

# EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA DEL VENENO DE ESCORPIONES DEL GÉNERO *ANDROCTONUS*, *BABYCURUS*, *GROSPHUS*, *HOTTENTOTTA*, *PANDINUS* Y *TITYUS*

Gómez Lyz Jenny<sup>1,2</sup>, Estrada Sebastián<sup>2</sup>, Vargas Leidy<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia

<sup>2</sup> Programa de Ofidismo y Escorpionismo- Serpentario, Universidad de Antioquia

## Resumen

El cáncer es considerado un problema de salud pública debido a la tasa de mortalidad que representa a nivel mundial. Se ha visto que diversas sustancias naturales y sintéticas podrían contribuir con el diagnóstico y tratamiento de esta patología, ya que exhiben propiedades citostáticas o citotóxicas sobre células tumorales.

Estudios apuntan a la existencia de compuestos contenidos en el veneno de escorpiones, que pueden interactuar con estas células y modificar su funcionamiento o su entorno volviéndolas más vulnerables. Los mecanismos que más se han descrito están relacionados con el bloqueo de canales iónicos, la disrupción de la integridad de la membrana y el daño a estructuras internas por la presencia de péptidos antimicrobianos y enzimas. Se cree que la especificidad mostrada hacia la célula tumoral se debe en gran parte a características estructurales que las hacen diferentes de las células sanas, tales como la sobreexpresión de canales iónicos o el aumento de grupos aniónicos en la superficie de membrana.

Mediante un estudio experimental, se buscó evaluar la actividad citotóxica producida por el veneno de 6 ejemplares de escorpiones: *Androctonus amoreuxi*, *Babycurus jacksoni*, *Grosphus grandidieri*, *Hottentotta gentili*, *Pandinus imperator* y *Tityus fuhrmanni*, en cultivos de células de carcinoma mamario (MCF-7). Los resultados indicaron que en el veneno de *G. grandidieri*, *T. fuhrmanni* y *P. imperator*, se encuentran sustancias que disminuyen la viabilidad de estas células, algunas de ellas identificadas preliminarmente. Se deben plantear posteriores estudios para profundizar en el análisis de estas moléculas, a fin de aprovechar su potencial como nuevos fármacos antineoplásicos.

Palabras clave: Escorpiones, Toxinas Biológicas, Antineoplásicos, Neoplasias.

## Abstract

Cancer is considered a public health problem because of the worldwide mortality rate. It has been seen that various natural and synthetic substances could contribute to the diagnosis and treatment of this pathology, since they exhibit cytostatic or cytotoxic properties on tumor cells.

Studies point to the existence of compounds contained in scorpions venoms, which may interact with these cells and modify their functioning or their environment making them more vulnerable. The mechanisms that have been described most are related to ion channel blockade, disruption of membrane integrity and damage to internal structures by the presence of antimicrobial peptides and enzymes. It is believed that the specificity shown towards the tumor cell is due in large part to structural features that make them different from healthy cells, such as overexpression of ion channels or the increase of anionic groups on the membrane surface.

By means of an experimental study, we tried to evaluate the cytotoxic activity produced by the venom of 6 scorpion specimens: *Androctonus amoreuxi*, *Babycurus jacksoni*, *Grosphus grandidieri*, *Hottentotta gentili*, *Pandinus imperator* and *Tityus fuhrmanni*, in cultures of mammary carcinoma cells (MCF-7 ). The results indicated that in the venom of *G. grandidieri*, *T. fuhrmanni* and *P. imperator*, there are substances that diminish the viability of these cells, some of them preliminarily identified. Further studies should be considered to deepen the analysis of these molecules, in order to take advantage of their potential as new antineoplastic drugs.

Keywords: Scorpions, Toxins Biological, Antineoplastic Agents, Neoplasms.

#### Introducción:

De acuerdo con datos y estadísticas de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el año 2012 murieron en el mundo 56 millones de personas por diferentes circunstancias, de éstas, el 68% obedecieron a enfermedades no transmisibles ubicándose en los primeros lugares las enfermedades cardiovasculares, el cáncer, la diabetes y las neumopatías crónicas (1). Dentro de este grupo, al cáncer se le atribuyeron 8,2 millones de muertes, presentándose diferencia en la prevalencia de esta enfermedad entre hombres y mujeres. En hombres, la mayor frecuencia de diagnóstico la encabezan el de pulmón, próstata y colon, y en mujeres, el de mama, colon y recto (2).

Infortunadamente, las modalidades de tratamiento actuales; cirugía, radioterapia o tratamiento sistémico, no garantizan la supresión de la enfermedad, por lo que la prevención, el diagnóstico temprano y la búsqueda de nuevos tratamientos, se han convertido en los principales focos de investigación y desarrollo (3). La identificación de compuestos citostáticos o citotóxicos, así como el aprovechamiento de características bioquímicas únicas de las células tumorales,

son aspectos que si se desarrollan en un modelo conjunto podrían permitir la regresión y destrucción selectiva de las mismas (4). El mecanismo de acción de muchos de estos nuevos agentes consiste en inhibir o modificar moléculas diana implicadas en rutas metabólicas cruciales para la supervivencia, el crecimiento, la reproducción y la invasión celular.

Se han hallado diversos compuestos naturales y sintéticos, que podrían ser candidatos para el desarrollo de nuevos fármacos, pero en ellos es importante conocer el potencial de actividad, toxicidad, especificidad, vías de acción y parámetros cinéticos(4).

En los venenos de artrópodos se han encontrado diversas moléculas que exhiben diferentes actividades farmacológicas, incluyendo la antitumoral, por lo que podrían convertirse en la base para el desarrollo de nuevos y diversos fármacos. Al parecer, pueden interactuar con membranas en la célula efectuando cambios estructurales que llevan a la pérdida de su integridad, o activando rutas de señalización que intervienen en la migración y proliferación celular (5). Dentro del grupo de artrópodos, arácnidos como las arañas han sido objeto de investigación debido al potencial de su veneno (6) (7) 8).

Otros arácnidos de interés, aunque menos estudiados son los escorpiones, su veneno es rico en mucopolisacáridos, proteínas y péptidos de bajo peso molecular (9). Se ha informado que el veneno completo de algunas especies o moléculas aisladas del mismo, inhiben el crecimiento o inducen muerte celular tumoral a través de mecanismos que implican el bloqueo de canales iónicos (10), la disrupción de la integridad de membrana (11), daño mitocondrial, degradación del ADN (12), fragmentación de proteínas y oligosacáridos estructurales (13), modulación de la respuesta inmune (14), entre otros.

De acuerdo con estos hallazgos, nos preguntamos si en el veneno de los escorpiones *Androctonus amoreuxi*, *Babychurus jacksonii*, *Grosphus grandidieri*, *Hottentotta gentili*, *Pandinus imperator* y *Tityus fuhrmanni*, se podrían encontrar moléculas con efecto anticancerígeno.

Partiendo de la pregunta anterior, este trabajo propuso determinar el perfil bioquímico del veneno de estas especies y posteriormente evaluar su actividad anticancerígena en líneas celulares de carcinoma mamario humano (MCF7).

Objetivo:

Evaluar la actividad anticancerígena del veneno de los escorpiones *Androctonus amoreuxi*, *Babychurus jacksoni*, *Grosphus grandidieri*, *Hottentotta gentili*, *Pandinus imperator* y *Tityus fuhrmanni*, en cultivos de células de carcinoma mamario MCF-7.

Métodos:

Se siguió un estudio de tipo experimental, prospectivo, con una muestra constituida por un pool de veneno de los escorpiones de la familia Buthidae; *Androctonus amoreuxi*, *Babycurus jacksoni*, *Grosphus grandidieri*, *Hottentotta gentili*, y *Tityus fuhrmanni*, y el escorpión *Pandinus imperator* de la familia Scorpionidae.

- Extracción del veneno:

Fue realizada mediante electroestimulación,. El veneno secretado se recogió, se filtró y se liofilizó. Posteriormente se almacenó a -20°C hasta su respectivo análisis.

- Separación de proteínas:

Las proteínas contenidas en las muestras de veneno liofilizado, fueron separadas mediante electroforesis siguiendo el método descrito por Laemmli (59).

- Obtención del perfil cromatográfico y aislamiento de fracciones:

Muestras de veneno liofilizado se fraccionaron por RP-HPLC usando una columna RESTK C18 (250 x 4,6 mm) y un gradiente compuesto por una solución A (agua con TFA al 0,1%) y una solución B (TFA con Acetonitrilo al 99%). Las fracciones recogidas, se secaron y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

- Evaluación de la actividad enzimática:

Se evaluó la actividad metaloproteinasa, serin-proteinasa, PLA<sub>2</sub> y LAAO siguiendo el método descrito por Wang y col (60), Patiño *et al* (61), Cho *et al* y Holzer *et al.* (62) (63), y Kishimoto *et al* (64), respectivamente.

- Evaluación del efecto anticancerígeno:

El efecto anticancerígeno se evaluó mediante pruebas de viabilidad y proliferación celular, utilizando el sustrato 3- (4,5- di metil tiazol -2-il) -2,5-di fenil bromuro de tetrazolio (MTT) y el colorante azul de tripano. Se utilizó la línea celular de carcinoma mamario humano MCF7 (Michigan Cancer Foundation-7) ATCC® HTB-22™, previamente tratado.

- Análisis por espectrometría de masas:

Después de digestión previa, las fracciones se analizaron por nano LC-MS/MS. Los resultados obtenidos se analizaron utilizando Mascot Daemon v.2.4.0, para la búsqueda en las diferentes bases de datos. Algunos fueron descargados de UniProt, NCBI o Arachnoserver.

- Análisis estadístico:

Todas las pruebas enzimáticas y de viabilidad se analizaron mediante ANOVA simple de comparaciones múltiples, utilizando el método de corrección de Bonferroni bajo un  $p < 0,05$ , en el programa Graphpad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, EE.UU). M&M

Resultados y discusión:

El veneno de escorpión se compone de una gran variedad de moléculas, incluyendo aquellas que son de origen proteico. Esta afirmación se sustenta bajo los resultados obtenidos mediante electroforesis, donde se observaron señales de péptidos y proteínas por debajo de 14 kDa hasta aquellas que superan los 97 kDa. Se sabe que el número y la intensidad de los componentes proteicos en el veneno puede cambiar de acuerdo con la especie e incluso con la metodología de análisis aplicada, dado que se analizaron las muestras utilizando concentraciones y volúmenes iguales, pero en unos se observó mayor cantidad de proteínas que en otros, además sus densidades eran diferentes. En la revisión realizada por Ozkan *et al* (15), se encuentra que factores como la ubicación geográfica, el dimorfismo sexual, la edad, los cambios estacionales, la conducta alimentaria o la dinámica de producción y maduración de péptidos dentro de la glándula del veneno, influyen en la expresión de sus componentes, lo que podría explicar las variaciones encontradas.

Si bien existen pocos reportes sobre el estudio de proteinasas en venenos de escorpión, la evaluación de las muestras no sólo demostró la presencia de estas enzimas, sino que pudieron observarse niveles variables de actividad para cada especie. Previos estudios realizados por Estrada-Gómez *et al* (16) han reportado la presencia de enzimas proteolíticas en venenos de escorpiones de Colombia.

Particularmente, en este estudio no pudo probarse la existencia de actividad LAAO en el veneno de estos individuos. Mediante electroforesis se logró precisar bandas probables para PLA<sub>2</sub>, cuyo peso puede estar aproximadamente entre 14-20 kDa, la evaluación *in vitro* de su actividad con el sustrato NOBA indica que puede estar presente en el veneno de *P. imperator* y en menor cantidad en el de *G. grandidieri*, *A. amoreuxi* y *H. gentili*. Fisiológicamente, estas sustancias están involucradas en procesos de hemólisis de eritrocitos y el desarrollo de edemas (17) (18) (19) (20). Ya en otros escorpiones se ha reportado la presencia de estas enzimas (16) (21). Nuestros resultados concuerdan con lo reportado en la literatura para el escorpión *P. imperator*, el cual se caracteriza por la presencia de fosfolipasas A<sub>2</sub> (17).

El efecto citotóxico dosis dependiente sobre las células de carcinoma mamario MCF7 fue detectable por inspección bajo microscopio óptico, en los cultivos tratados con el veneno de *Grosphus*, *Tityus* y *Pandinus*. La alteración morfológica producida en las células MCF7, coincide con la descrita por Tong-ngam *et al* (22), al estudiar los eventos que se presentan luego de la unión del péptido BmKn-2 del escorpión *Mesobuthus martensii* a diversas células tumorales; encogimiento, adopción de forma circular o hinchamiento y reducción del número de células.

Se observó mayor actividad citotóxica en la fracción IX de *G. grandidieri*, la fracción III de *P. imperator* y la fracción I de *T. fuhrmanni*. Al parecer, en los dos primeros este efecto tiende a ser menor que cuando se utiliza veneno completo, y no es de extrañarse, ya que podría explicarse a través de la acción sinérgica de diferentes componentes del veneno que convergen en procesos de muerte celular. Diferente a lo anterior, en *T. fuhrmanni*, la fracción I incita a pensar que contiene una combinación de moléculas que juntas logran exhibir una actividad que

pareciera ser superior a la del veneno completo. Aunque los mecanismos detrás del proceso de muerte celular aún no se encuentran bien esclarecidos, hay ciertos indicios que llevan a proponer dos aspectos claves; la perturbación de la membrana celular y la interacción de las toxinas con objetivos intracelulares (23).

Las secuencias de aminoácidos obtenidas mediante espectrometría de masas y la búsqueda de homólogas la base de datos, permitieron tener un mejor acercamiento al tipo de moléculas contenidas en las fracciones activas. En la fracción IX de *G. grandidieri* se encontraron fragmentos homólogos a una defensina de expresada en la planta *Aegilops tauschii* y a la enzima NADH deshidrogenasa de *Tityus discrepans*. Estas mismas sustancias se detectaron en la fracción I de *T. fuhrmanni*, además de tres tipos de estructuras compatibles con metaloproteinasas halladas en *Tityus sp*, *T. pachyurus* y *Hottentotta judaicus*, y un fragmento homólogo a un péptido antimicrobiano del escorpión *Uradacus yaschenkoi*. En la fracción III de *P. imperator* se encontró homología con cinco  $\alpha$ -toxinas específicas para canales de potasio reportadas para esta especie; algunas de ellas correspondieron al péptido completo maduro, y una metaloproteinasa reportada para *Hottentotta judaicus*.

El marcado efecto citotóxico del veneno completo de *P. imperator* y de su fracción III, parece poner de manifiesto la sensibilidad de las MCF7 a la acción de las  $\alpha$ -toxinas bloqueadoras de canales de potasio. En la fracción IX de *G. grandidieri* y I de *T. fuhrmanni* se abre la expectativa de tener defensinas y otros péptidos antimicrobianos.

Finalmente, no se encontraron reportes que permitan asociar metaloproteinasas de escorpiones u otras especies con actividad anticancerígena, por lo que podrían convertirse en objeto de estudio en este campo, dada la cantidad relevante encontrada en las fracciones analizadas.

#### Conclusiones:

Las células tumorales pueden desarrollar resistencia a muchos de los quimioterapéuticos convencionales, por lo que la búsqueda de nuevas moléculas que puedan ser potencialmente útiles en el desarrollo de terapias más eficaces, se convierte en uno de los principales objetivos de investigadores. La alta especificidad por el tejido diana, la actividad citotóxica inducida, la detención del ciclo celular y el mínimo efecto sobre células sanas, son cualidades que deben caracterizar estas sustancias.

En el veneno de escorpión se encuentran toxinas que podrían servir para el diseño de fármacos, marcadores tumorales o adyuvantes en el tratamiento del cáncer, gracias a su alta especificidad y afinidad por los canales iónicos que pueden estar sobre expresados en muchas células malignas, también, se encuentran otros péptidos y proteínas, como enzimas, péptidos antimicrobianos (AMP), péptidos con puentes disulfuro (DBPs), péptidos sin puentes disulfuro (NDBPs) y defensinas, que inducen muerte celular a través de diversos mecanismos,

especialmente la formación de poros o la activación de rutas de señalización proapoptóticas. La acción de estas moléculas puede ser aplicable también al tratamiento de enfermedades causadas por agentes infecciosos, debido a su amplio espectro y a la baja resistencia que podrían generar.

En el veneno de *G. grandidieri*, *T. fuhrmanni* y *P. imperator*, se encuentran sustancias con actividad citotóxica sobre células de carcinoma mamario MCF7 que podrían aislarse para el desarrollo de péptidos análogos sintéticos con actividad y selectividad mejoradas, teniendo en cuenta las propiedades estructurales únicas de estas células, como el incremento de cargas negativas en la superficie de membrana, la sobreexpresión de canales de potasio y la presencia de microvellosidades que aumentan el área de contacto disponible.

Se sugiere realizar estudios futuros a partir de las fracciones, por ejemplo, refraccionarlas para conseguir toxinas más puras, probarlas sobre líneas celulares diferentes y microorganismos, e incluso clonarlas a fin que permitan no sólo confirmar los resultados del análisis citotóxico preliminar, sino conocer los compuestos responsables de tales efectos y sus posibles propiedades.

#### Bibliografía:

1. Organización Mundial de la Salud. Las 10 causas principales de defunción en el mundo Nota descriptiva no 310 [Internet]. 2014 [Acceso 8 de septiembre de 2015]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/es/>
2. Organización Mundial de la Salud. Cáncer Nota descriptiva N°297 [Internet]. 2015 [Acceso 8 de septiembre de 2015]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
3. Baby J, Jency G. Scorpion Toxins and its Applications. International Journal of Toxicological and Pharmacological Research. 2012;4 (3):57–61.
4. Ajit N, Divyakant S. Anticancer Drug Development Unique Aspects of Pharmaceutical Development. Pharmaceutical Perspectives of Cancer Therapeutics. 2009;49–92.
5. Cummings B. Phospholipase A2 as targets for anti-cancer drugs. Biochemical Pharmacology. 2007; (74): 949–59.
6. Vorontsova O, Egorova N, Arseniev A, Feofanov A. Haemolytic and cytotoxic action of Iatarcin Ltc2a. Biochimie. 2011;93:227–41.
7. Soletti R, Del Barrio L, Daffre S, Miranda A, Borges H, Moura-Neto V, et al. Peptide gomesin triggers cell death through L-type channel calcium influx, MAPK/ERK, PKC and PI3K signaling and generation of reactive oxygen species. Chemo-Biological Interactions. 2010;186 (2):135–43.

8. De Souza-Fagundes E, Barrios B, De Marco F. Anticancer potential of spider venom. *Spider Venoms*. 2015;(1):1–15.
9. Possani L, Rodriguez R. Scorpion Venom Peptides. *Handbook of Biologically Active Peptides*. 2006; (51):339–54.
10. Wang W. X., Ji Y. H. Scorpion venom induces glioma cell apoptosis in vivo and inhibits glioma tumor growth in vitro. *Journal Neurooncology*. 2005;73.
11. Das Gupta S., Debnath A., Saha A., Giri B., Tripathi G., Vedasiromoni J. R., et al. Indian black scorpion (*Heterometrus bengalensis* Koch) venom induced antiproliferative and apoptogenic activity against human leukemic cell lines U937 and K562. *Leukemia Research*. 2007; (31):817.
12. Gupta S. D., Gomes A., Debnath A., Saha A., Gomes A. Apoptosis Induction in Human Leukemic Cells by a Novel Protein Bengalin, Isolated from Indian Black Scorpion Venom: through Mitochondrial Pathway and Inhibition of Heat Shock Proteins. *Chemico-Biological Interactions*. 2008;293–303.
13. Feng L., Gao R., Gopalakrishnakone P. Isolation and characterization of a hyaluronidase from the venom of Chinese red scorpion *Buthus martensi*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2008;148 (3):250–7.
14. Yang JB, Li XW, Dong WH, Kong TH, Song HX, Zheng XY, et al. Effect of anticancer polypeptide from *Buthus Martensii* venom on immune function in the H22-bearing mice. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 2000;25 (12):736–9.
15. Ozkan O, Ciftci G. Individual variation in the protein profile of the venom of *Mesobuthus gibbosus* (Brullé, 1832, Scorpiones: Buthidae) from Turkey. *The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. 2010;16:505–8.
16. Estrada S, Cupitra N, Murillo W y Vargas L. Intraspecific Variation of *Centruroides Edwardsii* Venom from Two Regions of Colombia. *Toxins*. 2014; 6 (7): 2082-2096.
17. Zamudio F, Conde R, Arévalo C. The mechanism of inhibition of ryanodine receptor channels by imperatoxin I, a heterodimeric protein from the scorpion *Pandinus imperator*. *Journal of Biological Chemistry*. 1997; (172):11886–94.
18. Valdez N, Batista C, Possani L. Phaiodactylipin, a glycosylated heterodimeric phospholipase A from the venom of the scorpion *Anuroctonus phaiodactylus*. *European Journal of Biochemistry*. 2004; (271):1453–65.
19. Conde R, Zamudio F, Becerril B. Phospholipin, a novel heterodimeric phospholipase A2 from *Pandinus imperator* scorpion venom. *Federation of European Biochemical Societies*. 1999;(460):447–50.

20. Díaz A, Ruiz J, Yglesias A, Rodríguez H, Riquenes Y, Martínez O, et al. Enzymatic analysis of venom from Cuban scorpion *Rhopalurus junceus*. *Journal of Venom Research*. 2015;(6):11–8.
21. Estrada S, Vargas L, Saldarriaga M, Quintana J. Venom from *Opisthacanthus elatus* scorpion of Colombia, could be more hemolytic and less neurotoxic than thought. *Acta Tropica*. 2016; (153): 70-78.
22. Tong-ngam P, Roytrakul S. BmKn-2 scorpion venom peptide for killing oral cancer cells by apoptosis. *Asian Pacific Organization for Cancer Prevention*. 2015; 16 (7):2807–2811.
23. Ammar A, Zhou M, Wang L, Chen T, Walker B, Shaw C. Antimicrobial/cytolytic peptides from the venom of the North African scorpion, *Androctonus amoreuxi*: Biochemical and functional characterization of natural peptides and a single site-substituted analog. *Peptides*. 2012;(35):291–9.