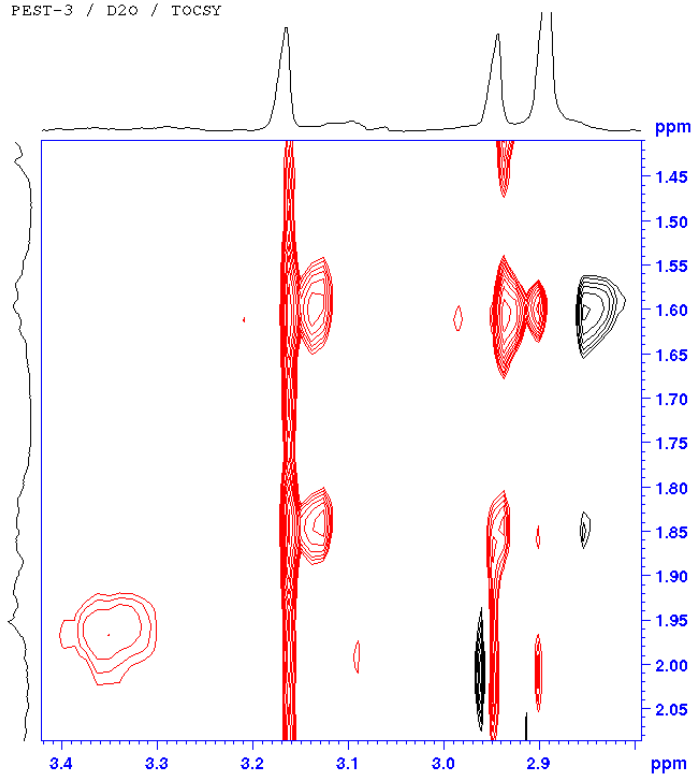
Gráfica 39. Ampliación del TOCSY entre las zonas de 1,0 y 4,0 ppm contra 1,0 y 4,5 ppm.

O. Estrada / PEST-3 / D2O / TOCSY



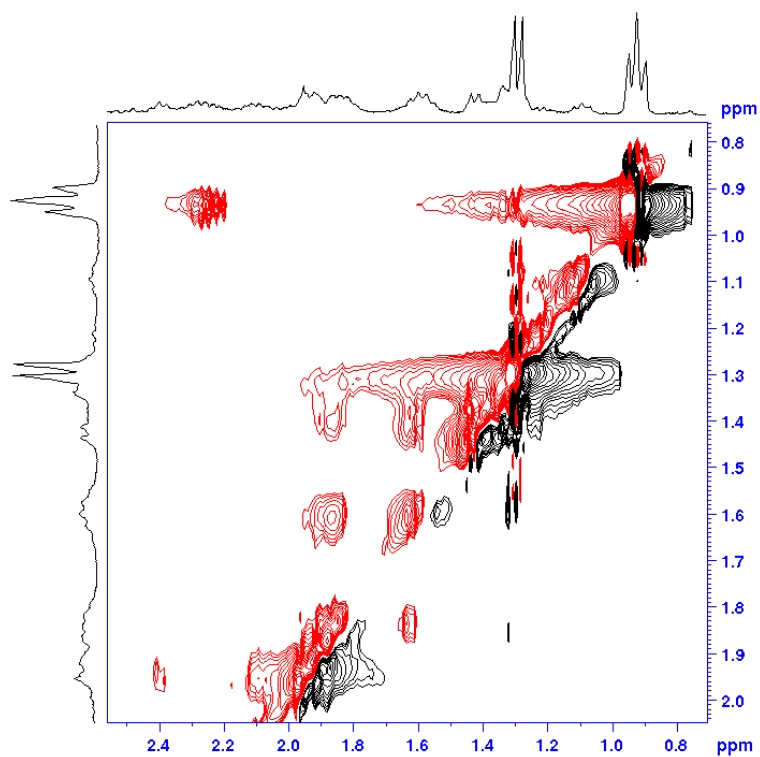
Gráfica 40. Ampliación del TOCSY entre las zonas de 0,9 y 2,1 ppm contra 3,3 y 4,4 ppm.

O. Estrada / PEST-3 / D2O / TOCSY



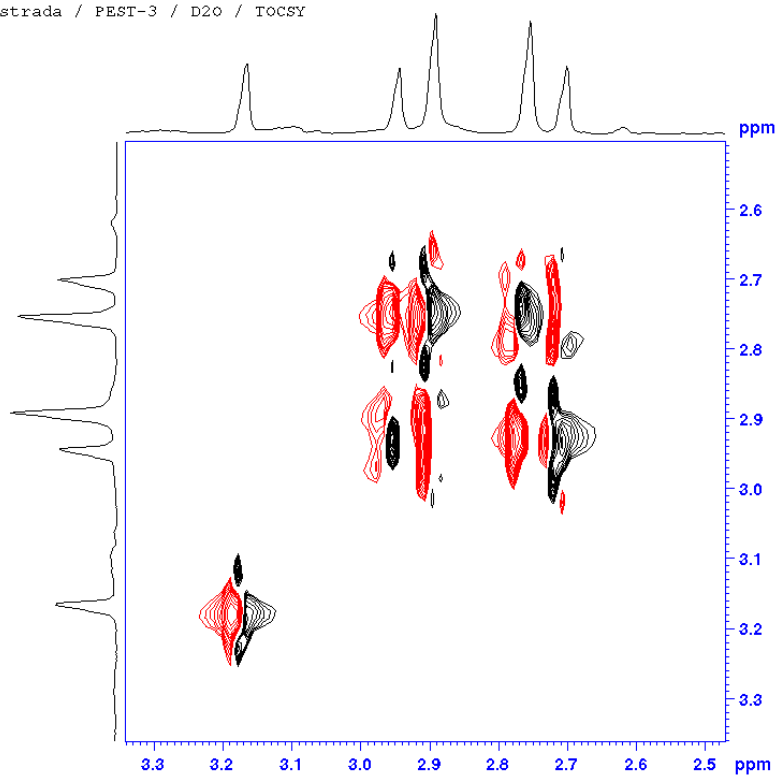
Gráfica 41. Ampliación del TOCSY entre las zonas de 1,45 y 2,05 ppm contra 2,9 y 3,4 ppm.

O. Estrada / PEST-3 / D₂O / TOCSY



Gráfica 42. Ampliación del TOCSY entre las zonas de 0,8 y 2,0 ppm contra 0,8 y 2,4 ppm.

O. Estrada / PEST-3 / D2O / TOCSY



Gráfica 42. Ampliación del TOCSY entre las zonas de 2,6 y 3,3 ppm contra 2,5 y 3,3 ppm.

La multiplicidad de la señal en 3,2 ppm se atribuye al aa1. La multiplicidad y las señales correlacionadas entre 0,9; 2,2 y 3,7 ppm se atribuyen al aa2. La multiplicidad y las señales correlacionadas entre 1,3 y 4,3 ppm se atribuyen al aa3. La multiplicidad y las señales correlacionadas entre 1,60; 1,85; 2,75 y 2,90 se atribuyen al aa4. En la tabla 6 se presentan los intervalos teóricos de los aminoácidos posibles. En la tabla 7 se presenta una comparación entre los valores experimentales obtenidos y los posibles aminoácidos propuestos.

Tabla 6. Intervalos teóricos de señales de aminoácidos en péptidos ^[42-45].

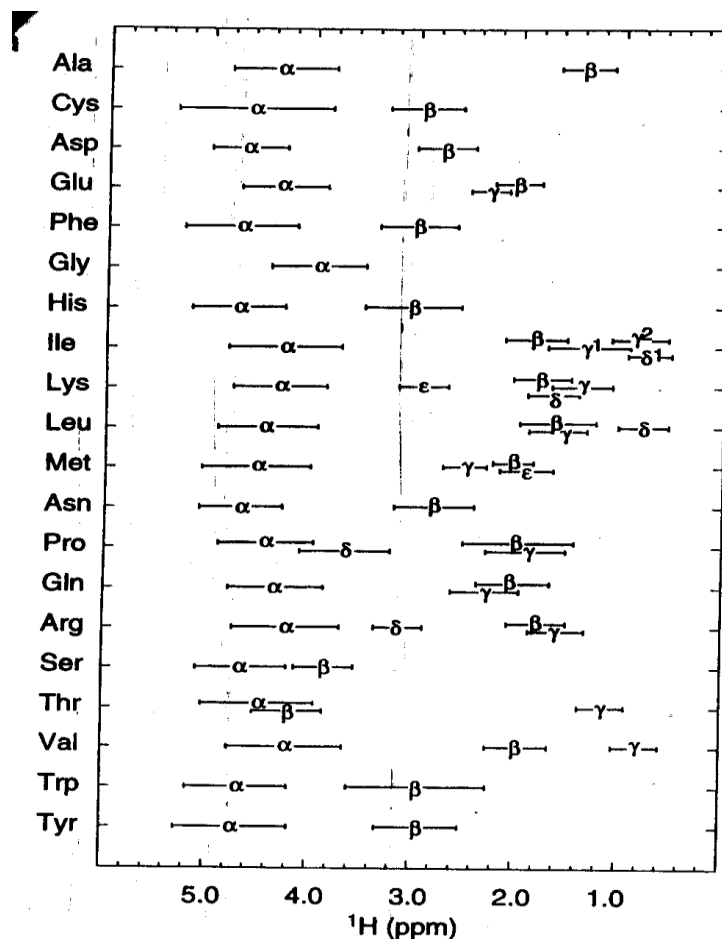
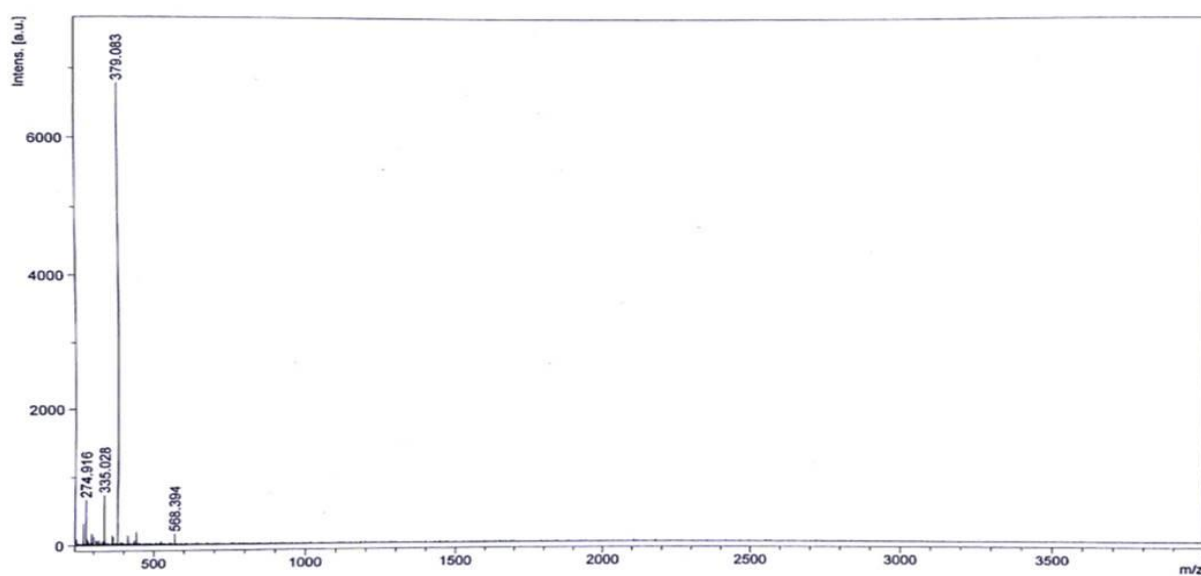


Tabla 7. Comparación entre valores experimentales y valores teóricos

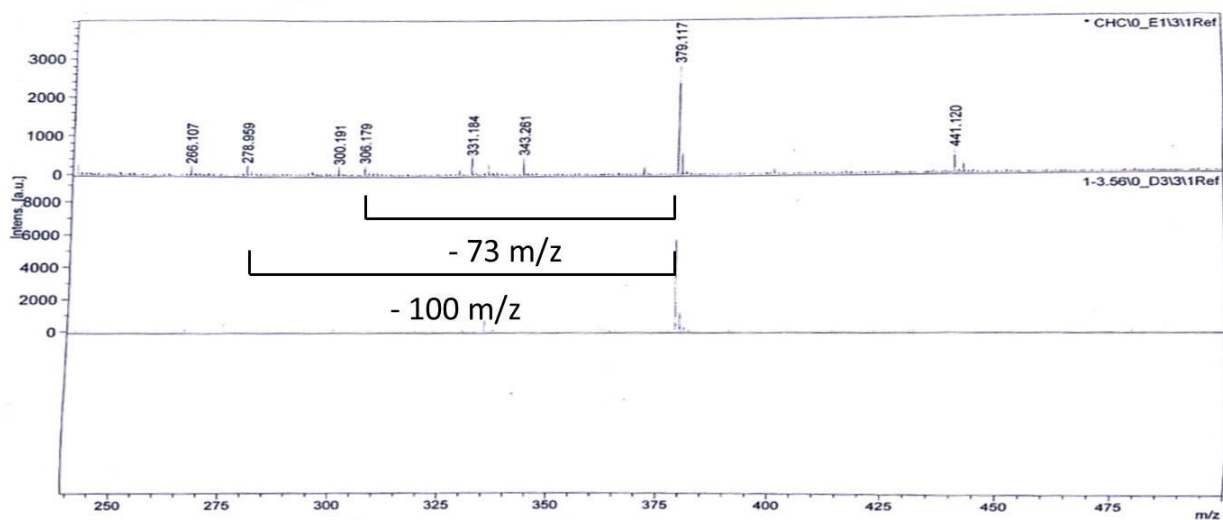
Residuo Exp	δ (ppm)			Residuo T	δ (ppm)		
	α H	β H	γ H		α H	β H	γ H
aa1	3,2			Glicina (G)	3,2-4,2		
aa2	3,7	2,2	0,9	Val (V)	3,6-4,6	1,6-2,3	0,6-1,1
aa3	4,3	1,3		Ala (A)	3,8-4,8	1,0-1,6	
aa4		2,75	2,9	Glu (E)	3,8-4,6	1,8-2,2	2,0-2,4

La forma de la señal y el desplazamiento del aa1 coincide con el reportado para la Glicina (Gly)(G). La forma de las señales, sus acoplamientos y desplazamientos coinciden así con los reportados para Valina (Val)(V); Alanina (Ala)(A) y ácido glutámico (Glu)(E). Se propone entonces que alguna de las combinaciones posibles de estos cuatro aminoácidos será el compuesto mayoritario de F1.

Según la posición del aminoácido en el péptido, este tendrá interacciones con los diferentes protones alfa de la molécula en J^3 por lo que al observar los acoplamientos en el espectro de correlación total (TOCSY) se pueden observar las siguientes interacciones: (1) la señal del α H de la glicina se encuentra acoplado con una amplia zona del espectro, lo que sugiere que dicho aminoácido se encuentre entre los aminoácidos de cadena y no como un aminoácido terminal (2) la interacción entre el α H de la glicina y el γ H de la Valina sugiere que se encuentran altamente distanciados (3) la señal atribuible en 1,6 ppm que se observa entre el γ H del ácido glutámico y el α H de la glicina, sugiere que ambos fragmentos de aminoácido se encuentran en la cadena del péptido, y se encuentran enlazados a través del grupo ácido de la cadena lateral del ácido glutámico (4) Los protones no intercambiables de la amida que son observados sugieren la presencia de 4 aminoácidos. Se propone que la secuencia de aminoácidos para el compuesto mayoritario será V-E-G-A como la secuencia más probable.

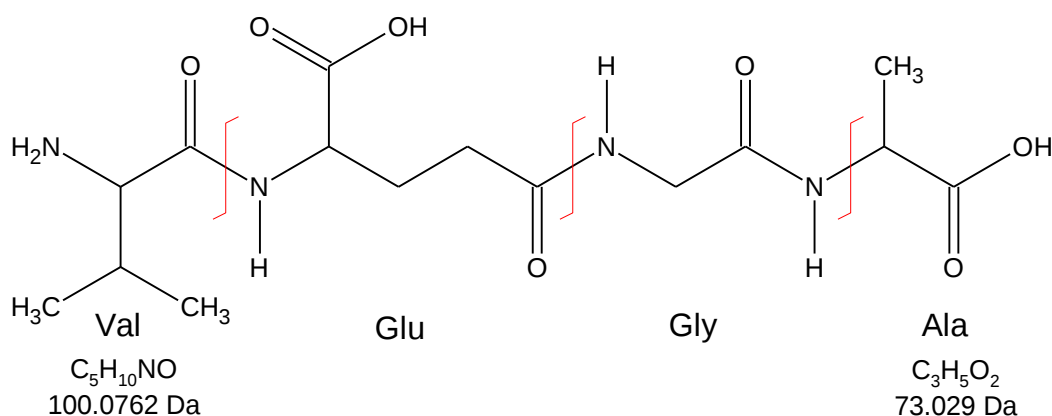


Gráfica 43: Espectro de masas de F1.



Gráfica 44: Ampliación de espectro de masas de F1.

Según la masa observada en los espectros para la fracción, podemos asignar que la masa del compuesto mayoritario de F1 es de 379 Da, resultado que según las estructuras propuestas, es un valor muy próximo al peso teórico del péptido propuesto. Se observa además que los fraccionamientos desde el pico base son del fraccionamiento de los aminoácidos terminales, que representan las pérdidas más probables del péptido, estas son de 73 y 100 m/z respectivamente, masas que se ajustan a la pérdida de Alanina y Valina respectivamente, lo que permite confirmar con mayor certeza la propuesta de que dichos fragmentos de aminoácidos son los que forman parte de las secciones terminales del péptido.



Estructura 1. Péptido VEGA. Propuesta de estructura mayoritaria de F1 **MA: 374,32 Da**

Al proponer la estructura podemos justificar ciertos resultados como: (1) el pico F1 es un compuesto altamente polar que puede eluir rápidamente en agua y en una columna C18 (2) los posibles componentes de F1 pueden ser recombinaciones de este péptido, lo cual explicaría las ligeras diferencias de polaridad, y los tiempos de retención tan próximos en la columna entre ellos (3) la masa obtenida para esta fracción puede estar relacionada a la formación de dímeros o trímeros al ser una especie cargada (4) el cambio en el color del medio de cultivo al realizar los ensayos biológicos se debe a la presencia de los grupos ácidos en la estructura.

CONCLUSIONES

1. El perfil cromatográfico del veneno de *T. discrepans* es similar a otros perfiles del mismo veneno, demostrando su reproducibilidad.
2. CLAR-FR es un método efectivo en la separación de los componentes en este veneno.
3. El veneno de *T. discrepans* tiene tres componentes con actividad anticancerígena sobre la línea celular Neuro-2a: F1, F19; F36.
4. F1 está conformada por al menos 11 componentes.
5. F1 presenta actividad apoptogénica sobre Neuro-2a, al igual que todos sus componentes
6. El tiempo óptimo de exposición para observar la actividad apoptogénica de F1 y sus componentes sobre Neuro-2a es 2,5 h.
7. Ningún componente de F1 induce algún tipo de muerte sobre la línea celular MA104
8. F1 posee en su estructura peptídica
9. Se propone la presencia de Glicina, Alanina, Valina y Acido Glutámico en la estructura del compuesto mayoritario de F1.
10. Se propone que el compuesto mayoritario de F1 es el péptido VEGA de masa 374 Da

RECOMENDACIONES

1. Recolección de mayor cantidad de material de F1 para realizar mayor cantidad de análisis de las fracciones.
2. Determinar otra condición experimental que permita mejor separación de los componentes de F1.
3. Optimizar el proceso de liofilizado de manera de reducir la cantidad de pérdida de material en este paso de la metodología
4. Realizar secuenciación de péptidos por medio de métodos como MALDI-TOF, espectrometría de masa en tándem o estimaciones por química computacional que permita corroborar la información propuesta.
5. Realizar análisis de IR o EM como método de validación adicional a la propuesta de estructura.
6. Determinar las condiciones iniciales de las células para evitar valores erróneos en el conteo de tipo de muerte celular por presencia de bacterias.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Gómez J.P., Otero R., Ecoepidemiología de los escorpiones de importancia médica en Colombia. Rev. Fac. Nac. Salud Pública., 2007, 25(1): 50-60
- [2] Saldarriaga M., Otero R., Los Escorpiones: Aspectos Ecológicos, Biológicos y Toxinológicos. Medunab., 2000, 3(7):17-23.
- [3] Rein, J. O., The Scorpion Files. Trondheim: Norwegian University of Science and Technology. 2012.
- [4] González-Sponga M.A., 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.
- [5] Rojas-Runjaic F.J.M., Becerra A., Diversidad y distribución geográfica de la escorpio-fauna del estado Zulia, Venezuela. Boletín del centro de investigaciones biológicas; Universidad del Zulia, Maracaibo, 2008, 42,4: 461–477.
- [6] D'Suze G., Castillo C., Sevcik C., Brazón J., Malave C., Hernandez D., Zerpa N., 2015, Scorpionism and dangerous scorpion species in Venezuela. En: Springer Handbooks of Toxinology. Scorpion Venoms. P. Gopalakrishnakone, Editor-in-Chief. Springer Reference. Springer Verlag: Heidelberg, Germany. (DOI: 10.1007/978-94-007-6647-1_24-1). ISBN: 978-94-007-6647-1
<http://www.springerreference.com/docs/html/chapterdbid/364643.html>
- [7] Barona J., Batista C., Zamudio F., Gomez-Lagunas F., Wanke E., Otero R., Possani L., Proteomic analysis of the venom and characterization of toxins specific for Na⁺- and K⁺-channels from the Colombian scorpion *Tityus pachyurus*., Biochimica et Biophysica, 2006, 1764,1: 76-84
- [8] Chippaux J.P., Goyffon M., Epidemiology of scorpionism: A global appraisal, Acta

Tropica , 2008, 107: 71-79

[9] Mendes T., Guimaraes-Okamoto P., Machado-de-Avila R., Oliveira D., Melo M., Lobato Z., Kalapothakis E., Chávez-Olórtegui C., General characterization of *Tityus fasciolatus* scorpion venom. Molecular identification of toxins and localization of linear B-cell epitopes. Toxicon 2015, 99: 109-117

[10] Charry H., "Accidentes por picadura de escorpión". En: Memorias del primer simposio de Toxinología Clínica "César Gómez Villegas". Laboratorios Probiol Ltda. Facultad de medicina Fundación Universitaria San Martín. Bogotá, 2006

[11] D'Suze G., Sevcik C., Brazón J., 2011, Fisiopatología inducida por el veneno de alacranes del género *Tityus* de Venezuela. pp. 31-63. 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. ISBN: 978-607-7987-00-0.

[12] Batista C., D'Suze G., Gómez-Lagunas F., Zamudio F., Encarnación S., Sevcik C, Possani L., Proteomic analysis of *Tityus discrepans* scorpion venom and amino acid sequence of novel toxins. Proteomics, 2006, 6: 3718–3727

[13] Possani L. D., Becerril B., Delepierre M., Tytgat T., Scorpion toxins specific for Na⁺-channels, Eur. J. Biochem., 1999, 264: 287–300.

[14] Alberts B., Bray D., Hopkin K., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P., Introducción a la biología celular (2da ed.), Editorial Panamericana, 2004, Cap 4.

[15] Possani L., Beceril B., Tytgat J., Delepierre M., High affinity scorpion toxins for studying potassium and sodium channels. Ion Channel Localization Methods and Protocol. Methods in Pharm. and Tox. 2001, I: 145-165.

[16] Possani L., Selisko B., Gurrola G., Structure and function of scorpion toxins affecting K⁺-channels. Persp. in Drug Disc. and Des. 1999, 15/16: 15-40.

[17] Sidach S.S., Mintz I.M., Kurtxin, a gating modifier of neuronal high- and low

threshold Ca^{2+} channels. The J. of Neurosci. 2002, 22(6): 2023-2034.

[18] Schwartz E.F., Capes E.M., Diego-García E., Zamudio F.Z., Fuentes O., Possani L.D., Valdivia H.H., Characterization of hadrucalcin, a peptide from *Hadrurus gertschi* scorpion venom with pharmacological activity on ryanodine receptors. Brit. J. of Pharm., 2009, 157(3): 392-403.

[19] D'Suze G., Schwartz E.F., García B.I., Sevcik C., Possani L.D. Molecular cloning and nucleotide sequence analysis of genes from *Tityus discrepans* cDNA library. Biochemie, 2009, 91:1010-1019.

[20] Almaaytaha A., Albalasb Q., Scorpion venom peptides with no disulfide bridges: A review, Peptides, 2014, 51: 35– 45

[21] Zilberberg, N., Froy, O., Gordon, D., Loret, E., Arad, D. & Gurevitz, M., Identification of structural elements of a scorpion alpha neurotoxin important for receptor-site recognition. J. Biol. Chem., 1997, 272: 14810-14816.

[22] 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. Editor en Jefe: Gopalakrishnakone P. Editorial Springer, Heidelberg, Alemania pp. 273-298.

[23] Joya G., D'Suze G., Salazar V., Rosales A., Sevcik C., Visbal G., Ferreira A., Perales J., Scorpion Toxins Modify Phytopathogenic Fungus Physiology. A Possible Source of New Fungicides, J. Agric. Food Chem, 2011, 59(11): 6327–6337

[24] Del Río P., Determinación De La Estructura De Proteínas Por Resonancia Magnética Nuclear, Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO, Mensaje Bioquímico 2003. 27: 65-83.

[25] Van de Ven F.J.M., Multidimensional NMR in Liquids. Basic Principles and

Experimental Methods, New York, Wiley-VCH 1995

[26] Millet O., Elucidación estructural de proteínas en solución por RMN, Revista Química Viva, 2011, 2: 63-70.

[27] Cruz M., Diseño, síntesis y evaluación de inhibidores de la proteína beta-amiloide. Desarrollo de un modelo de fibrillogénesis, Universitat de Barcelona. Departamento de Química Orgánica, Cap 5.

[28] Jacobsen N., NMR SPECTROSCOPY EXPLAINED Simplified Theory, Applications and Examples for Organic Chemistry and Structural Biology. Wiley-Interscience, University of Arizona, 2007.

[29] Clark, W.R. Sex & the origins of death. Oxford University Press, Nueva York. 1996, 105-158.

[30] Elmore S., Apoptosis: A review of programmed cell death, Toxicol Pathol, 2007, 35(4): 495–516.

[31] Liu Y., Levine B., Autosis and autophagic cell death: the dark side of autophagy, Cell Death and Differentiation, 2015, 22: 367–376

[32] Yu D., Huynh T., Truong A., Haber M., Norrlys M., ABC Transporters and Neuroblastoma. Adv. in Cancer Res., 2015; Vol. 125, Cap. 5

[33] Øra I., Eggert A., Progress in treatment and risk stratification of neuroblastoma: Impact on future clinical and basic research. Seminars in Cancer Biology, 2011; 21: 217–228

[34] Lambert J. H., Photometria, sive de Mensura et Gradibus Luminis, Colorum et Umbrae. Augsburg, Alemania., 1760

[35] D'Suze G., Zamudio F. Z., Gómez-Lagunas F., Possani L.D., A novel K⁺ channel blocking toxin from *Tityus discrepans* scorpion venom. FEBS Lett. 1999. 456: 146–148.

[36] Renvoize, C., Biola, A., Pallardy, M., Breard, J., Apoptosis: identification of dying

cells. *Cell Biol. Toxicol.* 1998, 14: 111–120.

[37] Mironova, E.V., Evstratova, A.A., Antonov, S.M., A fluorescence vital assay for the recognition and quantification of excitotoxic cell death by necrosis and apoptosis using confocal microscopy on neurons in culture. *J. Neurosci. Methods*, 2007, 163: 1–8.

[38] D'Suze G., Rosales A., Salazar V., Sevcik C., Apoptogenic peptides from *Tityus discrepans* scorpion venom acting against the SKBR3 breast cancer cell line. *Toxicon*, 2010, 56:1497–505.

[39] Hollander M., Wolfe D.A., Nonparametric statistical procedures. Eds John Wiley and Sons (New York). 1973, 204-220.

[40] Cisneros, M. 2015. Caracterización de la actividad anticancerígena de una toxina purificada del veneno de *Tityus discrepans*. Tesis de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

[41] Pretsch E., Bühlmann P., Badertscher M., Structure Determination of Organic Compounds, 2009, 4^{ta} edición, editorial Spriger. Cap 5.

[42] Wüthrich, K., NMR of Proteins and Nucleic Acids

[43] Roberts, G., NMR of Macromolecules: A Practical Approach, Capítulo 4

[44] Kaptein, R., Sequence-specific ¹H NMR assignments and peptide backbone conformation in rat epidermal growth factor. *Biochem. J.*, 1989, 257:197.

[45] Weber P. L., Sequential ¹H NMR assignments and secondary structure identification of human ubiquitin. *Biochemistry*, 1987, 26: 7282.