



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

**MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES**

EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL GEN CII-6 DEL
ALACRÁN *Centruroides limpidus* EN CÉLULAS DE
NEUROBLASTOMA HUMANO (SH-SY5Y)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN
CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

P R E S E N T A

IBT. ERASTO DESALES SALAZAR

TUTOR(A) ACADÉMICO(A):

DR. ALBERTO BARBABOSA PLIEGO

TUTORES(A) ADJUNTOS(AS):

DR. JUAN CARLOS VÁZQUEZ CHAGOYÁN

DRA. ESVIETA TENORIO BORROTO

El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca México, noviembre de 2021

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	1
DEDICATORIAS	3
1.- INTRODUCCIÓN	8
2.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	11
3.- ANTECEDENTES	12
3.1.- EL CÁNCER	12
3.2.- CÁNCER EN EL MUNDO	20
3.3.- NEUROBLASTOMA HUMANO	22
3.4.- BIOTERAPIA	32
3.5.- COMPONENTES DEL VENENO DE ALACRÁN	34
3.6.- CANALES IÓNICOS	37
3.7.- VENENO DE ALACRÁN Y TOXINAS AISLADAS COMO TRATAMIENTO ANTI-CÁNCER	55
3.8.- <i>CENTRUROIDES LIMPUDUS</i> Y EL PÉPTIDO CII-6	63
4.- JUSTIFICACIÓN	68
5.- OBJETIVOS	69
5.1.- OBJETIVO GENERAL	69
5.2.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS	69
6.- HIPÓTESIS	69
7.- MATERIALES Y MÉTODOS	70
7.1.- PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES	70
7.2.- TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES <i>E. COLI (DH5-α)</i> POR SHOCK TÉRMICO	71
7.3.- REPLICACIÓN DE BACTERIAS TRANSFORMADAS <i>E. COLI (XL-1)</i> PARA LA AMPLIFICACIÓN DE <i>pDream2.1/MCS/CII-6</i> y <i>pDsRed2-N2</i>	71
7.4.- EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ADN PLÁSMIDICO	72
7.5.- CUANTIFICACIÓN DE ADN	73
7.6.- DOBLE DIGESTIÓN ENZIMÁTICA Y ELECTROFORESIS	73
7.7.- REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	74
7.8.- ELECTROFORESIS DEL PRODUCTO DE PCR	75
7.9.- PURIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR	76
7.10.- ELECTROFORESIS DE LOS PRODUCTOS DE PCR PURIFICADOS	77
7.11.- SECUENCIACIÓN	77

7.12.- MANTENIMIENTO Y CULTIVO CELULAR	78
7.13.- EVALUACIÓN DE LA TRANSFECCIÓN	79
7.14.- RT-PCR	80
7.15.- ENSAYO DE VIABILIDAD POS-TRANSFECCIÓN	83
7.16.- ENSAYO DE VIABILIDAD POSTRATAMIENTO CON LA SUBFRACCIÓN CII-6 EN CÉLULAS SH-SY5Y	86
7.17.- ENSAYO DE VIABILIDAD POSTRATAMIENTO: COMPARACIÓN DEL EFECTO DE LA FRACCIÓN CII-6 EN CÉLULAS DE NERUROBLASTOMA HUMANO (SH-SY5Y) Y GLIOBLASTOMA HUMANO (U-87)	89
7.18.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO	91
8.- RESULTADOS	92
8.1.- DIGESTIÓN ENZIMÁTICA	92
8.2.- REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA y PURIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR	92
8.3.- ANÁLISIS DE SECUENCIACIÓN	93
8.4.- EVALUACIÓN DE LA TRANSFECCIÓN	94
8.5.- RT-PCR POS-TRANSFECCIÓN	97
8.6.- ENSAYO DE VIABILIDAD POS-TRANSFECCIÓN	98
8.7.- ENSAYO DE VIABILIDAD POS-TRATAMIENTO CON CII-6 EN CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA HUMANO (SHSY-5Y)	99
8.8.- ENSAYO DE VIABILIDAD POS-TRATAMIENTO: COMPARACIÓN DEL EFECTO DE CII-6 EN CÉLULAS DE NERUROBLASTOMA HUMANO (SH-SY5Y) Y GLIOBLASTOMA HUMANO (U-87)	100
9.- DISCUSIÓN	102
10.- CONCLUSIONES	107
11.- SUGERENCIAS	108
12.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109
12.- ANEXOS	123

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Número de Casos Nuevos en 2018 a nivel mundial en 2018, para ambos sexos y todas las edades.	21
Figura 2. Número de Muertes en 2018 a nivel mundial en 2018, para ambos sexos y todas las edades.	21
Figura 3. Número de Casos Nuevos en 2018 por Cáncer en Cerebro, Sistema Nervioso a nivel mundial en 2018, para ambos sexos y todas las edades.....	22
Figura 4. Descripción general del tratamiento de neuroblastoma de alto riesgo.	26
Figura 5. Topología de canales de Ca^{2+} activados por voltaje HVA y LVA.	40
Figura 6. Esquema de los canales de K^{+} activados por voltaje.	43
Figura 7. Dominios transmembrana canales K^{+}	43
Figura 8. Estructura del canal de Na^{+} dependiente de voltaje.	46
Figura 9. <i>Centruroides limpidus</i>	64
Figura 10. Secuencia genética de la toxina modificadora de los canales de Na, CII-6.	65
Figura 11. Plásmido <i>pDream2.1/MCS/CII-6</i>	66
Figura 12. Organización de los grupos de tratamiento en células NIH/3T3.....	85
Figura 13. Organización de los grupos de tratados con CII-6 en células SH-SY5Y.....	88
Figura 14. Organización de los grupos de tratamiento con CII-6 en células SH-SY5Y y U-87.	90
Figura 15. Digestión enzimática del gen CII-6.....	92
Figura 16. Amplificación del CII-6 mediante PCR.....	93
Figura 17. Amplicones purificados del gen CII-6.....	93
Figura 18. Secuencia CII-6 (AF491132) y secuencia enviada por LANGEBIO alineadas en el software EMBOSS Water.	94
Figura 19. Comparación de grupos transfectados de células de Fibroblastos embrionarios de ratón (NIH/3T3).	95
Figura 20. Grupos transfectados de células de Fibroblastos embrionarios de ratón (NIH/3T3) con el plásmido pDsRed2-N2.	96
Figura 21. Amplificación del gen de β -Actina a partir de ADNc.....	97
Figura 22. Amplificación del gen CII-6 a partir de ADNc.....	98

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Evaluación inicial para diagnóstico de Neuroblastoma	23
Tabla 2: Factores de riesgo definidos por imagen para tumores de neuroblastoma, Clasificación del INRGSS.	24
Tabla 3: Eventos presentados mediante la aplicación de Dinutuximab β y Dinutuximab β con IL-2 subcutánea.....	30
Tabla 4: Isoformas de los canales de K ⁺ activados por voltaje	44
Tabla 5: Grupos de tratamiento administrados en células NIH/3T3 de fibroblastos embrionarios de ratón para la evaluación de la transfección	84
Tabla 6: Grupos de tratamiento administrados en células SH-SY5Y de neuroblastoma humano para la evaluación de la subfracción CII-6.....	87
Tabla 7: Grupos de tratamiento administrados en células SH-SY5Y de neuroblastoma humano y U-87 de glioblastoma humano para la evaluación de la subfracción CII-6	89

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Viabilidad Pos-Transfección en células NIH/3T3.....	99
Gráfica 2. Viabilidad Pos-Tratamiento con CII-6 en células SH-SY5Y	100
Gráfica 3. Viabilidad Pos-Tratamiento con CII-6 en SH-SY5Y y U-87.....	101

1.- INTRODUCCIÓN

El término “cáncer” es genérico y designa a un grupo amplio de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del cuerpo, este se define como un crecimiento tisular producido por la proliferación continua de células anormales con capacidad de invasión y destrucción de otros tejidos (Aibar *et al.*, 2009).

Durante los últimos años el cáncer y sus diversos tipos han surgido como una de las principales causas de mortalidad en el mundo, de acuerdo con las recientes estadísticas del Global Burden of Disease Cancer Collaboration, en 2017, hubo 24.5 millones de incidencias de cáncer en todo el mundo, de las cuales 9.6 millones se traducen en muertes causadas por el mismo (Fitzmaurice *et al.*, 2019); Aunado a esto, hay evidencia de que en México durante el periodo de 2011-2016, aproximadamente 50% de las muertes observadas fueron por tumores malignos en la población de 0-17 años, donde se tiene como segundo lugar de importancia el cáncer de encéfalo y otras partes del sistema nervioso central, entre las cinco principales causas de mortalidad por neoplasias malignas. Asimismo, en este sector de la población, son más comunes los tumores cerebrales que no se extienden fuera del cerebro o a la médula espinal, dentro de los que se destacan está el neuroblastoma, el tumor sólido extracraneal más frecuente durante la infancia (Instituto Nacional de Estadística y Geografía [INEGI], 2018; Szewczyk, 2018); Por otro lado, con lo que respecta al tratamiento del neuroblastoma, el uso de métodos convencionales para erradicarlo, basados en quimioterapia, radioterapia y cirugía, han mostrado efectos secundarios que influyen sobre la calidad de vida del paciente durante el tratamiento y una vez finalizados causando daños irreversibles (Secretaría de Salud., 2010); debido a esto es necesaria la búsqueda de alternativas que pueden ser de origen natural y a su vez tener mayor éxito para erradicarlo.

Con la finalidad de mejorar lo anterior, se ha iniciado el aprovechamiento de recursos naturales que puedan atacar a las células cancerosas con éxito, ya que como lo menciona Khusroa *et al.*, (2018) dentro de los agentes anticancerígenos descritos en las terapias dirigidas, los péptidos de los venenos animales como el

alacrán, han creado un enorme interés para usarse como modelos para diseñar nuevos fármacos anti-cáncer eficaces, ya que se ha demostrado que el veneno de alacrán de algunas especies pueden inhibir el crecimiento de varios tipos de líneas celulares cancerosas, y sólo unas pocas toxinas son responsables de estos efectos anticancerígenos ejerciendo su acción por tres diferentes mecanismos: 1) el bloqueo de un canal iónico específico (Jäger *et al.*, 2004); 2) inhibir la invasión de células de cáncer de unión a un sitio específico (diferente de un canal de iones) en la membrana plasmática (Deshane *et al.*, 2003); 3) la activación de vías intracelulares que inducen apoptosis (Gupta *et al.*, 2010).

De acuerdo a lo anterior existen reportes donde el veneno de alacrán es empleado para inducir muerte en células cancerosas *in vitro* e *in vivo*, por lo tanto, la opción que se propuso en esta investigación fue el uso de la fracción CII-6, una toxina que constituye el veneno de alacrán, de la especie *Centruroides limpidus*, dicha fracción, es una neurotoxina que inhibe la sinapsis neuronal mediante el bloqueo de canales iónicos, específicamente los de sodio; Anteriormente, la fracción CII-6 ha demostrado la capacidad de inducir muerte celular en líneas celulares cancerosas, dentro de las cuales se incluyen adenocarcinoma de cérvix uterino (HeLa) y carcinoma hepatocelular (HuH-7), (Rosas-Aguilar, 2016; Desales-Salazar, 2016); Por lo tanto, considerando que el neuroblastoma es un tumor que se origina a partir de células derivadas de la cresta neural, que son precursoras del sistema nervioso simpático y que a su vez presenta una sobreexpresión de los canales de sodio (Hernández-Plata, 2012), se sugiere que el efecto citotóxico de la fracción CII-6 sobre la viabilidad de estas células sea mayor a lo que se ha reportado anteriormente.

Para su evaluación, se empleó el plásmido *pDream2.1/MCS/CII-6*, en el que fue ensamblada la secuencia del gen CII-6 (Contreras-Ortiz *et al.*, 2016), cuya secuencia genética de 316 pares de bases esta reportada en la base de datos GenBank con número de acceso AF491132 (National Center for Biotechnology Information [NCBI], 2018); El plásmido fue transfectado en la línea celular de Fibroblastos Embrionarios de Ratón (NIH/3T3), células que fungieron como

productoras de la fracción CII-6; una vez identificada la transcripción de la fracción CII-6 en estas, el medio de las células productoras denominado como “condicionado”, fue recolectado, filtrado y aplicado como tratamiento a la línea celular de Neuroblastoma Humano (SH-SY5Y) con la finalidad de evaluar el efecto de la fracción CII-6 sobre la viabilidad celular. Por otro lado, también se analizaron las ventajas, desventajas y sus posibles mejoras a largo plazo.

2.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a la creciente tasa de incidencia y mortalidad ocasionadas por el cáncer, en específico aquellos tipos que afectan al cerebro y sistema nervioso central (Global Cancer Observatory [GLOBOCAN], 2018), dentro de los que se destaca el Neuroblastoma, tumor extracraneal pediátrico que se deriva de las células de la cresta neural del sistema nervioso simpático periférico (Lange *et al.*, 2019), en los últimos años se ha iniciado la búsqueda de tratamientos alternativos que puedan ayudar a erradicar la enfermedad, originado a que los métodos convencionales han mostrado algunos efectos secundarios en este tipo de cáncer (Secretaría de Salud, 2010). Por lo tanto, una alternativa para el tratamiento de esta enfermedad es el uso de moléculas biológicamente activas como es el caso de las proteínas presentes en el veneno de alacrán, las cuales han mostrado potencial como posible agente anti-cáncer.

El presente proyecto se enfoca a evaluar el efecto de la fracción CII-6 en la línea celular de Neuroblastoma Humano (SH-SY5Y), con la finalidad de determinar si esta es capaz de generar actividad antitumoral hacia las células antes mencionadas, ya que como se tiene conocimiento, la fracción CII-6, cuya secuencia genética de 316 pares de bases esta reportada en la base de datos GenBank con número de acceso AF491132 (NCBI, 2018), es una neurotoxina que inhibe la sinapsis neuronal mediante el bloqueo de canales iónicos, específicamente los de sodio; Ahora bien, considerando que el neuroblastoma es un tumor que se origina a partir de células derivadas de la cresta neural, que son precursoras del sistema nervioso simpático y que a su vez presenta una sobreexpresión de los canales de Sodio (Hernández-Plata, 2012), se sugiere que la fracción CII-6 producida por células de Fibroblastos Embrionarios de Ratón (NIH/3T3) y a su vez a través del medio obtenido de estas células productoras denominado como “condicionado”, actuará como tratamiento hacia las células blanco, demostrando la capacidad de reducir el porcentaje de viabilidad a través de su actividad antitumoral, la cual se ha evidenciado en investigaciones previas como lo es en la línea celular de Carcinoma Hepatocelular

(Desales-Salazar, 2016). Finalmente, a través de los resultados obtenidos, se pretende apoyar y complementar la información científica ya establecida.

3.- ANTECEDENTES

3.1.- EL CÁNCER

El cáncer: es un crecimiento tisular producido por la proliferación continua de células anormales con capacidad de invasión y destrucción de otros tejidos, este puede originarse a partir de cualquier tipo de célula en cualquier tejido corporal; no es una enfermedad única, sino un conjunto de enfermedades que se clasifican en función del tejido y de la célula de origen (Aibar *et al.*, 2009).

El cáncer surge de una acumulación progresiva de mutaciones y alteraciones genómicas en células progenitoras de tejidos normales y células madre, lo que resulta en una transformación maligna. Tanto los factores intrínsecos como los extrínsecos contribuyen a la acumulación de mutaciones y cambios genómicos; Las mutaciones se producen como consecuencia natural de la división celular repetida, aunque el ADN se replica con alta fidelidad, dado el tamaño del genoma y el número de divisiones celulares necesarias para el desarrollo y mantenimiento de los órganos, los errores aleatorios son inevitables. Adicional a lo anterior, se conoce, que los procesos celulares normales también contribuyen a la carga de mutación, ya que los subproductos naturales del metabolismo, como las especies reactivas de oxígeno, pueden causar daños en el ADN; Por otro lado los factores extrínsecos también desempeñan un papel importante en el desarrollo del cáncer e incluyen la exposición a la radiación, los carcinógenos y otros factores ambientales que aumentan el riesgo de cáncer durante la vida de una persona (Strong, 2018); En consecuencia, los efectos de los genes normales que controlan las funciones celulares normales, como el crecimiento, la supervivencia y la invasión / motilidad, se potencian en las células cancerosas y los de los genes que suprimen estos efectos se reprimen (Harrington, 2016), produciendo las denominadas características distintivas del cáncer.

Durante la progresión, las células cancerosas deben adquirir ciertas capacidades para asegurar la supervivencia y la expansión continua. Por lo tanto, el comportamiento biológico del cáncer se puede considerar en términos de cambios distintivos específicos y características habilitadoras adicionales, estas incluyen: Independencia del Factor de Crecimiento, Evasión de Supresores del Crecimiento, Resistir la muerte celular (Apoptosis), Inmortalidad del Potencial Replicativo, Inducción de Angiogénesis, Activar la invasión y Metástasis (Harrington, 2016; Strong, 2018); De igual manera, Douglas, & Weinberg (2011), mencionan dos características que han tomado importancia dado a los eventos que se desencadenan tras el desarrollo del cáncer y las más recientes terapias contra el mismo, estas son: Reprogramación del Metabolismo energético y Evasión de la Destrucción Inmune; En cuanto a la primera, se ha identificado que algunos tumores presentan dos tipos de poblaciones que se diferencian de acuerdo a sus vías de generación de energía; es decir, una subpoblación con células dependientes de glucosa que secretan lactato (Efecto Warburg), una segunda subpoblación, que importa y utiliza preferentemente el lactato producido por sus hermanas como principal fuente de energía, empleado durante el ciclo del ácido cítrico para llevarlo a cabo; Ambas poblaciones se considera que funcionan simbióticamente, ya que las células cancerosas hipóxicas dependen de la glucosa como energía y secretan lactato como desecho, que es importado y empleado preferentemente como energía por células cancerosas mejor oxigenadas.

Por otro lado, en cuanto a la evasión del sistema inmune, recientemente Gun *et al.*, (2019) explica que las células cancerosas son capaces de producir citocinas y quimiocinas que atraen un infiltrado diverso de células inmunes, principalmente constituido de macrófagos, neutrófilos y linfocitos; Estas células inmunes infiltrantes pueden producir mediadores citotóxicos, como especies reactivas de oxígeno (ROS), metaloproteinasas de matriz y citocinas (factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleucinas e interferones). En cuanto a los macrófagos, debido a sus altos niveles de plasticidad y diversidad celular, esto les permiten cambiar de fenotipo y polarizarse en diferentes subconjuntos en respuesta a una amplia variedad de señales ambientales, de acuerdo con el principio de polarización

binaria, hay 2 estado de polarización de macrófagos: M1 y M2. Los M1 "activados de manera convencional", son activados por interferón gamma (IFN- γ) y lipopolisacárido, produciendo citocinas proinflamatorias, óxido nítrico y/o intermediarios reactivos de oxígeno (ROI) para generar una respuesta inmune contra bacterias y virus. Los M2 "alternativamente activados", son activados por citocinas, incluidas Interleucina IL-4 e IL-10, producen citocinas antiinflamatorias, así también participando en curación de heridas y reparación de tejidos, a su vez a partir de estos dos tipos de células, se induce inmunidad supresora contra parásitos y células tumorales, en estas últimas promueven angiogénesis y remodelación de la matriz que conduce a la progresión del tumor y metástasis; Siguiendo lo anterior, se ha demostrado que los macrófagos tumor-asociados (TAM) en tumores *in vitro* exhiben un fenotipo mixto de macrófagos M1/M2, que expresa tanto M2 (CD163 y CD206) como M1 (IL-1 β , IL6, TNF- α y CCL3), asimismo estos promueven formación de vasos linfáticos, angiogénesis y metástasis a través de la expresión de factores de crecimiento endoteliales esenciales para ello, los cuales incluyen: VEGF-C, VEGF-D y VEGFR-3.

Derivado de la inestabilidad genética en las células cancerosas, se ha evidenciado que los neutrófilos están involucrados en el proceso de carcinogénesis a través de la liberación de derivados de óxido nítrico y ROS, como resultado, las ROS derivadas de neutrófilos, como la formación de HOCl (ácido hipocloroso) mediada por mieloperoxidasa (MPO), se ha asociado con mutaciones puntuales y daños en el ADN, adicional a lo anterior, HOCl puede activar enzimas proteolíticas, como MMP-2, MMP-7, MMP-8 y MMP-9, e inactivar el inhibidor tisular de la metaloproteasa 1 (TIMP-1), mejorando la actividad de MMP-9 y favoreciendo la invasividad de las células cancerosas. Al igual que los macrófagos, los neutrófilos asociados a tumores (TAN), exhiben fenotipos sesgados que pueden clasificarse como neutrófilos N1 y N2; En TAN murinos infiltrantes tempranos, inicialmente se presentan como neutrófilos de tipo N1 exhibiendo un fenotipo proinflamatorio y antitumoral; Sin embargo, a medida que el tumor progresa, las citocinas, principalmente el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) y el microambiente tumoral (TME) inflamatorio sesgan los TAN para convertirse en

neutrófilos similares a N2 donde exhiben un fenotipo pro-tumoral, produciendo que los neutrófilos del tipo N2 favorezcan la progresión tumoral y la metástasis a través de la liberación de VEGF para promover la angiogénesis, así también la expresión de Arginasa-1 suprime la actividad antitumoral de células T citotóxicas (Galdiero *et al.*, 2013; Gun *et al.*, 2019).

A diferencia de los macrófagos y neutrófilos, las células Natural Killer (NK) autorizadas desempeñan un papel claro en la inmunidad antitumoral al dirigirse a las células tumorales para inducir lisis, para protegerse de la muerte mediada por células NK, las células cancerosas liberan factores solubles inmunosupresores en el TME, ejemplo de ello, en células cancerosas de leucemia mieloide aguda, estas secretan mediadores solubles que activan la vía del receptor de hidrocarburos de arilo (AhR) en las células NK, afectando directamente la maduración y la función de las células NK. Por otro lado, la quimiocina CXCL10 secretada por células de carcinoma anaplásico de tiroides promueve la migración de células NK que expresan el receptor de quimiocinas CXCR3 al TME, estas células NK que se incrustan en el estroma tumoral regulan negativamente la expresión del receptor activador de células NK grupo 2 miembro D (NKG2D) y exhiben un fenotipo citotóxico suprimido en comparación con las células NK periféricas; Aunado a ello, también se ha confirmado que la deficiencia del receptor NKG2D en modelos murinos donde se indujo adenocarcinoma transgénico de próstata de ratón (TRAMP) que imita la enfermedad clínica humana, produce tumores altamente malignos y de aparición temprana, evidenciando que los ratones con deficiencia de NKG2D son tres veces más susceptibles que los compañeros de camada de tipo salvaje al TRAMP, demostrando que los mecanismos inmunes mediados por NKG2D limitan el desarrollo de la forma más agresiva de cáncer de próstata en ratones no deficientes a NKG2D y por el contrario favorecen la metástasis (Gun *et al.*, 2019; Guerra *et al.*, 2008).

Respecto a las células involucradas en la respuesta inmune adaptativa, las células T son uno de los principales componentes de esta, ahora bien, bajo el contexto del cáncer hay dos clases antagónicas de células T que tienen papeles importantes en

la lucha contra el cáncer, las cuales comprenden: Células T citotóxicas CD8⁺ y Células T reguladoras CD4⁺. Las células T citotóxicas CD8⁺ no activadas, en condiciones fisiológicas circulan dentro de la periferia hasta que reconocen algún antígeno presente en la superficie de las células presentadoras de antígeno (APC), posteriormente tras la unión del receptor de células T (TCR) al antígeno que se encuentra en la estructura denominada como complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) en la superficie de las APCs a través del enlace TCR-pMHC, se promueve la activación de las células T citotóxicas CD8⁺ vírgenes, simultáneamente proliferan y se diferencian en células T citotóxicas. Estas células T efectoras CD8⁺ se unen a las células objetivo que expresan el antígeno y liberan citotoxinas, como la perforina y la granzima B (GZMB), para inducir la lisis de las células objetivo; Sin embargo la presencia de células T CD8⁺ citotóxicas en regiones tumorales no garantizan la eliminación total de las células tumorales debido a una interacción constante entre el tumor y las células T CD8⁺, Estas células interactúan a través de tres fases de "inmuno-edición" del cáncer, las cuales son las siguientes: Fase1: Describe la eliminación inmune, donde las células T eliminan las células cancerosas, Fase 2: Describe el equilibrio inmune, donde las células tumorales sobrevivientes coexisten con las células inmunes antitumorales y Fase 3: Describe el escape inmune, donde las células tumorales sobrevivientes superan el control inmune y progresan a metástasis. Como mecanismo de seguridad para limitar la inmunopatología, las células T efectoras CD8⁺ pueden agotarse o sufrir apoptosis tras la exposición a antígenos a largo plazo; No obstante las células cancerosas con inestabilidad genética inherente generan neoantígenos, produciendo así que la exposición prolongada de las células T a una gran cantidad de antígenos afines induce una señalización que aumenta la expresión de moléculas inhibitoras, ejemplo de ello es la proteína 4 de linfocitos T citotóxicos (CTLA-4) y la proteína de muerte celular programada 1 (PD-1). CTLA4 se une fuertemente a CD28 y obstruye la señalización de co-estimulación para la activación de células T. Por otro lado, la interacción entre PD-1 y el ligando de muerte celular programada 1/2 (PD-L1 / 2) suprime la función efectora y promueve la apoptosis de células T; Ligado a lo anterior, se ha encontrado en muestras obtenidas de pacientes con carcinoma

hepatocelular muestran una alta expresión de PD1 en las células T CD8, asimismo se ha demostrado que la expresión de PDL-1 está altamente correlacionada con la frecuencia de células T reguladoras y el mal pronóstico, particularmente en pacientes con carcinoma basal, también se correlaciona la expresión de PD-1 con un pronóstico desfavorable en los subtipos de cáncer de mama luminal B HER2⁻ y luminal B HER2⁺. Por otro lado, mediante el uso de quimioterapia, se promueve aún más la expresión de PD-1 en las células T CD8⁺, lo que sugiere que la inhibición de las células T mediada por PD-1 podría ser la base de una respuesta fallida a la quimioterapia. Por último, para proliferar rápidamente y adquirir funciones efectoras, las células T CD8⁺ activadas dependen en gran medida de la glucólisis aeróbica como fuente de energía, ahora bien, también se sabe que las células tumorales emplean predominantemente esta vía metabólica para obtener energía y, por lo tanto, estas compiten con las células T CD8⁺ por la glucosa. Un TME pobre en glucosa inhibe la regulación positiva del fosfoenolpiruvato, que controla las funciones efectoras mediadas por Ca²⁺-NFAT, lo que resulta en la supresión de las células T, para ello se conoce que las células T expresan tres de las cuatro proteínas del tipo factor nuclear de células T activadas (NFAT) reguladas por calcio: NFAT1, NFAT2 y NFAT4; Estas proteínas son reguladores clave de la activación, diferenciación y desarrollo de las células T, esto es mediado posterior a la unión del receptor de células T (TCR) con el antígeno, lo que activa la vía de Ca²⁺-Calcineurina-NFAT, el calcio se une a la calmodulina, que a su vez activa la calcineurina fosfatasa dependiente de calmodulina, consecutivamente las proteínas NFAT se fosforilan mediante calcineurina activada, lo que conduce a su translocación nuclear y a la inducción de la transcripción génica mediada por NFAT, para ello, las proteínas activadoras 1 (AP1), son los principales socios transcripcionales de NFAT durante la activación de las células T (Gun *et al.*, 2019; British Society for immunology [BSI], 2020; Bastaki *et al.*, 2020; Macian, 2005).

Al igual que las células T CD8⁺, las células T reguladoras (T-regs) también se infiltran en el estroma tumoral, adicional a ello, las células T-regs, mediante el factor de transcripción FoxP3⁺ permiten evadir la inmunovigilancia induciendo tolerancia a través de la supresión de respuestas efectoras contra las células cancerosas; De

igual manera dado a que las células T-regs se infiltran en los tumores, estas se destacan en tumores como el cáncer de mama, donde el aumento de la expresión de FoxP3⁺ esta correlacionado con un mal pronóstico y un mayor riesgo de recurrencia, lo cual está ligado al equilibrio de células T CD8⁺ y T-regs en baja proporción de manera extra-tumoral, que por el contrario altas tasas intra-tumorales de T CD8⁺ y T-regs pronostican respuestas antitumorales débiles, lo cual también se ha presentado en resultados de tratamiento en cáncer de ovario, y vejiga. Por otro lado, BRAF, una proteína quinasa específica de serina/treonina, la cual se ha presentado en alrededor del 50% de los melanomas, albergando mutaciones BRAF activadoras (más del 90% de V600E). BRAF^{V600E} ha sido implicado en diferentes mecanismos de progresión del melanoma, y principalmente en la activación de la vía aguas abajo de MEK/ERK, evasión de senescencia, apoptosis, potencial replicativo no controlado, angiogénesis (a través de la activación dependiente de MEK de HIF-1 α y VEGF), invasión de tejidos y metástasis (mediante regulación positiva de varias proteínas involucradas en la migración, señalización de integrinas, contractilidad celular, interleucina-8 derivada de tumor y microambiente), así como la evasión de la respuesta inmune; Con respecto a la evasión de la respuesta inmune, se ha demostrado el reclutamiento temprano de células T-regs durante la tumorigénesis, la cual es mediada por BRAF^{V600E} como impulsor clave a este evento. Para este, BRAF^{V600E}, es esencial en la pre-activación de células T-regs en el drenaje de los ganglios linfáticos y también en el proceso de las células T-regs tímicos específicos de antígeno, sin embargo hay que destacar que no hay presencia de células T CD8⁺, la cual se sabe, es producto de la baja inmunogenicidad de los tumores autóctonos y su falta de neoantígenos fuertes, asimismo se presenta una falta de respuestas endógenas de células T CD8⁺ durante la tumorigénesis, debido a la presencia de las células T-regs, las cuales superan a las células T CD8⁺ durante el crecimiento temprano del tumor. Por último, esta respuesta de células T-regs conduce a la supresión de la inmunovigilancia de manera potente del cáncer, mediada por células T CD8⁺. Adicional a lo anterior, la expresión de CTLA4 en células T-regs bloquea la activación de las células T, es decir las T-regs expresan niveles constitutivamente altos de receptores de IL-2

(CD25, CD132), estos receptores se unen fuertemente a IL-2, una citocina también esencial para la proliferación y diferenciación de células T CD8⁺, en consecuencia, la presencia de T-regs resulta en el consumo de IL-2 en suero, lo que limita la diferenciación de las células T efectoras (Gun *et al.*, 2019; Bos *et al.*, 2013; Shananeh *et al.*, 2018; Ascieto *et al.*, 2012).

Finalmente tenemos a las células B, las cuales presentan propiedades promotoras o supresoras de tumores, dependiendo de sus subtipos; A través de su capacidad intrínseca para reconocer los antígenos y regular la presentación del antígeno, las células B influyen en la actividad de las células inmunes que expresan los receptores Fc, los receptores Fc son una familia heterogénea de glicoproteínas de membrana que unen la fracción Fc de la inmunoglobulina G (IgG) en forma de complejos inmunes, por otro lado, dentro de las funciones efectoras importantes de estos receptores se pueden encontrar la fagocitosis y la liberación de citoquinas proinflamatorias, de igual manera, la unión de estos receptores con su ligando, como la IgG, produce cambios conformacionales y por lo tanto activación de funciones efectoras como citotoxicidad dependiente de anticuerpos (proliferación de células B) e ingesta de complejos inmunes (activación de la internalización de antígenos capturados por anticuerpos). Con respecto a los subtipos de las células B, se conoce que estos pueden regular negativamente las respuestas inmunitarias de las células T, los cuales se han denominado células B reguladoras (B-regs), permitiendo a las células cancerosas escapar de la vigilancia inmune, a través de la secreción elevada de factores antiinflamatorios, como TGF- β e IL-10; Por otro lado, una parte de la respuesta inmune humoral es mediada por la interacción entre las células T auxiliares foliculares (células TFH) y las células B afines para impulsar la formación y el mantenimiento de las reacciones del centro germinal (GC); A su vez, las células TFH expresan el receptor de quimiocinas CXCR5, que los dirige a los folículos de células B a través de gradientes de la quimiocina CXCL13, de igual manera, también expresan el factor de transcripción Bcl-6 y el receptor co-estimulador ICOS. Tanto Bcl-6 como ICOS y Ascl2, han sido descritos como críticos para la diferenciación y el mantenimiento de las células TFH; No obstante, un rasgo característico de las células TFH, es la expresión elevada del receptor PD-1, que, a

través de su señalización, éste atenúa la señalización del receptor de antígeno de células T (TCR) e inhibe la expansión de la población, la producción de citocinas y la función citolítica de las células T, que como se ha mencionado anteriormente, promueve la tumorigénesis; Ligado a lo anterior, en cáncer de mama murino se sabe, que estas células cancerosas inducen la expansión de células T-regs para emplearlas en la metástasis pulmonar, este evento es producido a través de un subconjunto de células B reguladoras, denominadas tB-regs, estas se generan activamente a partir de células B normales en respuesta a los efectos directos de los factores producidos por el cáncer. Los tB-regs tienen un papel fundamental en la metástasis pulmonar, debido a que induce la conversión de células T CD4⁺ en reposo a células T-regs/FoxP3, esta conversión es dependiente de TGF- β , apoyando así la metástasis pulmonar de las células de cáncer de mama murino (4T1) (Khan *et al.*, 2015; Gómez, Cañas & Anaya, 2005; Olkhanud *et al.*, 2011; Gun *et al.*, 2019).

3.2.- CÁNCER EN EL MUNDO

De acuerdo con estadísticas recientes por parte del GLOBOCAN (2018), se estima que el número de casos nuevos de cáncer en 2018 para ambos sexos, en todas las edades es de 18, 078,957; de igual manera, el número de muertes causadas por Cáncer es de 9, 555 027 (**Figura 1 y Figura 2**). Dentro de los tipos de cáncer que han impactado la salud pública para ambos sexos, se encuentra: Pulmonar, Mama, Colorrectal, Próstata, Estómago, Hígado, Esófago, Cérvix Uterino y otros; Asimismo para México el GLOBOCAN (2018) ha establecido que el número de casos nuevos de cáncer se estima en 190, 667, así también menciona que el número de muertes es de 83, 476; Por su parte el INEGI (2018) muestra evidencia de que en México durante el periodo de 2011 a 2016, aproximadamente 50% de las muertes observadas por tumores malignos en la población de 0 a 17 años se deben a cáncer de órganos hematopoyéticos (conformado entre otros por la leucemia); No obstante, en el mismo sector de población, el cáncer de encéfalo y otras partes del sistema nervioso central ocupan el segundo lugar entre las cinco principales causas

de mortalidad por neoplasias malignas en la población analizada, en el periodo de interés.

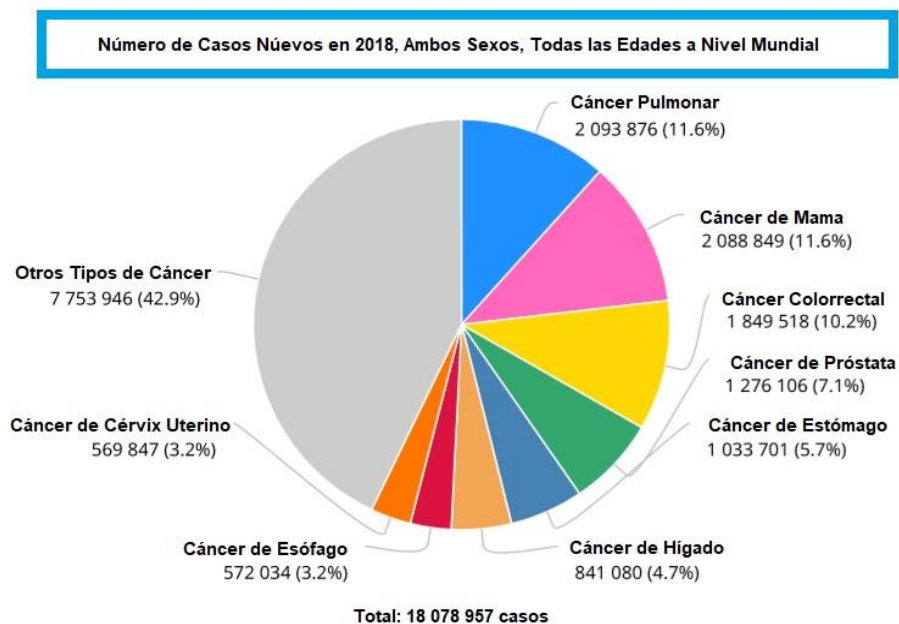


Figura 1. Número de Casos Nuevos en 2018 a nivel mundial en 2018, para ambos sexos y todas las edades.

Fuente: Tomado y Modificado de GLOBOCAN (2018).

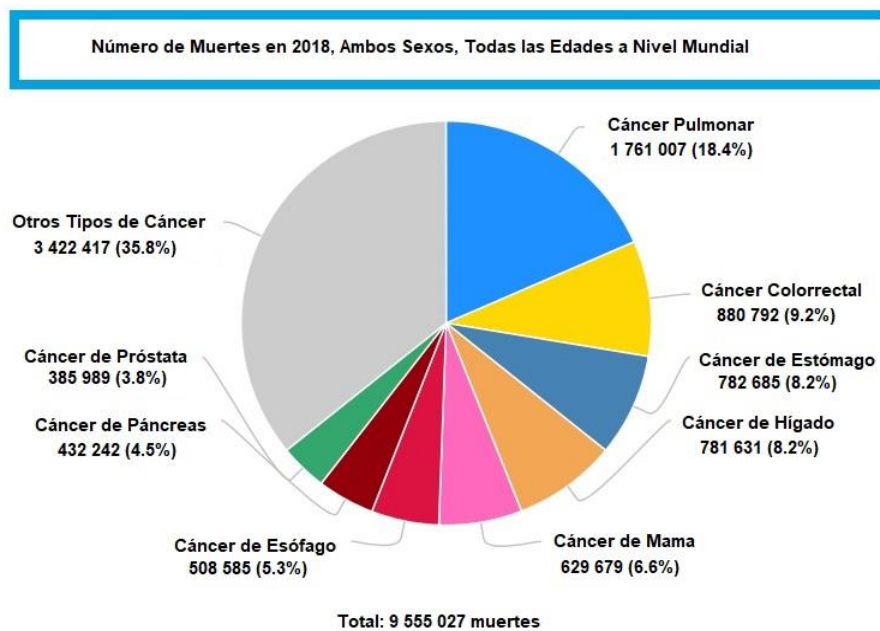


Figura 2. Número de Muertes en 2018 a nivel mundial en 2018, para ambos sexos y todas las edades.

Fuente: Tomado y Modificado de GLOBOCAN (2018).

3.3.- NEUROBLASTOMA HUMANO

De acuerdo con las estadísticas mostradas en la **Figura 3**, es evidente que los tipos de cáncer que se presentan en cerebro y el sistema nervioso tiene un impacto relevante a nivel mundial, dentro de los que destacan es el Neuroblastoma, el tumor sólido extracraneal más frecuente durante la infancia (Szewczyk, 2018); Los tumores del grupo de los neublastomas (tumores neuroblásticos) a su vez son definidos como tumores embrionarios del sistema nervioso simpático, derivados de la cresta neural y surgen en la médula adrenal, ganglios simpáticos paravertebrales y el sistema simpático paraganglionar, tales como el órgano de Zuckerkandl. Estas células primitivas de la cresta neural pueden migrar durante el desarrollo fetal, explicando así los múltiples sitios anatómicos donde se presenta este tumor, variando por lo tanto su localización y presentación clínica (Secretaría de Salud, 2010).

Número Estimado de Muertes en 2018, Cerebro, Sistema Nervioso, Ambos Sexos, Todas las Edades

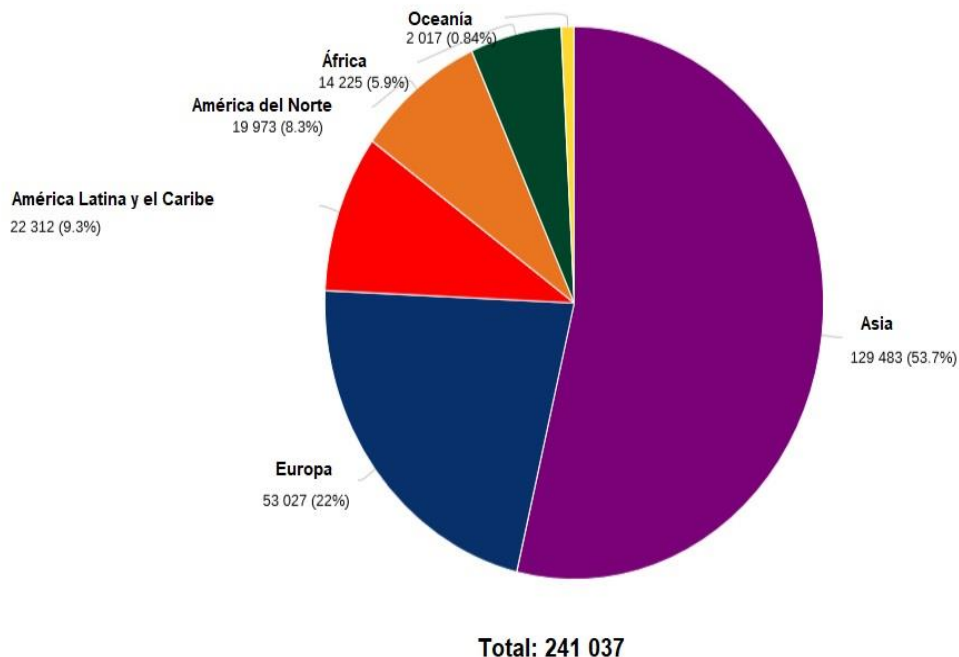


Figura 3. Número de Casos Nuevos en 2018 por Cáncer en Cerebro, Sistema Nervioso a nivel mundial en 2018, para ambos sexos y todas las edades.

Fuente: Tomado y Modificado de GLOBOCAN (2018).

Los pacientes con diagnóstico presuntivo, son sometidos a una evaluación inicial que permite conocer la etapa en la que se encuentra, para ello Newman *et al.*, (2018) considera realizar está, de acuerdo con lo que se muestra en la **Tabla 1**:

Tabla 1: Evaluación inicial para diagnóstico de Neuroblastoma	
Historia y examen físico	Masa abdominal, cervical o torácica indolora; efecto de masa de tumores primarios (vías respiratorias, médula espinal, órganos adyacentes), dolor óseo, metástasis ósea, nódulos subcutáneos, síndrome opsoclon-mioclono.
Imagen transversal (pecho / abdomen / pelvis) y Gammagrafía con metayodobencilguanidina (MIBG).	El tumor sólido invade y desplaza las estructuras contiguas, encierra los vasos sanguíneos principales, puede tener calcificaciones o necrosis, detectar enfermedad metastásica
Estudios de Laboratorio	Catecolaminas en orina elevadas (ácido vanilmanélico y ácido homovanílico, ferritina sérica elevada, lactato deshidrogenasa elevada.
Biopsia/resección tumoral y biopsias/aspirados de médula ósea	Histología neuroectodérmica inmadura o diferenciadora de células azules redondas pequeñas (pseudorosetas de Homer Wright).

Nota: Tomado y Modificado de Newman et al., (2018).

Para determinar la etapa en la que se encuentra el paciente, el Grupo Internacional de Riesgo de Neuroblastoma (INRG), emplea un sistema de clasificación que apoyado de múltiples factores de riesgo permite estratificar el pretratamiento del paciente, estos factores incluyen: Etapa de imagen de INRG, edad y patología (histología, diferenciación, amplificación de MYCN, diploidía y aberración). Las etapas de acuerdo con el sistema el Sistema Internacional de Estadificación del Grupo de Riesgo de Neuroblastoma (INRGSS), proporcionan el beneficio de la estadificación previa al tratamiento apoyado con imagen, evaluando la resecabilidad y el riesgo de complicaciones quirúrgicas, dichas etapas se enlistan a continuación: L1: Tumores bien circunscritos localizados dentro de un compartimento del cuerpo y que no involucran estructuras circundantes o vasos sanguíneos principales, los

tumores L1 son potencialmente susceptibles de resección en el momento del diagnóstico. Por otro lado, los tumores; L2: Tumores que demuestran invasión o encerramiento de estructuras vitales, rara vez son resecables en el momento del diagnóstico y tienen una supervivencia a 5 años sin eventos peor que los tumores L1, asimismo las características de L2 apoyan la consideración del riesgo quirúrgico y es más probable que justifiquen una biopsia inicial y quimioterapia neoadyuvante; M: Representa una enfermedad metastásica distante; y MS: se define como niños menores de 18 meses con un tumor primario localizado y metástasis en la piel, el hígado o la médula ósea (menos del 10% de afectación de la médula ósea). La MS también incluye pacientes con tumores primarios que se infiltran en línea media (Newman *et al.*, 2018). Actualmente la estadificación preoperatoria basada en el sistema INRGSS, como se ha mencionado anteriormente, considera también la presencia de factores de riesgo objetivos definidos por imagen y no es influenciada por la extensión de resección, estos criterios se enlistan en la **Tabla 2**. La combinación de estos factores permite estratificar a un paciente en los siguientes grupos de riesgo previos al tratamiento: muy bajo, bajo, intermedio y alto, no obstante, para estudios multicéntricos prospectivos actuales, los pacientes se dividen ampliamente en dos poblaciones: Alto Riesgo y No Alto Riesgo (Smith, & Foster, 2018; Newman *et al.*, 2018).

Tabla 2: Factores de riesgo definidos por imagen para tumores de neuroblastoma, Clasificación del INRGSS.	
Localización del tumor	Criterio
Cuello	Tumor que encierra la arteria carótida o vertebral, la vena yugular interna. Extensión a la base del cráneo. Compresión traqueal.
Unión Cervicotorácica	Tumor que recubre los vasos del plexo braquial, subclavio, vertebral o carotídeo. Compresión traqueal.
Tórax	Tumor que encierra aorta/ramas principales, tráquea/bronquios mayores.

	Tumores mediastínicos inferiores que se infiltran en la unión costovertebral entre T9-12.
Toracoabdominal	Encierra/Reviste aorta o vena cava
Abdomen y pelvis	Tumor que involucra/encierra porta hepatis y/o ligamento hepatoduodenal Tumor que involucra/encierra la arteria mesentérica superior (AME) en la raíz Tumor que involucra/encierra el origen del eje celíaco o AME Tumor que involucra/encierra uno o ambos pedículos renales Tumor que involucra/encierra aorta y/o vena cava Tumor que involucra/encierra vasos ilíacos o muesca ciática
Extensión tumoral intraespinal	Invasión mayor a 1/3 del plano axial y/o espacios leptomeníngeos perimedulares, imágenes anormales de la médula espinal.
Infiltración de estructuras adyacentes.	Pericardio, riñón, hígado, diafragma, duodeno, páncreas, mesenterio.
Tumor que involucra dos compartimentos corporales	Cuello-pecho, pecho-abdomen, extensión abdomen-pelvis
Condiciones registradas, pero no son factores de riesgo definidos por la imagen	Multifocal, derrame pleural, ascitis

Nota: Tomado y Modificado de Newman et al., (2018).

Asociado a lo anterior, se conoce que el 80% de los niños mayores y el 40% de los lactantes se diagnostican cuando el tumor está diseminado. La diseminación metastásica se realiza por vía hematológica y linfática. La diseminación por vía sanguínea es más frecuente a la médula ósea, hueso, hígado y piel. La diseminación linfática ocurre en el 35% de los casos. Cuando existen adenopatías

infiltradas fuera de la cavidad de origen, la enfermedad está ya diseminada; sin embargo, la diseminación linfática exclusiva tiene mejor pronóstico que la diseminación hematológica. La mayoría son de localización abdominal (65%), la localización adrenal es ligeramente más alta en niños (40%) que en lactantes (25%). En lactantes, son más frecuentes tumores cervicales y torácicos (Álvarez, & Lamarre, 2012).

En cuanto a la terapia del neuroblastoma, en la actualidad en la mayoría de las instituciones de América del Norte, ésta se divide en tres fases: inducción, consolidación y terapia de consolidación o mantenimiento posterior. El tratamiento actual tiene una duración aproximada de 18 meses e incluye lo que se muestra en la **Figura 4**.



Figura 4. Descripción general del tratamiento de neuroblastoma de alto riesgo.

Fuente: Tomado y Modificado de Smith & Foster (2018).

Cabe reiterar que aproximadamente más del 70% de los pacientes con neuroblastoma han progresado a lesiones malignas posterior al diagnóstico inicial, y a pesar de los avances recientes en la terapia de neuroblastoma, la tasa general

de supervivencia sigue siendo baja (Li *et al.*, 2018), lo que corresponde con lo que menciona Newman *et al.*, (2018), que, pese a que la supervivencia general ha mejorado, el 36% de los pacientes presentan una enfermedad metastásica de alto riesgo que es difícil de curar; para dicha muestra de pacientes, la tasa de supervivencia general se encuentra por debajo del 40%, incluso haciendo uso de terapia multimodal, que incluye quimioterapia mieloablativa, radioterapia, inmunoterapia y cirugía agresiva.

Aunado a lo anterior, el uso de tratamientos convencionales confiere efectos secundarios importantes, ejemplo de ello es que, al emplear cirugía, los problemas más frecuentemente encontrados, incluyen nefrectomía, hemorragia transquirúrgica y adherencias posquirúrgicas, daño a los vasos renal con subsecuente falla renal y déficit neurológico como síndrome de Horner. Por otro lado, a pesar de que la radioterapia desempeña un papel integral en el tratamiento de más del 50% de los casos de cáncer, donde se conoce que el 40% de los pacientes curados de cáncer han tenido radioterapia como parte de su tratamiento y a su vez, se ha convertido en la práctica estándar en el tratamiento de neuroblastoma, desafortunadamente, se conoce que induce efectos secundarios severos tardíos que pueden ser permanentes, con la incidencia significativa de daño al cuerpo vertebral, incluyendo detención del crecimiento, desarrollo de escoliosis, hipotiroidismo, disfunción gastrointestinal, defectos neurocognitivos, anomalías pulmonares y cardíacas, infertilidad y cánceres secundarios, no obstante, en cuanto a efectos secundarios a largo plazo, el más frecuente fueron anomalías musculoesqueléticas (Secretaría de Salud, 2010; Evans, & Staffurth, 2018; Zhao, 2020).

Respecto a la aplicación de quimioterapia, a pesar del éxito limitado por el mismo, desafortunadamente, este tratamiento confiere algunos puntos negativos a destacar, ya que como lo menciona Lai *et al.*, (2012), pese a que tiene la capacidad de destruir células cancerosas y suprimir de manera efectiva el crecimiento del tumor en pacientes con cáncer, una proporción significativa de los tumores no responde o más tarde desarrolla resistencia a estos quimioterapéuticos después del

tratamiento primario; Por otro lado, en estudios realizados por parte de Children's Oncology Group, los pacientes con tumor de alto riesgo, fueron sometidos a 5 ciclos de terapia de inducción con recolección de células madre de sangre periférica (PBSC). En la fase de consolidación, se empleó etopósido/carboplatino y ciclofosfamida, seguido por tiotepa/ciclofosfamida y radioterapia local. En cuanto al trasplante autólogo de células madre, este se ejecutó de la siguiente forma: once de los 33 pacientes (33%) no se sometieron a trasplante en el estudio y cinco de 22 pacientes (23%) que recibieron el primer trasplante no completaron el segundo planificado; Por último, como resultado de este estudio, hasta el momento de la publicación fallecieron 24 de 33 pacientes, las causas de muerte incluyeron progresión del neuroblastoma, infecciones tardías, complicaciones quirúrgicas e insuficiencia multiorgánica (Newman *et al.*, 2018).

La aplicación de inmunoterapia para el cáncer ha demostrado un avance importante, gracias a que tiene la capacidad de generar una respuesta inmune específica del tumor, capaz de eliminar selectivamente las células cancerosas. No obstante, a pesar de que la inmunoterapia ha demostrado alta eficacia para una variedad de neoplasias malignas (Wilcox, Ramakrishna, & Magee, 2018), solo una minoría de pacientes responde a este tratamiento cuando es aplicado como agente único.

Por otro lado, la inmunoterapia en tumores malignos pediátricos se ha centrado principalmente en la selección de antígenos no mutados con una expresión diferencial en células malignas versus células normales; En cuanto a neuroblastoma, los antígenos de superficie celular, son las moléculas blanco más comúnmente empleadas, estas no son restringidas por el complejo de histocompatibilidad principal (MHC) y son óptimas para la orientación a través de anticuerpos monoclonales o células efectoras inmunes modificadas, uno de ellos es el gangliósido GD2, gracias a este, actualmente el neuroblastoma es el único tumor sólido pediátrico para el cual la inmunoterapia es una modalidad terapéutica establecida, dado por la aprobación por parte de la Administración de Drogas y

Alimentos de los Estados Unidos (FDA) y la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) en 2015 hacia el Dinutuximab, anticuerpo anti-GD2 para neuroblastoma de alto riesgo (Kudva, & Modak, 2019),

GD2 es un glucolípidio ácido complejo que se expresa en la membrana celular externa. Prenatalmente, GD2 se expresa en células madre neurales y mesenquimales, por el contrario, su expresión postnatal en tejidos normales se limita a neuronas periféricas, sistema nervioso central, melanocitos de la piel, siendo así considerado como ideal para terapia antitumoral dirigida. GD2 se biosintetiza a partir de gangliósidos precursores GD3/GM3 por β -1,4-N-acetil galactosaminiltransferasa (GD2 sintasa). En células de neuroblastoma, se presentan niveles altos de transcripción de GM2/GD2 sintasa, actividad enzimática y expresión de GD2 con un estimado de 5-10 millones de moléculas/célula. GD2 no se inmunomodula fuera de la membrana celular y persiste en las membranas celulares de neuroblastoma después de la terapia, cabe señalar que los niveles circulantes de GD2 tanto en la sangre como en el líquido cefalorraquídeo (LCR) no son lo suficientemente altos como para interferir con la unión a anticuerpos monoclonales específicos contra GD2 (Sait, & Modak, 2017; Kudva, & Modak, 2019).

En cuanto a la aplicación de anticuerpos monoclonales específicos a GD2, Ladenstein *et al.*, (2018) llevó a cabo un estudio donde evaluó la aplicación de dinutuximab β (Clonado a partir de Ch14.18, también conocido como dinutuximab, en células de ovario de hámster chino), para éste, entre el 22 de octubre de 2009 y el 12 de agosto de 2013, 422 pacientes fueron elegidos para participar en la asignación al azar de inmunoterapia, de los cuales 406 (96%) fueron asignados aleatoriamente a un grupo de tratamiento (200 a dinutuximab β y 206 a dinutuximab β con IL-2 subcutánea). Cabe recalcar que para considerar a los participantes dentro de los criterios de selección se tomó en cuenta si los pacientes ya habían completado el régimen de inducción (Quimioterapia/ Resección quirúrgica) y si había recibido radioterapia en el sitio del tumor. Por otro lado, el uso de IL-2 como co-tratamiento se decidió para evaluar el efecto sobre la supervivencia, ya que IL-2

ha demostrado capacidad de aumentar el número de células NK y a su vez mejorar la citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos. Todos los participantes fueron sometidos a 6 ciclos de inmunoterapia más isotretinoína oral (*cis*-Ácido retinoico). De acuerdo con los resultados del estudio, detallados en la **Tabla 3**, es evidente la inducción de efectos secundarios por parte del tratamiento, siendo las más destacables las neurotoxicidades centrales, toxicidades periféricas, hipersensibilidad y dolor. Sin embargo, este último, una vez finalizado el quinto ciclo de inmunoterapia, no se presentó nuevamente, demostrando un panorama alentador para esta modalidad de tratamiento. No obstante, para establecer la inmunoterapia como modelo estándar para tratamiento en neuroblastoma de alto riesgo, es necesario continuar con las evaluaciones de los diversos tratamientos como IL2 y Dinutuximab β , ya que siendo estos dos los más estudiados, aun en conjunto no hay evidencia de que éstos mejoren los resultados en pacientes con neuroblastoma de alto riesgo que habían respondido al tratamiento estándar de inducción y consolidación.

Tabla 3: Eventos presentados mediante la aplicación de Dinutuximab β y Dinutuximab β con IL-2 subcutánea		
Eventos producidos por la inmunoterapia	Dinutuximab β	Dinutuximab β + IL2
1 evento posterior a los 3 años de tratamiento	83 (42%) de los 200 pacientes	80 (39%) de 206 pacientes
Supervivencia libre de eventos a 3 años posterior al tratamiento	56% de los pacientes	69% de los pacientes
Recaída o progresión a 3 años posterior al tratamiento	43% de los pacientes	40% de los pacientes
Supervivencia libre de eventos a 5 años posterior al tratamiento	53% de los pacientes	57 % de los pacientes
1 evento posterior a los 5 años de tratamiento	92 (46%) de 200 pacientes	88 (43%) de 206 pacientes
Supervivencia general a 3 años posterior al tratamiento	69% de los pacientes	70% de los pacientes

Supervivencia general a 5 años posterior al tratamiento	63% de los pacientes	62% de los pacientes
Muertes durante el tratamiento	1, el paciente desarrolló síndrome de dificultad respiratoria aguda en el contexto de una infección en el tercer ciclo de tratamiento.	1, el paciente presentó insuficiencia cardíaca congestiva e hipertensión pulmonar debido al síndrome de fuga capilar durante el primer ciclo de tratamiento.
Muertes tras 5 ciclos de inmunoterapia	1, el paciente presentó una infección micótica invasiva y falleció por falla multiorgánica.	1, el paciente murió de fibrosis pulmonar.
Neurotoxicidades Centrales	2% de los pacientes Alucinaciones y desorientación en 2 pacientes	6% de los pacientes. Alucinaciones y desorientación en 4 pacientes. Convulsiones en 6 pacientes 2 pacientes presentaron neurotoxicidad grave: 1 paciente con síndrome de encefalopatía posterior reversible (Se revirtió por completo), 1 paciente con encefalopatía y desmielizantes tóxicos (Mejoro, pero no se resolvió por completo).
Toxicidades Periféricas	1 paciente desarrollo iridoplejía bilateral durante el primer ciclo de tratamiento (No se recuperó por completo)	6 pacientes desarrollaron tetraparesia, retención urinaria y midriasis (Mejoro, pero no se resolvió por completo).
Reacciones de dolor	16% de los pacientes	26% de los pacientes
Hipersensibilidad	10% de los pacientes	20% de los pacientes
Deterioro del estado general	16% de los pacientes	41% de los pacietes

Nota: Tomado y Modificado de Ladenstein et al., (2018).

Con base a la evidencia mostrada previamente, es fundamental buscar alternativas de tratamientos que permitan mejorar los resultados de supervivencia y a su vez sin afectar la calidad de vida del paciente a corto y largo plazo debido a los efectos secundarios por parte de los tratamientos actualmente empleados.

3.4.- BIOTERAPIA

En la actualidad debido a las diversas enfermedades que surgen continuamente y a su vez su transición en epidemias mortales es necesario identificar agentes eficaces con un nuevo modo de acción a partir de fuentes naturales no explotadas, en vista de esto, recientemente, los venenos derivados de algunos animales en particular están recibiendo cierto interés entre la comunidad científica (Khusro *et al.*, 2018).

Curiosamente, los venenos de las serpientes, sapos, arañas y alacranes han sido explotados durante milenios en varias terapias convencionales con el fin de tratar una variedad de padecimientos, ejemplo de ello, es el veneno de serpiente, el cual ha sido utilizado en la medicina tradicional desde el siglo VII A. C., con el fin de prolongar la vida, tartar artritis y afecciones gastrointestinales. Por otro lado, las secreciones cutáneas de sapo seco (Chan Su) en la medicina tradicional China han sido utilizadas como agente diurético, anestésico y anticancerígeno. También es conocido que las tarántulas se usan en la medicina tradicional de poblaciones indígenas de México, América Central y del Sur para tratar una variedad de enfermedades, destacando asma y cáncer. Por su parte, el veneno de cobra se ha utilizado desde la década de 1930 para tratar diversas enfermedades como: asma, poliomielitis, esclerosis múltiple, reumatismo, dolor intenso y neuralgia del trigémino (King, 2011). Adicionalmente se tiene conocimiento de que los venenos de alacrán han sido aprovechados ampliamente desde la antigüedad en terapias tradicionales de diversos países, particularmente India, China, África, Cuba y España, a pesar de la influencia adversa de los venenos en la salud de la población humana. En cuanto a las enfermedades tratadas con del veneno de alacrán, se incluyen: dolor (analgésico), epilepsia, tétanos, nódulos subcutáneos, inmunización contra picaduras de alacrán, hernia inguinal, reumatismo y el más destacado cáncer (Khusro *et al.*, 2018; González, & Vallejo, 2013; Ortiz *et al.*, 2015; Díaz-García *et al.*, 2013; Contreras-Ortiz *et al.*, 2013; Ding *et al.*, 2014).

En los últimos, mediante investigaciones *in vitro* e *in vivo*, se ha demostrado el potencial anticancerígeno del veneno alacrán de especies de la familia *Buthidae*

contra diversos tumores tales como: glioma, neuroblastoma, leucemia, linfoma, mama, pulmón y próstata, dicho potencial, es producido al inducir arresto celular e inducción de apoptosis mediante la vía intrínseca y extrínseca. Por otro lado, una vez demostrado que el veneno de algunos alacranes presenta actividad anti-cáncer, las siguientes investigaciones se enfocaron en el uso de metabolitos asociados a los venenos de alacrán, particularmente las toxinas, con la finalidad de mejorar la especificidad y la eficiencia del tratamiento contra células cancerosas. Dentro de los mecanismos de acción que producen las toxinas sobre células cancerosas en su modalidad *in vitro* se han descrito las siguientes: inhibición del crecimiento a través del arresto del ciclo celular, inhibir la metástasis al bloquear canales iónicos como K⁺ y Cl⁻, y/o inducir apoptosis por vías intrínsecas y extrínsecas. Dentro de las líneas celulares cancerosas que han sido evaluadas las diversas toxinas, se destacan las siguientes: Carcinoma escamoso (NCI-H157), Adenocarcinoma pulmonar (NCI-H838), Glioblastoma humano (U-251), Carcinoma escamoso oral (HSC-4), Adenocarcinoma de próstata (PC-3/LNCAp), Carcinoma hepatocelular (Hep G2/SMMC-7721), Adenocarcinoma de mama (MCF-7/SK-BR-3), Carcinoma de próstata (DU 145), Adenocarcinoma Colorrectal (SW-480), Glioma de Rata (C6), Leucemia monocítica aguda (THP-1), Leucemia aguda de células T (Jurkat), Linfoma histocítico (U-937), Leucemia mieloide crónica (K-562), Glioma Maligno no diferenciado (F98), Neuroblastoma de ratón (F11) (Ding *et al.*, 2014; Desales-Salazar *et al.*, 2020).

Finalmente, con base a la información mencionada es importante continuar con el enfoque de la terapia moderna, a través de la identificación y evaluación de los principales constituyentes de los venenos de alacrán, destacando las toxinas derivadas de los mismo, que nos permitan desarrollar nuevas drogas anti-cáncer y para así, poder establecerlos como un tratamiento consolidado y/o en el uso de medicina complementaria y alternativa.

3.5.- COMPONENTES DEL VENENO DE ALACRÁN

El veneno de alacrán es una mezcla compleja de neurotoxinas, cardiotoxinas (polipéptidos causantes de afecciones cardíacas y contracción muscular), toxinas hemolíticas, péptidos antimicrobianos, enzimas, lípidos, nucleótidos, mucopolisacáridos, aminas biogénicas, fosfolipasas, hialuronidasas, inhibidores de proteasas, sales inorgánicas, serotonina, histamina, péptidos liberadores de histamina, aminoácidos libres, mucoproteínas, componentes heterocíclicos y probablemente otras moléculas desconocidas. No obstante, las neurotoxinas de alacrán (proteínas de bajo peso molecular) son los principales componentes del veneno y son responsables de los síntomas en el proceso de envenenamiento debido a que bloquean o modifican la función de los canales iónicos localizados en la membrana de las células excitables de una variedad de organismos (Ding *et al.*, 2014; Escalona *et al.*, 2014; Ortiz *et al.*, 2015)

De manera general, los componentes en el veneno de alacrán se clasifican de acuerdo con la estructura peptídica que presentan, en péptidos de puentes de disulfuro (disulfide bridges peptides o DBP) y péptidos sin puentes de disulfuro (non-disulfide-bridged peptides o NDBP). Los péptidos de puentes de disulfuro (DBP) se unen de manera específica a su estructura objetivo, principalmente a canales iónicos dependientes de voltaje, dentro de este tipo de péptidos se incluyen las toxinas, siendo estas los componentes de mayor interés por la comunidad científica, derivado de su actividad farmacológica sobre los canales iónicos y su relevancia clínica como neurotoxinas (Gómez *et al.*, 2019; Ortiz *et al.*, 2015).

En cuanto a la estructura secundaria de los péptidos de puentes de disulfuro (DBP), esta comprende una α -hélice adyacente a una lámina β de cadena antiparalela doble o triple, estabilizada por cuatro puentes disulfuro para aquellos que actúan sobre los canales de sodio y/o cloruro y tres puentes para aquellos que actúan sobre los canales de calcio y/o potasio. Adicionalmente, estos tienen dos polos de aminoácidos básicos positivos, produciendo que presenten una carga positiva neta, la cual se relaciona con su nivel de toxicidad, ya que esta carga mejora el

reconocimiento y la afinidad del péptido al sitio de unión, este último generalmente cargado negativamente. Asimismo, estos péptidos se clasifican en péptidos de cadena larga y/o corta, los péptidos de cadena larga poseen entre 58-76 residuos de aminoácidos, por otro lado, los péptidos de cadena corta presentan entre 20-53 residuos de aminoácidos. A su vez, los péptidos de cadena larga se clasifican dependiendo del efecto electrofisiológico en el canal iónico objetivo siendo estas toxinas α o β . Las toxinas α retrasan la inactivación del canal de Na^+ dependiente de voltaje, dicha inactivación es establecida de forma dosis-dependiente, es decir en concentraciones altas, en la célula excitable el potencial de acción es prolongado, induciendo parálisis en las células musculares, así también como arritmias en las células cardíacas, por otro lado, si la concentración es baja, las toxinas α inducen una fuerte despolarización de la membrana celular, seguida de una disminución de la excitabilidad. Respecto a las toxinas β , éstas activan la apertura de los canales a potenciales más negativos, desencadenando una respuesta muscular mioclónica y parálisis espástica que cambia dependiendo el tipo de tejido, cabe mencionar que algunas toxinas β también tienen la capacidad de unión a los canales de Na^+ produciendo un potencial de membrana más negativo, desplazando la curva de activación del canal de sodio en la dirección de hiperpolarización (inactivación del canal de Na^+) mediante la inducción de una reducción de la amplitud máxima de la corriente de sodio. Por otro lado, los péptidos de cadena corta están involucrados en la disfunción de algunos canales de potasio, dicha actividad es mediada tras la unión del péptido de cadena corta al canal iónico objetivo, produciendo el bloqueo de este, simultáneamente se reduce el tiempo que permanece abierto, ocasionando dificultades en la repolarización y la transmisión neural. También es conocido que algunas toxinas de cadena corta tienen la capacidad de bloquear canales de cloro y potasio, no obstante, el mecanismo de acción aún no ha sido investigado a detalle (Gómez *et al.*, 2019; Ortiz *et al.*, 2015; Nabi *et al.*, 2014; Suppiramaniam *et al.*, 2018; Pedraza-Escalona, & Possani, 2013)

Por otro lado, los péptidos sin puentes de disulfuro (NDBP) presentan entre 13-60 residuos de aminoácidos, la mayoría de ellos catiónicos. En cuanto a su estructura, estos presentan una estructura helicoidal secundaria, y a su vez se clasifican en 3

clases, con base a la organización de sus regiones helicoidales dentro del cuerpo principal del péptido, estas son: 1) Un domino α -hélice con dos regiones flexibles en espiral aleatorias (en los extremos), es decir que la cadena peptídica está conectada por enlaces de longitud fija y direcciones no correlacionadas (aleatorias), esta estructura, en proteínas denominadas como no estructuras permite exhibir una estructura funcional dependiendo de las condiciones micro-ambientales y de la presencia de posibles ligandos a través de los cuales se reflejaría su función, esto último ha sido evidenciado en péptidos aislados de veneno de alacrán como Mauriporin, el cual adapta una conformación anfipática α -helicoidal en un ambiente mimético de membrana, característica que es esencial para ejercer su actividad biológica anticáncer 2) Dos regiones α -hélice dentro del cuerpo peptídico principal separadas por una región en espiral aleatoria, 3) Estructura 100% en espiral. Gracias a su característica anfipática, esta les permite interactuar con estructuras cargadas negativamente, por ejemplo, cabezas de fosfolípidos de membrana, a través de fuerzas electrostáticas que producen cambios conformacionales, específicamente la formación de la hélice anfipática, produciendo de manera simultánea la penetración de la membrana y la inserción los residuos hidrofóbicos en la membrana. Este mecanismo de acción, en el cual no se tiene un objetivo molecular específico, da como resultado una diversidad de objetivos biológicos, dentro de las funciones biológicas a destacar, se incluyen las siguientes: actividad citolítica, antibacteriana, antifúngica, antiviral, antipalúdica, bradiquinina potenciadora, inmunomoduladora y anticancerígena (Gómez *et al.*, 2019; Ortiz *et al.*, 2015; Almaaytah, & Albalas, 2014; Almaaytah *et al.*, 2013; Smith, Fiebig, Schwalbe & Dobson, 1996; Cuevas, & Covarrubias, 2011).

Por último, también se conoce, que los componentes del veneno de alacrán se pueden clasificar con base al mecanismo de acción que ejecutan, dentro de esta, se encuentran los siguientes: Péptidos de defensa del huésped (HDP), desempeñan un papel importante en el sistema inmune innato, al inducir actividades antimicrobianas, quimiotácticas y reguladoras, derivado de sus funciones, son considerados como antimicrobianos de amplio espectro, parte de este grupo son péptidos ricos en cisteínas, como péptidos sin puentes de disulfuro (NDBP),

defensinas, péptidos semejantes a escorpinas. Escorpinas; péptidos de 59-75 aminoácidos, estabilizados por 3 puentes de disulfuro, adicionalmente, poseen dos dominios estructurales, con funciones diferentes, un dominio con actividad antimicrobiana y/o citolítica y un segundo dominio con actividad bloqueadora de canales iónicos, específicamente de K^+ . Defensinas: péptidos antimicrobianos estructuralmente semejantes a los bloqueadores de canales de K^+ , éstas presentan 3 puentes de disulfuro, con láminas α -hélice y β antiparalelas, con características anfipáticas y catiónicas (Gómez *et al.*, 2019; Santibáñez *et al.*, 2016; Romero *et al.*, 2018).

3.6- CANALES IÓNICOS

Los canales iónicos son proteínas integrales de membrana que permiten que iones particulares pasen a través de la membrana plasmática. La membrana plasmática actúa como barrera que separa los componentes internos de la célula del exterior, con la finalidad de que las concentraciones iónicas dentro de la célula puedan ser mantenidas a niveles considerablemente diferentes de aquellos en los fluidos extracelulares, lo que da como resultado la generación de un gradiente electroquímico entre el citoplasma y el medio externo a través de la membrana plasmática para cada especie de ion, este tipo de canales iónicos que se abre por cambios en el potencial de la membrana, se designan como canales iónicos activados por voltaje. Por otro lado, los canales iónicos que se abren mediante la unión de un ligando, como una hormona o un neurotransmisor, se denominan canales iónicos activados por ligando. En ambos tipos de canales iónicos, la apertura conducirá el paso de iones por su respectivo gradiente electroquímico, mediante la creación de un poro acuoso que se vuelve accesible a los iones después de un cambio conformacional en la estructura de la proteína, produciendo la apertura de los canales iónicos. Una vez abiertos, los canales iónicos muestran selectividad para el tipo de iones que pueden pasar a través de ellos. A pesar de que algunos canales iónicos solo permiten el paso de un catión o anión específico, como es el caso de los canales de sodio (Na^+) y de potasio (K^+), existen otros canales iónicos que permiten el paso de un grupo más amplio de iones, ejemplo de

ello, son los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), un tipo de canal iónico que permiten que los iones Na^+ , Ca^{2+} y K^+ fluyan a través de ellos (Barker *et al.*, 2017; Desales-Salazar *et al.*, 2020).

3.6.1-. CANALES IÓNICOS ACTIVADOS POR VOLTAJE

Los canales iónicos activados por voltaje, como su nombre lo indica, se activan por cambios en el potencial de membrana, desempeñan un papel fundamental en la generación y facilitación de la transmisión de información, en forma de potenciales de acción, dentro del sistema nervioso central, sistema nervioso periférico y el sistema cardiovascular. Los principales canales iónicos dependientes de voltaje incluyen los canales de sodio (Na^+), canales de calcio (Ca^{2+}) y canales de potasio (K^+) (Barker *et al.*, 2017; Weir, 2020).

3.6.1.1 CANALES DE CALCIO

Los canales de calcio dependientes de voltaje (VDCC), se clasifican de acuerdo con las características electrofisiológicas que empelan para abrir y cerrar, los VDCC, se clasifican en dos clases principales: canales activados por alto voltaje (HVA) y canales activados por bajo voltaje (LVA) (**Figura 5**). El umbral de activación para los canales HVA tiene un rango de -40 a -10 mV, por el contrario, los canales LVA ocurre a potenciales de membrana más bajos de -60 a -70 mV. Los canales HVA se dividen además en canales tipo-L, tipo-N, tipo-P/Q y tipo-R, por otro lado, los canales LVA consisten solo en canales tipo-T. A pesar de los diversos tipos en los que se clasifican los canales de calcio, mantienen una estructura molecular común, la cual consiste en una subunidad α principal, formadora de poros de aproximadamente 2000 aminoácidos y un peso molecular de alrededor de 190-250 kDa; La subunidad α se organiza en una proteína transmembrana y se divide en cuatro dominios homólogos (I-IV), cada uno con seis segmentos transmembrana (S1-S6) y terminales N y C intracelulares. Los segmentos S4 contienen residuos de lisina y arginina cargados positivamente, que actúan como "sensores de voltaje",

detectando posibles cambios a través de la membrana. Bajo la influencia de un campo eléctrico, cada segmento homólogo se somete a un movimiento giratorio, iniciando así el cambio conformacional general que permite que se abra el canal de poros. Los cuatro bucles formados en los segmentos S5-S6 de cada dominio forman una estructura de horquilla, que recubre el interior del poro y determina la conductancia iónica y la selectividad y, frecuentemente, contribuye a los principales sitios de unión a fármacos. La selectividad de iones Ca^{2+} está determinada por un par de residuos de glutamato en cada segmento, una característica exclusiva de los canales Ca^{2+} . Por otro lado, la subunidad α se asocia con la subunidad β , la cual es una subunidad auxiliar intracelular, existen cuatro isoformas ($\beta 1$ - $\beta 4$) con variantes de empalme para cada isoforma que se agrega a la diversidad. En todos los canales de calcio HVA, la subunidad β se co-expresa con la subunidad α , sin embargo, no se ha informado la co-expresión en los canales de calcio LVA. La subunidad $\alpha 2\delta$ (isoforma de la subunidad β , o $\text{Cav}\alpha 2\delta$) está fuertemente glucosilada y se divide postraduccionalmente en proteínas $\alpha 2$ y δ , unidas por un enlace disulfuro, esta subunidad es un modulador significativo de la actividad de VGCC, ya que es responsable del tráfico de canales de Ca^{2+} a la membrana plasmática, asimismo también tiene funciones en la función sináptica, no solo está presente extracelularmente. Otra subunidad auxiliar es $\text{Cav}\beta$, la cual desempeña un papel como chaperona durante el ensamblaje del canal de Ca^{2+} , tiene actividad en el tráfico hacia la membrana plasmática y actúa como modulador de la activación del canal, tanto a través de la interacción directa del canal como a través de la interacción con otras proteínas reguladoras, como la proteína presináptica RIM1. También se incluyen $\text{Cav}\gamma$ como subunidad auxiliar, ésta es una proteína de membrana integral, que se ha demostrado que se relacionan con otras proteínas de membrana, como el receptor ácido α -amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazol-propiónico (AMPA) y también representar proteínas de membrana multifuncionales. Por el contrario, se cree que los canales de calcio LVA se forman en ausencia de estas subunidades auxiliares. Dado a que ambas familias de canales de Ca^{2+} a través de la traducción de señales eléctricas, regulan la entrada de este catión, la concentración intracelular de Ca^{2+} , permitirá que ciertos procesos en la célula sean

controlados, incluyendo, transcripción y expresión génica, señalización celular, muerte celular, secreción y liberación de neurotransmisores, contracción y memoria muscular; Como ejemplo, en el músculo cardíaco y liso, la contracción se inicia por la entrada directa de Ca^{2+} a través de estos canales, por otro lado en las neuronas, los canales de Ca^{2+} inician la transmisión sináptica (Barker *et al.*, 2017; Suppiramaniam *et al.*, 2018).

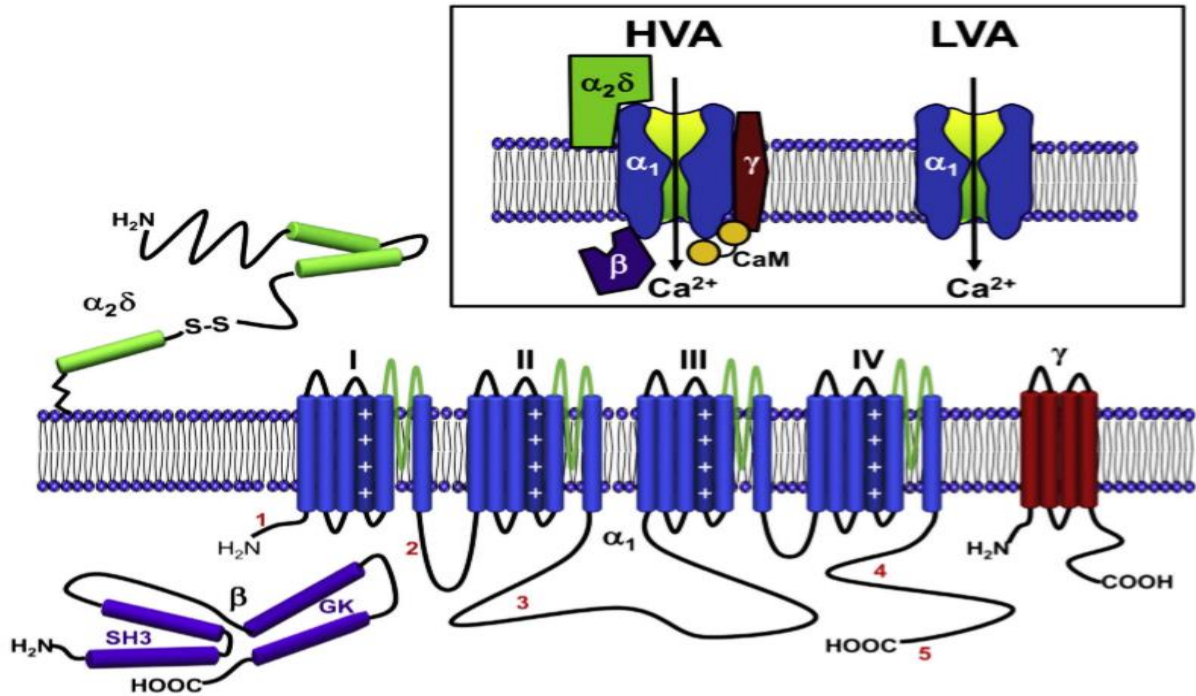


Figura 5. Topología de canales de Ca^{2+} activados por voltaje HVA y LVA.

Los canales de HVA son heteromultímeros que consisten en una subunidad α que forma poros (color azul), dividida en 4 dominios homólogos (I-IV), cada uno con seis segmentos transmembrana (S1-S6), subunidades $\alpha_2\delta$ extracelulares (color verde) y $\text{CaV}\beta$ intracelulares (color morado), a veces, una subunidad $\text{CaV}\gamma$ auxiliar transmembrana (color vino). La modulación del complejo del canal Ca^{2+} está establecida en gran medida por los determinantes moleculares de la subunidad α_1 : (1) Sitio de asociación de la calmodulina de la proteína de unión a Ca^{2+} amino terminal en los canales $\text{CaV}1$; (2) Unión de $\text{CaV}\beta$ (dominio de interacción α , AID); Proteínas de la familia $\text{CaV}2$ también son subunidades $\text{G}\beta\gamma$ de la proteína G (Su función es transmitir señales extracelulares a componentes de señalización intracelular y mediar diversas respuestas fisiológicas) en sitios en la región de enlace del dominio I-II; (3) Sitio de interacción de proteínas sinápticas (synprint) en canales $\text{CaV}2$; (4) Sitio de asociación calmodulina en canales $\text{CaV}1$ y $\text{CaV}2$; y (5) Andamiaje de sitios de interacción de proteínas en canales $\text{CaV}2$.

Fuente: Tomado y Modificado de Barker *et al.*, 2017; Martínez-Bastidas *et al.*, 2017.

Respecto a las isoformas de los canales Ca^{2+} , de acuerdo con sus subunidades $\alpha 1$, se clasifican en tres familias funcionalmente diferentes: CaV1 y CaV2 (HVA) y CaV3 (LVA). La familia CaV1 codifica la corriente de Ca^{2+} tipo-L, la cual consiste en una corriente que es inactivada relativamente lento, en esta familia, se incluyen CaV1.1, expresado exclusivamente en los músculos esqueléticos y, respectivamente, los subtipos neuronal, cardíaco y endocrino, CaV1.2, CaV1.3 y CaV1.4. En la familia CaV2, el gen CaV2.1 codifica las corrientes de Ca^{2+} de tipo-P y tipo-Q; CaV2.2 codifica corriente del tipo-N “neuronal”; Tanto CaV2.1 como CaV2.2 se expresan en las dendritas neuronales y en los terminales presinápticos y CaV2.3 se encuentra en los cuerpos y las dendritas de las células neuronales y codifican corrientes del tipo-R, las cuales presentan una inactivación más rápida que la corriente de tipo P/Q o N. Finalmente, en la familia CaV3, las corrientes formadas por las isoformas, CaV3.1, CaV3.2 y CaV3.3, muestran una inactivación dependiente de voltaje rápida del tipo-T (Transitoria). Los canales CaV3 se expresan ampliamente en neuronas del sistema nervioso central y periférico, sus funciones varían, desde el control del tono vascular hasta el marcapasos, pero en el sistema nervioso central CaV3 actúa para regular la excitabilidad neuronal (Barker *et al.*, 2017).

3.6.1.2 CANALES DE POTASIO

Los canales de K^+ comprenden una superfamilia de proteínas transmembrana, diversidad que se debe principalmente a la gran cantidad de genes que codifican a estos canales, los cuales están presentes en la membrana plasmática y orgánulos intracelulares en todas las células, conducen K^+ (generalmente, aunque no siempre) fuera de la célula a través de la membrana de ciertos tejidos excitables en los sistemas nervioso y cardíaco, esto producido por estímulos, entre ellos, voltaje, calcio intracelular, pH, nucleótidos e iones Na^+ . Desempeñan un papel crítico en la regulación de la excitabilidad neuronal, duración del potencial de acción, secreción de hormonas, relajación del músculo liso y repolarización de los músculos cardíacos. Por otro lado, en células no excitables, tienen funciones esenciales en el

control del potencial de membrana, factor clave en la señalización celular (Barker *et al.*, 2017; Suppiramaniam *et al.*, 2018).

Los canales de K⁺ contienen cuatro subunidades (tetrámero) que rodean el poro central y cada subunidad contiene seis dominios transmembrana (TM1-TM6); El dominio formador de poros, está constituido partir de los dominios transmembrana 5, 6 y el bucle P formado entre estos dominios, a su vez dicho dominio forma el filtro de selectividad, el cual presenta un motivo conservado TVGYG, único entre los canales iónicos, produciendo que dicho dominio sea extremadamente selectivo (10,000 veces más permanente para K⁺ en comparación con Na⁺) y pueda conducir iones K⁺ rápidamente. Los aminoácidos con carga positiva (Arginina y Lisina) permiten la detección de voltaje, ya que son eléctricamente sensibles, ubicados en el cuarto dominio transmembrana (**Figura 6**). Adicionalmente, incluyen, subunidades auxiliares (subunidades β), que son proteínas que se asocian con una subunidad α en una estequiometría $\alpha 4\beta 4$, estas subunidades no conducen corriente por sí mismas, sino que modulan la actividad de los canales Kv (**Figura 7**). Por otro lado, los canales de potasio dependientes de voltaje se clasifican electrofisiológicamente de acuerdo con la cinética de inactivación (la velocidad a la que se inhibe la conductancia de K⁺ después de la apertura del canal), en dos grupos: rectificadores retardados y corrientes A. Los canales del tipo rectificadores retrasados tienen una inactivación lenta o ausente (segundos) mientras que los del tipo corrientes A demuestran una inactivación rápida (milisegundos) (Barker *et al.*, 2017; Suppiramaniam *et al.*, 2018; Kuang, Purhonen, & Hebert, 2015).

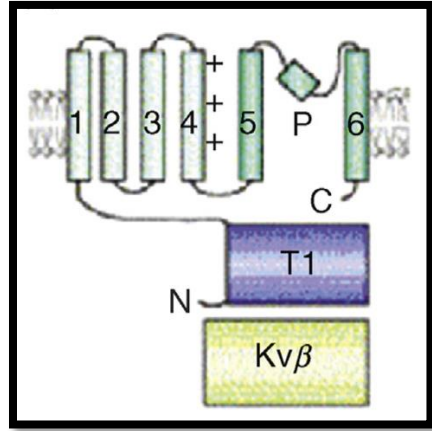


Figura 6. Esquema de los canales de K⁺ activados por voltaje.

Presentan un núcleo tetramérico de hélices que forma el poro del canal de K⁺. Presentan una estructura de seis dominios transmembranas y cuatro hélices transmembranas que median la sensibilidad del voltaje. El ensamblaje del canal está mediado por el dominio de tetramerización (T1) y la subunidad β interactúa con T1 para regular la sensibilidad del voltaje.

Fuente: Tomado y modificado de: Suppiramaniam et al., 2018.

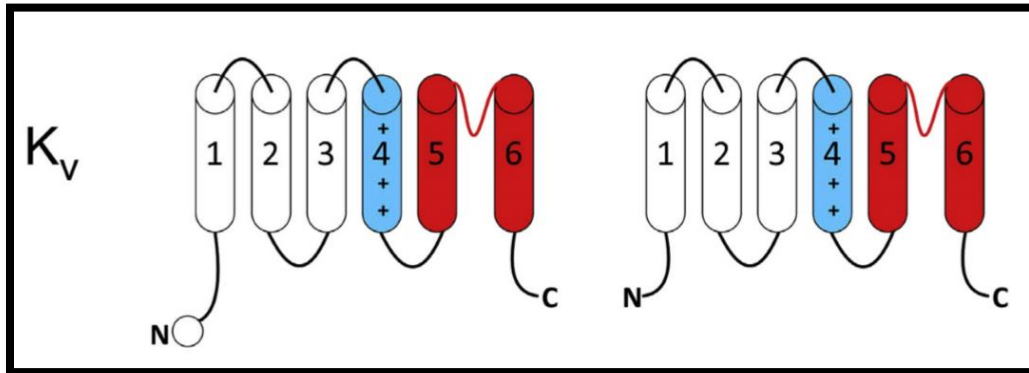


Figura 7. Dominios transmembrana canales K⁺.

Todas las subunidades de los canales de K⁺ contienen seis dominios transmembrana con terminales N y C intracelulares, un dominio de detección de voltaje dentro de TM4 (cilindro azul) y un dominio formador de poros constituido por los dominios transmembrana 5, 6 y el bucle P entre estos dos dominios (cilindros rojos y lazo). El canal de iones K_v completamente formado está compuesto por cuatro subunidades, ya sea homo o heterotetramero.

Fuente: Tomado y modificado de: Barker et al., 2017.

De acuerdo con sus propiedades electrofisiológicas, las diversas isoformas de los canales de K⁺ activados por voltaje, son agrupadas como se muestra en la **Tabla 4**.

Tabla 4: Isoformas de los canales de K⁺ activados por voltaje	
Kv1	Kv1.1, Kv1.2, Kv1.3, Kv1.5, Kv1.6, Kv1.7 y Kv1.8 pertenecen al tipo: rectificadores retardados Kv1.4 pertenece al tipo: corrientes A
Kv2	Kv2.1, Kv2.2 pertenecen al tipo: rectificadores retardados
Kv3	Kv3.1 y Kv3.2 perteneces al tipo: rectificadores retardados Kv3.3 y Kv3.4 pertenecen al tipo: corrientes A.
Kv4	Kv4.1, Kv4.2 y Kv4.4 pertenecen al tipo: corrientes A
Kv5 y Kv6	Kv5.1, Kv6.1, Kv6.2, Kv6.3 y Kv6.4, presentan una subunidad silenciada.

Nota: Tomado y modificado de Suppiramaniam et al., 2018.

3.6.1.3 CANALES DE SODIO

Los canales de sodio dependientes de voltaje son grandes proteínas integrales de membrana. Estructuralmente, consiste en una subunidad α formadora de poros, ésta es un polipéptido único de aproximadamente 1700–2000 residuos de aminoácidos con un peso molecular de aproximadamente 260 kD, a su vez consta de cuatro dominios homólogos (DI– DIV), cada uno de los cuales contiene seis segmentos transmembrana α -helicoidales (S1-S6) conectados por bucles intracelulares o extracelulares, también presentan un extremo C-terminal y N-terminal ubicados intracelularmente. La selectividad y la permeación de iones Na⁺ se logran mediante un filtro de selectividad y poro de entrada del ión, los cuales están formados por la unión de los segmentos transmembrana S5 a S6 de cada dominio mediante un bucle P. Estos bucles contienen cuatro aminoácidos conservados: aspartato (D), glutamato (E), lisina (K) y alanina (A), denominados el motivo DEKA, y forman la parte más estrecha del canal. Po otro lado, los segmentos S4 de cada dominio contienen repeticiones de residuos cargados positivamente de

arginina (R) o lisina (K) separadas por dos residuos hidrófobos. Esta orientación permite la formación de una hélice α . Son estos residuos cargados positivamente los que forman el sensor de voltaje, no solo para el canal de Na^+ , sino también para los canales de Ca^{2+} y los canales de K^+ . La disposición de los residuos positivos es tal que se alinean a lo largo de un lado del segmento S4, permitiendo que cada uno de los segmentos S4 responda a los cambios en el voltaje de la membrana y se mueva, ya sea linealmente o en espiral, hacia afuera, abriendo así el canal. El movimiento de las cargas positivas S4 fuera de la membrana durante la activación del canal puede detectarse y se conoce como corriente de activación. El movimiento hacia afuera de los segmentos S4 se combina con el movimiento de la puerta de inactivación rápida, el conector citoplasmático, el cual es un bucle intracelular corto que conecta los dominios III y IV, a través del segmento 6 y 1 de dichos dominios, denominado como conector DIII-IV, responsable de la de la inactivación del canal. La inactivación rápida del canal Na^+ ocurre dentro de un marco de tiempo de 1-2 ms, para ello se requiere un grupo de tres aminoácidos hidrofóbicos, isoleucina (I), fenilalanina (F) y metionina (M), conocidos como el motivo IMF, ubicados dentro del conector DIII-IV para la inactivación rápida. También contienen sitios adicionales para la inactivación rápida, los cuales incluyen residuos dentro de dominio IV segmento 6 y dentro del bucle formado en los S4-S5 en los dominios III y IV, que actúan como sitios de "acoplamiento" para la puerta de inactivación rápida. El extremo C terminal del canal Na^+ también puede interactuar con el conector III-IV para estabilizar la puerta de inactivación y evitar la reapertura del canal. Se cree que la inactivación rápida de los canales de Na^+ contribuye a la posible finalización de la acción y a la regulación del período refractario. Bajo despolarización prolongada, los canales de Na^+ se someten a un proceso conocido como inactivación lenta. En contraste con la inactivación rápida, la inactivación lenta ocurre en una escala de tiempo mucho más lenta de segundos y es un proceso más complejo que no involucra la puerta de inactivación rápida, pero probablemente involucra cambios conformacionales en el filtro de selectividad y los segmentos S6 como pasos clave en la transición al estado de inactivación lenta. Se cree que la inactivación lenta contribuye a la excitabilidad general de la membrana al aumentar

los umbrales del potencial de acción, lo que limita la duración de la explosión del potencial de acción y, lo que es más importante, limita la propagación de potenciales de acción dentro de las dendritas. Una vez que el canal de Na^+ ha entrado en el estado desactivado, tiene que recuperarse al estado cerrado para que se abra en la próxima despolarización. La recuperación ocurre durante la repolarización de la membrana e implica el movimiento de los segmentos S4 de regreso a la membrana y la reubicación de la puerta de inactivación lejos del poro (**Figura 8**) (Barker *et al.*, 2017; Suppiramaniam *et al.*, 2018; Catterall, 2012; Catterall, 2014).

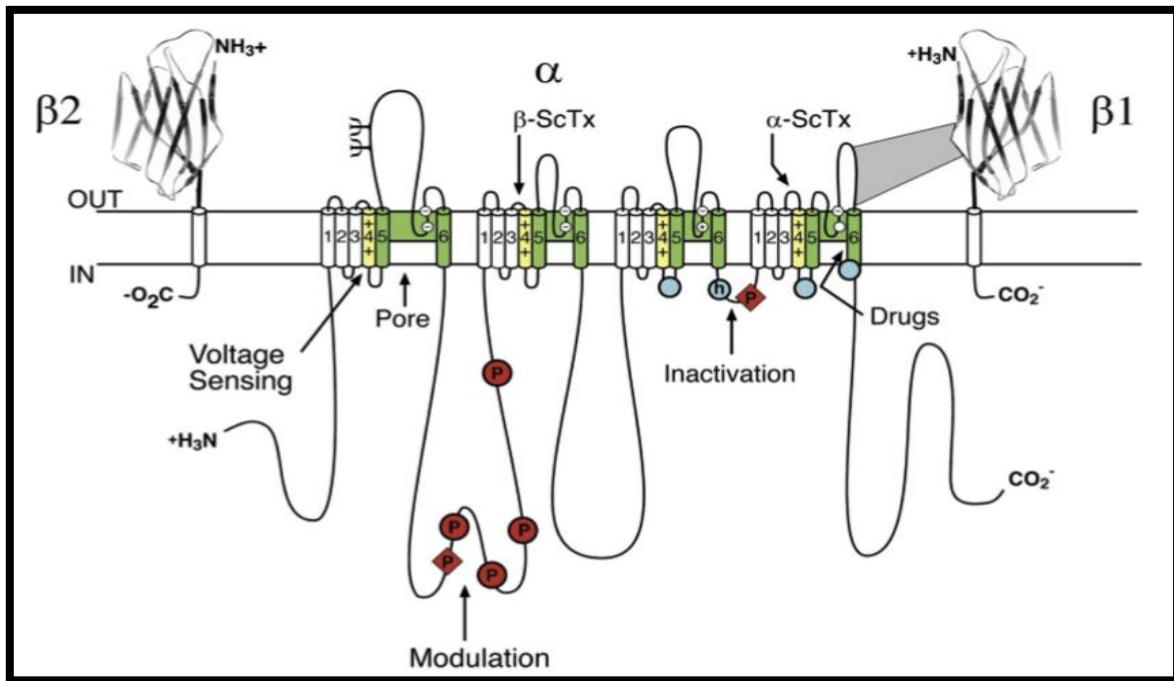


Figura 8. Estructura del canal de Na^+ dependiente de voltaje.

Cilindros representando segmentos α -helicoidales. Líneas en negrita representan las cadenas de polipéptidos de cada subunidad (Longitud aproximadamente proporcional al número de residuos de aminoácidos en los subtipos de canales de sodio). Los dominios extracelulares de las subunidades $\beta 1$ y $\beta 2$ se muestran como pliegues de tipo inmunoglobulina ψ , sitios de probable glicosilación ligada al extremo N terminal; P en círculos rojos, sitios de fosforilación de proteínas demostrada por PKA (Círculos) y PKC (Diamantes); Segmentos verdes con revestimiento de poros; Círculos blancos, los anillos externos (EEDD, residuos de aminoácidos: glutamato, metionina y aspartato) e internos (DEKA, residuos de aminoácidos: aspartato, glutamato, lisina y alanina) de residuos amino que forman el filtro de selectividad de iones; Amarillo, sensores de voltaje S4; H en círculo azul, partícula de inactivación en el bucle de la puerta de inactivación; círculos azules, sitios implicados en la formación del receptor de la puerta de inactivación. También se muestran sitios de unión de toxinas de escorpión α y β y un sitio de interacción entre subunidades α y $\beta 1$.

Fuente: Tomado y Modificado de Barker *et al.*, 2017; Denac, Mevissen, & Scholtysik, 2000.

A pesar de que la expresión de la subunidad α es suficiente para formar el canal conductor de iones, la modulación de los niveles de expresión del canal y la activación implican una o más de las subunidades β auxiliares ($\beta 1-4$), dichas subunidades están compuestas de un dominio extracelular similar a la inmunoglobulina en el extremo N terminal, una única hélice α transmembrana y un segmento intracelular corto en el extremo C terminal. Los canales de Na^+ interactúan con dos clases funcionales de subunidades β auxiliares, de las cuales $\beta 1$ y $\beta 2$ son los miembros originales. Una tercera subunidad auxiliar, $\beta 3$, es estructuralmente más similar a $\beta 1$ que comparte una identidad de secuencia del 57%, y una cuarta subunidad, $\beta 4$, es homóloga a $\beta 2$; A su vez, se cree que $\beta 1$ y $\beta 3$ interactúan con la subunidad α de una manera no covalente y modulan la activación, inactivación ($\beta 1$ involucrada en la activación e inactivación acelerada del canal), recuperación de los parámetros de activación de los canales de Na^+ (inactivación de voltaje alterado), adicionalmente $\beta 1$ promueve el aumento de la corriente máxima; Estudios de estructura y función han identificado el bucle P del dominio IV de la subunidad α del canal Na^+ como un punto de interacción probable para el dominio extracelular de $\beta 1$ y probablemente $\beta 3$, lo que explica el ajuste fino de la activación del canal de Na^+ y la inducción de la inactivación. También se sugiere una interacción entre el dominio intracelular de la subunidad β y el canal de Na^+ la cual podría modular la inactivación del canal y/o el tráfico del canal a la membrana. Por otro lado, la co-expresión de la subunidad $\beta 2$ con los canales de Na^+ conduce a alteraciones en los parámetros de activación del canal. $\beta 4$ es responsable de la generación de corrientes de Na^+ resurgentes, estas corrientes únicas se generan como resultado del bloqueo del canal abierto de la subunidad α a voltajes despolarizados, y simultáneamente el desbloqueo posterior producido por la repolarización, dando como resultado una corriente interna de Na^+ , el dominio C-terminal intracelular de la subunidad $\beta 4$ se ha identificado como responsable del bloqueo del canal abierto. Además de modular los parámetros de activación de canales, las subunidades β también pueden funcionar como moléculas de adhesión celular, interactuando con la matriz extracelular y las proteínas del citoesqueleto (Barker *et al.*, 2017; Catterall, 2014; Denac, Mevissen, & Scholtysik, 2000).

Las propiedades biofísicas de los canales de Na⁺, es decir, la manera en que los canales iónicos se abren e inactivan, varían entre las diferentes isoformas, jugando así un papel central en la excitabilidad eléctrica de la mayoría de las células especializadas como las neuronas; Las diversas isoformas del canal de sodio están codificadas por 10 genes, que se expresan en diferentes tejidos excitables, NaV1.1, 1.2, 1.3 y 1.6 son los principales canales de sodio que se expresan en el sistema nervioso central; NaV1.7, 1.8 y 1.9 son los principales canales de sodio en el sistema nervioso periférico. NaV1.4 se expresa altamente en el músculo esquelético adulto, desempeñando un papel fundamental en el control de la excitabilidad muscular y, por lo tanto, de la contracción muscular. Por otro lado, NaV1.5 es la isoforma predominantemente expresada en el tejido cardíaco. Respecto a la isoforma Na_x, presenta una estructura diferente de los otros miembros de la familia, ésta se cree está involucrada en la detección del nivel de sodio en el cerebro. Por otro lado, cabe señalar que a pesar de que los canales de sodio se expresan en ciertas células, la mayoría de ellos, también tienen niveles de expresión significativos fuera de sus tejidos primarios (Barker *et al.*, 2017; Catterall, 2014).

3.6.1.4 OTROS CANALES ACTIVADOS POR VOLTAJE: CANALES DE CLORO

Los canales de cloruro están involucrados en procesos que incluyen la regulación de la excitabilidad de las neuronas, el músculo esquelético, cardíaco y liso, regulación del volumen celular, transporte de sal transepitelial, acidificación de los compartimentos internos y extracelulares, ciclo celular y apoptosis; Están presentes en las membranas plasmáticas y los orgánulos intracelulares, estructuralmente tienen aproximadamente 700–1000 Da y consisten en 10-12 segmentos transmembrana. Respecto a la variedad de canales de Cl⁻ activados por voltaje, se han identificado dos tipos, la familia de genes CIC que consta de 9 miembros y regulador de conductancia transmembrana de fibrosis quística (CFTR). Dado que conducen iones de Cl⁻, que tienen un potencial de equilibrio negativo (aproximadamente -70 mV), la apertura del canal de Cl causa hiperpolarización del potencial de membrana, simultáneamente el flujo de los iones de Cl⁻ es mediado por

proteínas CIC (pertenecientes a la familia CIC), así también como intercambiadores de Cl⁻/Protón, dicho flujo que se lleva a cabo en la membrana plasmática de ciertas células, incluidas: neuronas, células epiteliales y células del músculo esquelético en mamíferos. La familia CIC en mamíferos consta de los siguientes miembros: CIC-1, CIC-2, hCIC-Ka (rCIC-K1), hCIC-Kb (rCIC-K2), CIC-3-CIC-5, CIC-6 y CIC-7; Dentro del sistema nervioso central, el tipo CIC-2 se expresa en neuronas, y la apertura de estos canales después de un evento de despolarización permitiría la repolarización de la neurona y, potencialmente, la terminación de altas tasas de disparo; CIC-1 en los músculos esqueléticos, es principal canal iónico que estabiliza el potencial de membrana; hCIC-Ka y hCIC-Kb son específicos del riñón y del oído interno, probablemente involucrados en el transporte transepitelial de cloruro (Barker *et al.*, 2017; Suppiramaniam *et al.*, 2018; British Journal of Pharmacology [BJP], 2009).

3.6.2.- CANALES IÓNICOS Y EL CÁNCER

Previamente se describió la estructura y función de los canales iónicos dependientes de voltaje en procesos fisiológicos clave en células excitables especializadas (neuronas, miocitos cardíacos), debido a su importancia, se han realizado estudios para conocer su participación en el desarrollo de la fisiopatología de diversas enfermedades (epilepsia, migraña, ataxia, esclerosis múltiple, diabetes), destacando así su implicación en el desarrollo del cáncer, para el cual se conoce que los canales iónicos se expresan funcionalmente en diferentes tipos de células cancerosas, regulando mediante ciertos mecanismos el comportamiento fisiopatológico que contribuye a la progresión del mismo (proliferación celular, apoptosis, migración, invasividad) (Barker *et al.*, 2017; Kale, Amin, & Pandey., 2015; Lastraioli, Iorio, & Arcangeli., 2015).

A continuación, se expondrán algunos de los canales iónicos que ha sido reportados como participantes en el desarrollo de ciertos tipos de cáncer.

3.6.2.1.- CANALES DE CALCIO

Los iones Ca^{2+} , se establecen como mensajeros secundarios en diversas señales celulares, incluidas, muerte y proliferación celular. Su importancia radica, en que la privación de iones de Ca^{2+} extracelular conduce a la detención del crecimiento celular en fase G1/S, para ello, la concentración intracitoplasmática de Ca^{2+} está regulada de forma estricta por ciertos mecanismos, uno de ellos, es producido a través de la unión del Ca^{2+} a calmodulina, durante este proceso, el calcio intracelular se une a la calmodulina (CaM) II que, a su vez, activa las proteínas quinasas dependientes de calcio-modulina y regula las proteínas transcripcionales pro-supervivencia como el elemento de respuesta a AMPc, c-fos, c-jun y el elemento de respuesta en suero; Asimismo, los cambios de Ca^{2+} intracelular producen efectos de acuerdo a su duración, cantidad y ubicación, como ejemplo, en el retículo endoplasmático, la concentración de Ca^{2+} determina el destino de las células, dado a que el aumento sostenido de la concentración de Ca^{2+} en el retículo endoplasmático estimula la proliferación celular, por el contrario, la disminución de este, ralentiza la proliferación celular; Por otro lado, la disminución de la concentración de Ca^{2+} en el retículo endoplasmático, acompañado de la liberación de Ca^{2+} en el citoplasma, puede inducir muerte celular del tipo apoptótica (Kale, Amin, & Pandey., 2015).

Anteriormente se describieron los tipos de canales de calcio dependientes de voltaje (T, L, P, N y R), dentro de ellos, se ha establecido que los tipos T y L desempeñan un papel fundamental en diversos tipos de cánceres. Los canales de tipo T desempeñan un papel significativo en la proliferación y migración/invasión de diversas células cancerosas, ya que su expresión aumenta durante la fase G2/M durante el ciclo celular, dentro de este tipo, se han detectado los canales $\text{Ca}_v3.1$ en cáncer de mama y próstata, $\text{Ca}_v3.2$ en cáncer próstata, $\text{Ca}_v2.3$ en nefroblastoma y $\text{Ca}_v3.X$ en células de cáncer de mama (MCF-7) y de próstata (LNCaP), sin embargo, existen genes que codifican a canales de Ca^{2+} activados por voltaje que están regulados positivamente en cáncer de mama como lo es CACNA2D3. Sin embargo, están reducidos en algunos cánceres de mama metastásicos, respecto a su

funcionamiento, no ha sido establecido, no obstante, uno de los posibles mecanismos se basa en la promoción de un remodelado de la homeostasis de iones de Ca^{2+} , a través de una regulación positiva compensatoria de otros transportadores de calcio, lo que resultaría en una mayor capacidad de migración o invasión y/o una sensibilidad alterada a los estímulos apoptóticos; Por otro lado, la sobreexpresión de los canales de Ca^{2+} tipo L presenta un aumento en la fase G0/G1, y se han informado en muy pocos cánceres como el adenocarcinoma de pulmón. Adicionalmente, se han informado otros tipos de canales de Ca^{2+} , incluidos los canales de Ca^{2+} operados por almacenamiento (SOC) en células de cáncer de mama, de igual manera, diversos canales iónicos de potencial receptor transitorio (TRPC), han sido detectados en gliomas, células de cáncer de próstata y con sobreexpresión en células de cáncer de mama, ejemplo de estos, se encuentran TRPM7, el cual es una característica de cáncer de mama de alto grado y altamente proliferativo, junto con TRPV6 regulado positivamente. Otros canales como TRPM8 y TRPV6 se expresan en cánceres de próstata, correlacionándose con alto potencial metastásico (Brackenbury., 2016; Kale, Amin, & Pandey., 2015; Lastraioli, Iorio, & Arcangeli., 2015).

3.6.2.2.- CANALES DE POTASIO

Dentro de los tipos de canales de K^+ que han sido identificados en diversos tipos de cáncer, se encuentran los activados por voltaje, los cuales presentan una expresión regulada de manera positiva en este tipo de células, asimismo, a través de dicha expresión, se ha demostrado que están involucrados en el crecimiento de las células cancerosas, confiriendo a estas, insensibilidad a las señales anti-crecimiento, evasión de la apoptosis, angiogénesis y metástasis, ejemplo de ello, son las siguientes isoformas: $\text{K}_v11.1$ en cáncer de Colon, esófago y leucemia mieloide, $\text{K}_v1.3$ en cáncer de Mama, próstata y linfoma, $\text{K}_v10.1$ en cáncer de Colon y gástrico; Adicional a lo anterior la expresión de $\text{K}_v11.1$ está involucrada con un mayor riesgo de recaída del cáncer y una menor supervivencia general de los pacientes con cáncer. Por otro lado, en cáncer de próstata, $\text{K}_v1.3$ se expresa prematuramente en

la progresión del tumor, esta isoforma también ha sido detectada en muestras de carcinoma de colon junto con las siguientes: Kv1.3, Kv1.5, Kv3.1 y Kv10.1 (Brackenbury., 2016; Kale, Amin, & Pandey., 2015).

Respecto a su función, en las células MCF-7 de cáncer de mama, se detectó que la hiperpolarización de los canales de K⁺ promueve la transición de la fase G1 a la S en el ciclo celular, lo cual se corroboró mediante el uso de bloqueadores específicos de los canales de K⁺, uno de ellos es quinidina, el cual produce el detenimiento del ciclo celular en la fase G0/G1 en estas células. Por otro lado, los canales Kv10.1 son necesarios para que las células cancerosas entren en la fase G1, no obstante, los canales de K⁺ también están involucrados en la regulación del volumen celular y la señalización del calcio durante la progresión de las células a través del ciclo celular. También se han detectado otras clases de canales de K⁺ en células cancerosas, los cuales incluyen Kir3.1 en tumores de mama, K_{2P}9.1 en tumores de colon y mama, participando en la promoción de la resistencia a la hipoxia, K_{Ca}1.1 en células de cáncer de próstata y mama. Otro aspecto para destacar es el patrón de expresión de los canales de K⁺, ya que presentan una variación respecto a su expresión en tejidos normales y tejidos tumorales, en condiciones normales, Kv10.1 se encuentra ausente en distintos tejidos del sistema nervioso central. Sin embargo, se ha demostrado que Kv10.1 presenta sobreexpresión en ciertas células cancerosas, en éstas se incluyen células de cáncer de mama, neuroblastoma, carcinoma cervical, melanoma, sarcoma de tejido blando y cuello uterino; Respecto a Kv10.1 y Kv11.1 presentan sobreexpresión en glioma, Kv11.1 en cáncer de endometrio, colorrectal y leucemia linfocítica crónica, Kv7.1 en tumores pulmonares, promoviendo la formación del tumor y confiriendo resistencia a hipoxia, por último Kv1.3 en biopsias de tumores de mama se ha detectado, en comparación con células no cancerosas del mismo tejido (Brackenbury., 2016; Kale, Amin, & Pandey., 2015; Lastraioli, Iorio, & Arcangeli., 2015).

3.6.2.3.- CANALES DE SODIO

Respecto a los canales de Na⁺ activados por voltaje, se han llevado a cabo diversos estudios, donde se ha establecido que estos, presentan una expresión anómala en una amplia variedad de células cancerosas, dentro de ellas, se encuentran las siguientes: cáncer de pulmón de células pequeñas, próstata, melanoma, de mama, neuroblastoma, mesotelioma, pulmón de células no pequeñas, cervical, de ovario, colon, glioma, linfoma y células de leucemia; La expresión de los canales de Na⁺, se asocian con un aumento de la motilidad celular o invasividad, por lo tanto, incrementa el riesgo de desarrollo de metástasis, no obstante, a pesar de que presentan una expresión anómala, los estudios comparativos mostraron que no se expresan, o solo a un nivel bajo en las células no cancerosas correspondientes, esto se sugiere por los siguientes aspectos: a) las investigaciones electrofisiológicas en las células normales correspondientes no pudieron detectar las corrientes internas de sodio, aunque la proteína estaba presente, b) la comparación de tinciones inmunohistoquímicas en tejidos correspondientes tumorales y no tumorales ha mostrado que los canales de Na⁺ activados por voltaje, se expresaron en tumores, no en las biopsias epiteliales normales (Besson *et al.*, 2017).

En cuanto a las isoformas de los canales de Na⁺ activados por voltaje, que son expresadas en las diversas células cancerosas, se encuentra Nav1.5, isoforma cardíaca detectada en células de linfoma, cáncer de mama, colon y neuroblastoma; Por otro lado, la isoforma Nav1.7, predomina en las células de cáncer de próstata; Adicional a lo anterior, se han detectado subunidades β de canales de Na⁺ activados por voltaje en cánceres de mama, próstata, pulmón no microcítico y cuello uterino, que de igual manera con la subunidad α su expresión varía respecto al tipo de célula cancerosa, dentro de las subunidades β, la más abundante en células canceras de mama, próstata y cuello uterino es la β1 (Besson *et al.*, 2017; Brackenbury., 2016; Ou *et al.*, 2005).

La participación de los canales de Na⁺ activados por voltaje, en la progresión de la metástasis, está ligada a la capacidad que tienen para inducir la acidificación del medio ambiente perimembranoso extracelular, creando un entorno localmente

favorable para la actividad de las catepsinas ácidas que degradan la matriz extracelular, este proceso inducido por las células cancerosas representa un paso esencial en la progresión metastásica y se lleva a cabo mediante estructuras de células cancerosas llamadas invadopodios, que son orgánulos ricos en actina, que sobresalen en la matriz extracelular y son responsables de su proteólisis a través del reclutamiento de proteasas solubles asociadas a la membrana y liberadas extracelularmente, esto ha sido evidenciado en células de cáncer de mama humano MDA-MB-23, donde la actividad de NaV1.5 mejora la degradación de la matriz extracelular al aumentar la actividad de las catepsinas a través de la acidificación del microambiente pericelular (Besson *et al.*, 2017; Brisson *et al.*, 2013).

3.6.2.4.- CANALES DE CLORO

Se ha demostrado en algunos tipos de células cancerosas la presencia de canales de Cl⁻ activados por voltaje, dentro de estas, se incluyen células de glioma, las cuales expresan los isotipos CIC-2, CIC-3 y CI-5, involucrados en la regulación del volumen celular, esto se evidencio ya que la contracción de las células glioma puede ser inhibida mediante bloqueadores de canales de Cl⁻ produciendo que las células no puedan invadir, esta capacidad de migración por parte de las células de glioma se debe a que estas pueden ajustar su forma y volumen celular para facilitar la invasión en espacios estrechos, para ello se requiere la secreción de iones de Cl⁻, K⁺ o Na⁺, permitiendo así la pérdida de agua y la contracción celular, a su vez se produce un alargamiento pronunciado de las células, consistente con la pérdida de volumen celular; Por otro lado, en células de osteosarcoma, la expresión de CIC-4 presenta regulación positiva después del daño del ADN, promoviendo la supervivencia celular (Brackenbury., 2016; Olsen *et al.*, 2003; Soroceanu, Manning, & Sontheimer., 1999).

3.7.- VENENO DE ALACRÁN Y TOXINAS AISLADAS COMO TRATAMIENTO ANTI-CÁNCER

Anteriormente se enfatizó el uso de veneno de alacrán y sus toxinas asociadas como potencial agente anti-cáncer, derivado de la capacidad que tienen algunos venenos de alacrán para inhibir el crecimiento de varios tipos de líneas celulares cancerosas, sin embargo, solo unas pocas toxinas son responsables de estos efectos anticancerígenos, ejerciendo su acción mediante tres diferentes mecanismos: 1) bloqueo de un canal iónico específico, 2) inhibir la invasión de células de cáncer mediante la unión a un sitio específico (diferente de un canal iónico) en la membrana plasmática, 3) activación de vías intracelulares y/o extracelulares que inducen apoptosis (Desales-Salazar *et al.*, 2020).

3.7.1.- EFECTO DEL VENENO DE ALACRÁN CRUDO EN LÍNEAS CELULARES CANCEROSAS

Gupta *et al.*, (2007) emplearon veneno crudo de la especie *Heterometrus bengalensis* Koch en las líneas celulares U-937 de linfoma histiocítico y K-562 de leucemia mieloide crónica, con un porcentaje de reducción de viabilidad de 36.5% y 27.2% respectivamente en un periodo de 48 horas, dicha actividad se demostró que es producida por la inhibición del crecimiento celular, específicamente se produce arresto del ciclo celular en la fase sub-G1, adicionalmente se identificó que la muerte celular es producida por apoptosis, al observar las siguientes características de dicho tipo de muerte celular: formación de protuberancias en la membrana, condensación de la cromatina y degradación de ADN.

Díaz-García *et al.*, (2013) evaluaron el uso del veneno crudo de la especie *Rhopalurus junceus*, en un periodo de 72 horas de tratamiento con un gradiente de concentración de 0.1-1mg/ml, estos ensayos fueron realizados en las siguientes líneas celulares: MDA-MB-468 (Adenocarcinoma de mama), A549 (Carcinoma pulmonar), MDA-MB-231 (Adenocarcinoma de mama), Hep-2 (Adenocarcinoma de cérvix uterino), NCI-H292 (Carcinoma Pulmonar), HeLa (Adenocarcinoma de cérvix

uterino), HT-29 (Adenocarcinoma colorrectal), SiHa (Adenocarcinoma de cérvix uterino), U-937 (Linfoma histiocítico) y K-562 (Leucemia mieloide crónica), obteniendo 64.5%, 61.5%, 47.5%, 47.5%, 41.5%, 40%, 35.5%, 31.5%, 20%, 15.5% de reducción de viabilidad respectivamente, haciendo uso de la concentración máxima del tratamiento (1mg/ml). Por otro lado, respecto al tipo de muerte celular, se determinó que en la línea celular HeLa, fue producida por apoptosis intrínseca, a través de la sobreexpresión de p53 y Bax, p53 induce la activación de p21, un potente inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina (CDK1) que produce la detención de la fase G2/M del ciclo celular, por otro lado Bax, promueve la liberación de citocromo C y posteriormente se ejecuta la activación de caspasa 9, que escinde a la procaspasa-3 río abajo, dando como resultado la activación de caspasa-3, que culmina con la muerte de la célula; Asimismo se detectó condensación de la cromatina. Por otro lado, en la línea celular A549, se detectó muerte celular por necrosis, mediante la regulación negativa de p53 y Bax (Desales-Salazar *et al.*, 2020). Con la misma especie Hernández *et al.*, (2009) evaluaron el efecto del veneno crudo en las líneas celulares P3-X63/AG8/653 de mieloma de ratón y Dunning R3327-G de adenocarcinoma de próstata de rata durante 72 horas, obteniendo 72.3% (concentración de veneno empleada de 1 µg/ml) y 45.7 % (concentración de veneno empleada de 100 µg/ml) de reducción de viabilidad respectivamente.

Zargan *et al.*, (2011) realizaron la aplicación de veneno crudo de la especie *Androctonus crassicauda* en las líneas celulares SH-SY5Y de neuroblastoma humano y MCF-7 de adenocarcinoma de mama, con una concentración de 200 µg/ml, obtuvieron 46% y 43.2% de reducción de viabilidad respectivamente al finalizar 24 horas de tratamiento. El tipo de muerte detectado en ambas líneas celulares fue del tipo apoptótico, con las siguientes características: fragmentación de ADN, ruptura de la membrana plasmática, liberación de contenido citosólico y activación de Caspasa 3. Adicional a lo anterior, tras la aplicación del tratamiento, se observó un incremento de óxido nítrico, el cual ha demostrado que desencadena apoptosis a través de la transición de la permeabilidad mitocondrial que conduce a la liberación de factores proapoptóticos que inducen las características distintivas

de apoptosis previamente mencionadas, mostrando así en la línea celular SH-SY5Y de neuroblastoma humano, un incremento del nivel de óxido nítrico de 5.73 $\mu\text{M}/\text{ml}$ (control) a 38.56 $\mu\text{M}/\text{ml}$, por el contrario en la línea celular MCF-7 de adenocarcinoma de mama el nivel se incrementó de 2.34 $\mu\text{M}/\text{ml}$ a 4.51 $\mu\text{M}/\text{ml}$, en ambas líneas celulares dicho incremento se observó al aplicar 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de veneno crudo; Respecto a la inhibición del crecimiento celular, se detectó que el tratamiento produce arresto celular en la fase S del ciclo celular. Por su parte Al-Asmari, Islam, & Al-Zahrani., (2016), con la misma especie, observaron reducción respecto a la formación de colonias en las siguientes líneas celulares: HCT-8 de adenocarcinoma colorrectal ileocecal, MDA-MB-231 de adenocarcinoma de mama y HCT-116 de carcinoma colorrectal, obteniendo así 78%, 55%, 52% de reducción de formación de colonias respectivamente, con una concentración de veneno crudo de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, en un periodo de tratamiento de 24 horas; Asimismo, se detectó reducción de la motilidad tras la aplicación del tratamiento, con una concentración de veneno de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, en la línea celular HCT-8 se observó una reducción del 100%, en células HCT-116 80% y en células MDA-MB-231 72%; Por otro lado, en este mismo estudio, fue evaluado el efecto del veneno crudo de las especies *Androctonus bicolor* y *Leiurus quinquestriatus* en la línea celular MDA-MB-231 de adenocarcinoma de mama, con una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de veneno crudo, el porcentaje de formación de colonias fue reducido a 65% y 63% respectivamente, adicional a lo anterior, se evidencio reducción de motilidad del 57.5% con el veneno de *Leiurus quinquestriatus* y 37% con *Androctonus bicolor*.

Mediante estudios realizados por Akef, Kotb, Abo-Elmatty, & Salem., (2017), fue evaluado el veneno crudo de la especie *Androctonus amoreuxi* en la línea celular PC-3 de adenocarcinoma de próstata, con una dosis de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de tratamiento, en 24 horas, se obtuvo un 93% de reducción de viabilidad, el tipo de muerte inducido, fue por apoptosis intrínseca, mediante la regulación negativa de Bcl-2, que promueve la liberación de factores proapoptoticos como citocromo C, que a su vez produce la activación de Caspasa 3 finalizando con la muerte de la célula.

Wang, Fu, Lu, & Cai., (2011) en la línea celular HeLa de adenocarcinoma cérvix uterino, evaluaron el efecto del veneno de la especie *Buthus martensii Karsch*, obteniendo en 48 horas de tratamiento 50% de inhibición del crecimiento con una concentración de 80 µg/ml de veneno crudo, respecto al tipo de muerte inducido, se detectaron dos tipos, necrosis y apoptosis a través de la regulación positiva de p21; De igual manera, con la misma especie, Li *et al.*, (2011), analizaron el efecto del veneno crudo en las líneas celulares SMMC-7721 de carcinoma hepatocelular y MCF-7 de adenocarcinoma de mama, en 24 horas con una dosis de 800 µg/ml de veneno crudo, se produjo 35% y 45% de reducción de viabilidad respectivamente, en células MCF-7, el tipo de muerte detectada fue por apoptosis, mediante la expresión de Caspasa 3, adicionalmente, se demostró que tras la aplicación del tratamiento, se induce detenimiento del ciclo celular en la fase G1 y S, inducido por la regulación negativa de Ciclina D1, la cual controla la progresión del ciclo celular mediante la unión a quinasas dependientes de ciclina (CDK), específicamente CDK4 y CDK6, a su vez, este complejo fosforila la proteína retinoblastoma (RBP), lo que lleva a la liberación de factores de transcripción E2F, a su vez induciendo la transcripción de ciclina A y ciclina E, necesaria para la transición a la fase G1/S del ciclo celular (Hirayama *et al.*, 2020).

3.7.2.- EFECTO DE TOXINAS AISLADAS A PARTIR DE VENENO DE ALACRÁN EN LÍNEAS CELULARES CANCEROSAS

Guo *et al.*, (2013) a partir del veneno de alacrán de la especie *Tityus serrulatus* obtuvieron 4 péptidos denominados TsAp1, TsAp2, TsAP-S1 y TsAp-S2, los cuales fueron evaluados en cinco líneas celulares cancerosas durante 24 horas de tratamiento; En la línea celular NCI-H157 de carcinoma de células escamosas de pulmón, la reducción de viabilidad producida fue la siguiente: TsAP-S1 98.5%(Concentración inhibidora media máxima [IC50]: 1.5µM), TsAP-S2 94.5%(IC50: 8.2µM) TsAP-2 80%(IC50: 4.1Mm) y 55.5% TsAP-1 (IC50: 5.9µM); De igual manera, en la línea celular NCI-H838 de adenocarcinoma de pulmón, la reducción de viabilidad obtenida fue: TsAP-S1 98.5% (IC50: 1.5Mm), TsAp-S2 98.5% (IC50:

1.6 μ M), TsAP-2 97% (IC50: 1.1 μ M) y TsAP-1 58.5%(IC50: 5.2 μ M); En células MCF-7 de adenocarcinoma de mama los porcentajes de reducción de viabilidad obtenidos fueron: TsAP-S1 89.5% (IC50: 1.3 μ M), Ts-AP-S2 89.5% (IC50: 1.8 μ M) y TsAP-2 85.5% (IC50: 6.3 μ M). Por otro lado, en la línea celular PC-3 de adenocarcinoma de próstata, tras la aplicación del tratamiento, la reducción de viabilidad (observada) fue: TsAP-S1 91.5% (IC50: 2.07 μ M), TsAP-S2 91.5% (IC50: 1.6 μ M), TsAP-2 90.5% (IC50:1.4Mm); Finalmente, en la línea celular U-251 de glioblastoma, los péptidos evaluados, produjeron los siguientes porcentajes de reducción de viabilidad: TsAP-S1 97.5% (IC50: 2.8Mm), TsAP-S2 97.5% (IC50: 2.04 μ M) y TsAP-2 96.5% (IC50 1.5Mm).

Almaaytah *et al.*, (2013), identificaron y caracterizaron el péptido denominado como Mauriporin a partir del veneno de la especie *Androctonus mauritanicus*; Mauriporin pertenece al grupo de péptidos sin puentes de disulfuro, y fue evaluado en las líneas celulares PC-3 de adenocarcinoma de próstata, LNCaP de carcinoma de próstata y DU 145 de carcinoma de próstata, en un periodo de 24 horas, obtuvieron con una concentración de 50 μ M 81.5% de reducción de viabilidad en las tres líneas celulares, cabe mencionar que el IC50 para cada línea celular fue 6.9 μ M, 4.8 μ M y 6.3 μ M respectivamente. El tipo de muerte celular producido en la línea celular PC-3, se sugiere fue por necrosis, al no demostrar características distintivas de muerte celular apoptótica, a pesar de realizar ensayos de fragmentación de AND y actividad de caspasas. Por otro lado también se evaluó la actividad de Mauriporin, en las líneas celulares no cancerosas Vero y HUVEC, donde se evidencio que tiene la capacidad de inhibir la proliferación de ambas líneas celulares, con un IC50 de 59.7 μ M y 62.5 μ M respectivamente; De acuerdo con los valores IC50 producidos por Mauriporin frente a líneas celulares no cancerosas, se demuestra que tiene selectividad aparente frente a las líneas celulares de cáncer de próstata, debido que los valores IC50 en células no cancerosas son aproximadamente nueve veces mayor en comparación con los valores obtenidos en las líneas celulares cancerosas.

Arpornsuwan *et al.*, (2014), evaluaron el péptido BmKn-2, asilado a partir del veneno de la especie *Buthus martensii Karsch*, en las líneas celulares HSC-4 de carcinoma

escamoso oral y SW620 de adenocarcinoma colorrectal, obteniendo en 24 horas inhibición del crecimiento en ambas líneas celulares, con valores IC₅₀ de 2.5µM y 40µM, asimismo sugiriendo que BmKn-2 presenta selectividad sobre células HSC-4; De igual manera Tong-ngam *et al.*, (2015), analizaron la actividad anticáncer de BmKn-2 y 8 péptidos derivados del mismo (BmKn-21, BmKn-22, BmKn-23, BmKn-24, BmKn-25, BmKn-26, BmKn-2CC, and cyclic BmKn-2), en la línea celular HSC-4, destacando la actividad de los péptidos BmKn-2 y BmKn-22, los cuales indujeron en 24 horas una reducción de viabilidad de 95% y 50% respectivamente, con una concentración de 100µg/ml, adicional a lo anterior, se determinó que el tipo de muerte celular inducido por BmKn-2 fue por apoptosis, evidenciado por la expresión de caspasa-9, caspasa-7, caspasa-3, así también como la regulación negativa de Bcl-2. Por otro lado, Gu *et al.*, (2012) investigaron el efecto del péptido rAGAP (péptido analgésico-antitumoral recombinante), diseñado a partir del péptido AGAP del veneno de la especie *Buthus martensii Karsch*, en las células SW-480 de adenocarcinoma colorrectal, obteniendo con una concentración de 80µM en 24 horas de tratamiento, 78.8% de reducción de viabilidad, también se determinó que el tipo de muerte fue por apoptosis, al observar condensación de la cromatina, núcleos encogidos y fragmentados, asociado a la expresión negativa de Bcl-2, y a su vez la expresión positiva de Bax (factor pro-apoptótico), respecto al efecto de rAGAP en el ciclo celular, se determinó que induce arresto celular en la fase G₀/G₁ mediante la expresión de la proteína p27, que tiene la capacidad de inhibir el complejo CDK2/Ciclina A necesario para llevar a cabo la transición de la fase G₀/G₁, aunado a ello se detectó que rAGAP induce regulación negativa de PI3K y Akt, involucrados en la vía PTEN/PI3K/Akt, en la cual PI3K tiene la capacidad de inducir la transición G₁/S del ciclo celular y Akt suprime la apoptosis al inhibir la activación de Bax (Abbastabar *et al.*, 2018).

Mediante terapia genica Fu *et al.*, (2014), evaluarón el gen BMK CT (inserto en el plásmido pEGFP-N1-BmK CT) asilado a partir de la especie *Buthus martensii Karsch*, el cual es un péptido bloqueador de los canales de cloro y de la metaloproteínasa 2 (MMP-2) en células de glioma. Las MMP-2 pertenecen a una familia de endopeptidasas que tienen la capacidad de degradar los componentes

de la matriz extracelular (proteoglicanos, glucosaminoglicanos, proteínas estructurales [colágeno y elastina], y proteínas de adhesión [fibronectina y laminina]) durante la invasión del tejido normal por cáncer, el mecanismo de activación de MMP-2 está modulado por diversas proteínas las cuales constituyen un complejo macromolecular, dentro de las cuales se incluyen MT1-MMP y avb3, proteínas que se encuentran equilibradas estequiométricamente con la finalidad de facilitar la migración e invasión de las células tumorales, asociado a la liberación de factores de crecimiento que incluyen el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (β FGF) y factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), así también como receptores de superficie y moléculas de adhesión (Cohen-Inbar & Zaaroor., 2016; González-Avila, González, Delgado, & Gutiérrez-González., 2009; Flores-Reséndiz, Castellanos-Juárez, & Benítez-Bribiesca., 2009; Cascales, & Álvarez-Gómez., 2010). Adicional a lo anterior, se complementó la terapia con LiCl, el cual se ha demostrado tiene la capacidad de inhibir la migración e invasión de células de glioma, a través de la inhibición de GSK-3, una proteína quinasa de serina-treonina multifuncional que regula diversos procesos, incluidos: metabolismo, especificación del destino celular, división celular y muerte celular (Nowicki *et al.*, 2008). Respecto a la aplicación del tratamiento, se llevó a cabo la transfección del plásmido pEGFP-N1-BmK CT y pEGFP-N1 (Grupo control), en células C6 de glioblastoma de rata, en 24 horas de tratamiento complementado con 50mM de LiCl, se obtuvo 15% y 10.6% de inhibición del crecimiento respectivamente. En cuanto a la reducción de la migración, se evidencio en un ensayo dosis-dependiente de LiCl de 0-50mM, complementado con los tratamientos con pEGFP-N1-BmK CT y pEGFP-N1 (Grupo control) en 24 horas, que el porcentaje de migración fue reducido 1.8% con 50Mm de LiCl, en comparación con el grupo con 0Mm de LiCl, fue 11.8%, en el grupo adicionado con pEGFP-N1-BmK CT. Sin embargo, al observar los resultados del grupo control, se encontro que el grupo con 0mM de LiCl redujo la migración en un 14.3%, en comparación con el grupo con 50Mm de LiCl, se obtuvo un 3.7% de reducción de la migración; Finalmente, se demostro que el tratamiento con pEGFP-N1-BmK CT y una concentración de 50 Mm de LiCl suprime la actividad de MMP-2.

Por su parte Song *et al.*, (2012) investigaron el efecto de la fracción SVC III, aislada a partir del veneno de la especie *Buthus martensii Karsch*, en las líneas celulares THP-1 de leucemia monocítica aguda y Jurkat de leucemia aguda de células T, obteniendo en un periodo de 48 horas con una concentración de 50µg/ml de SVC III, 66.6% y 58.70% de reducción de viabilidad respectivamente; Adicional a lo anterior, se determinó que SVC II induce arresto celular en la fase G1 en ambas líneas celulares, a través de la regulación negativa de Ciclina D1, asociado a la inhibición del factor de transcripción pleiotrópico NF-κB, involucrado en el proceso de oncogénesis regulando positivamente los genes implicados en la proliferación celular, metástasis, angiogénesis y supresión de la apoptosis; En células cancerosas, la cascada de señalización de NF-κB también contribuye al proceso de angiogénesis a través de la modulación del factor proangiogénico conocido como factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), la producción de VEGF inducida por NF-κB es capaz de expresar la molécula de adhesión celular vascular 1 (VCAM-1), la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) y E-selectina que en combinación con otros reguladores como las enzimas proteolíticas, que incluyen MMP (específicamente MMP-9 y MMP-2) cooperan en el proceso de transición epitelial a mesenquimal (EMT) para la progresión de la metástasis tumoral (Rasmi, Sakthivel, & Guruvayoorappan., 2020).

Por otro lado, mediante estudios realizados por Ma *et al.*, (2013), se evaluó el efecto del péptido BmKKx2, miembro de la subfamilia Y-K⁺ de inhibidores de canales de K⁺, el cual fue obtenido a partir del veneno de la especie *Buthus martensii Karsch*, es importante señalar, que estructuralmente BmKKx2 es semejante a la toxina BeKm-1, un bloqueador selectivo de canales de sodio del tipo hERG; BmKKx2 fue evaluado en la línea celular K-562 de leucemia mieloide crónica humana, en 48 horas de tratamiento con una concentración de 200nM, se obtuvo 17% de reducción de viabilidad al compararlo con el grupo control. También se determinó que BmKKx2 tiene la capacidad de inducir arresto celular en la fase G1. Adicionalmente se llevó a cabo la transfección transitoria del gen shh-hERG que expresa los canales de K⁺ de tipo hERG, en células HEK-293 (riñón embrionario). Con una concentración de 10mM de BmKKx2 se bloqueó aproximadamente 60% de las corrientes de entrada

de los canales hERG expresados transitoriamente en células HEK-293. Sin embargo, al evaluar la actividad de BmKKx2 sobre los canales hERG expresados de manera natural en línea celular K-562, se demostró, que aproximadamente el 50% de las corrientes se bloquearon en presencia de 1 μ M de BmKKx (Zeng, Luo, & Li., 2006).

3.8.- **CENTRUROIDES LIMPUDUS Y EL PÉPTIDO CII-6**

En México existen registradas 289 especies de alacranes, sin embargo, solo la familia *Buthidae* es considerada de importancia para la salud pública, debido a que la intoxicación por picadura, mordedura, contacto con pelos urticantes, uñas o cualquier otro medio, requiere de atención médica ya que es capaz de producir muerte; La familia *Buthidae* en México está representada por dos géneros: *Centruroides* y *Chaneke*, de estos dos géneros, *Chaneke* está representado por cuatro especies, no obstante, estas no han sido evaluadas respecto a la toxicidad que pueden producir, por lo tanto no son consideradas de importancia médica; Por otro lado *Centruroides* tiene 44 especies de las cuales 19 son de importancia médica, dado a que se ha demostrado que poseen péptidos neurotóxicos que pueden producir un resultado letal para los mamíferos, incluyendo humanos (González-Santillán, & Possani., 2018; Ponce-Saavedra *et al.*, 2016).

Dentro de estas especies, se destaca *Centruroides limpidus* (**Figura 9**), especie que se distribuye en los estados de Colima, México, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Morelos, Oaxaca, Puebla y Querétaro; Debido a su importancia médica, su veneno y los componentes asociados ya han sido estudiados. A partir del veneno crudo se obtuvieron cuatro fracciones. La fracción I, la de mayor peso molecular, está constituida por hialuronidasa, una enzima que abre paso en el tejido conectivo durante el alacranismo. El mayor porcentaje de toxicidad se localiza en la fracción II, donde se agrupan toxinas proteicas básicas de 60-85 aminoácidos con puentes de disulfuro, que actúan al bloquear los canales de Ca²⁺, K⁺ y Na⁺. Cabe señalar que las fracciones I, III y IV no fueron tóxicas en las cantidades empleadas en pruebas de letalidad (Rosas-Aguilar, 2016).



Figura 9. *Centruroides limpidus*.

Fuente: Tomado de Bourée et al., (2005).

A su vez, la fracción II cuenta con otras subfracciones que se caracterizan por ser modificadoras de los canales de Na⁺, las cuales son: CII-3, CII-4, CII-5c, CII-5C*, CII-2b, CII-5b, CII-6, CII-7, CII-8, CII-9, adicional a ellas, a partir de ARN 16S, se aislaron las subfracciones CII-QU1, CII-HU1, CII-TZ1, CII-TO1, CII-AR1, CII-CH1, CII-CH2 (Rosas-Aguilar, 2016).

Una de las subfracciones de interés es CII-6, la cual es una β -toxina neurotóxica de 85 aminoácidos con un peso molecular de 9.323 daltons, perteneciente a la superfamilia de toxinas de alacrán de cadena larga, que tiene la capacidad de inhibir los canales iónicos de Na⁺ activados por voltaje (NaV). CII-6 se une, independientemente del voltaje, en el bucle creado entre el Segmento S3 y S4 del dominio II (DII S3-S4) del canal de Na⁺, produciendo un desplazamiento de la curva de activación del canal de sodio en la dirección de hiperpolarización (potencial de acción más negativo), afectando así la activación del canal de Na⁺ (inducción de inactivación del canal de Na⁺) y promoviendo disparos continuos y repetitivos (Contreras-Ortiz et al., 2016; Barker et al., 2017; Suppiramaniam et al., 2018; NCBI., 2018.).

Estudios previos han demostrado potencial anti-cáncer de toxinas aisladas de veneno de alacrán mostrando la capacidad de inducir muerte celular a través del bloqueo de canales iónicos, tal es el caso de la subfracción CII-6, la cual fue evaluada por Desales-Salazar, (2016) y Rosas-Aguilar, (2016), en las líneas celulares cancerosas HeLa de adenocarcinoma de cérvix uterino y HuH-7 de carcinoma hepatocelular, donde emplearon el plásmido *pDream2.1/MCS/CII-6* **Figura 11** diseñado por Contreras-Ortiz *et al.*, (2016), en el cual se insertó y flanqueo mediante dos sitios para las enzimas de restricción EcoR1 y Kpn1, la secuencia genética de 316 pares de bases de la subfracción CII-6, reportada en la base de datos GenBank con número de acceso AF491132 **Figura 10** (NCBI, 2018). Éste, a su vez fue transfectado en ambas líneas celulares, obteniendo como resultados 17.65% de reducción de viabilidad en la línea celular HeLa en un periodo de 24 horas, mientras que, en la línea celular HuH-7 se observó un 16.54 y 18.39% en 24 y 48 horas respectivamente. En cuanto al tipo de muerte, en ambas líneas celulares, se detectó que fue inducida por apoptosis.

```
GenBank: AF491132.1
GenBank Graphics
>gi|31376359|gb|AF491132.1| Centruroides limpidus limpidus sodium-channel modifier toxin
C116 precursor, mRNA, complete cds
GAAGATGAACTCGTTGTTGATGATTATTGGTTGTTGGTCCTGATCGGAACAGTGTGGACAAAGGAAGGT
TATCTGGTGAACATGAAAACGGGCTGCAAATACGGGTGCATGAATTGGGTGACAACGGTTACTGCGATA
GGAAATGCAAAGCGGAGAGCGGTAACACTACGGCTATTGCTATACTGTTGGGTGCTGGTGCGAAGGATTGCC
CAATAGTAAACCGACTTGGCCCCCTTCCTGGTAAATCATGCAGCGGAAAATAATAGCAACGCTCTTTTATT
GTCCACCAACAGAAATATTGTAACGCTTCTTAATTG
```

Figura 10. Secuencia genética de la toxina modificadora de los canales de Na, CII-6.

Fuente: Tomado de NCBI (2018).

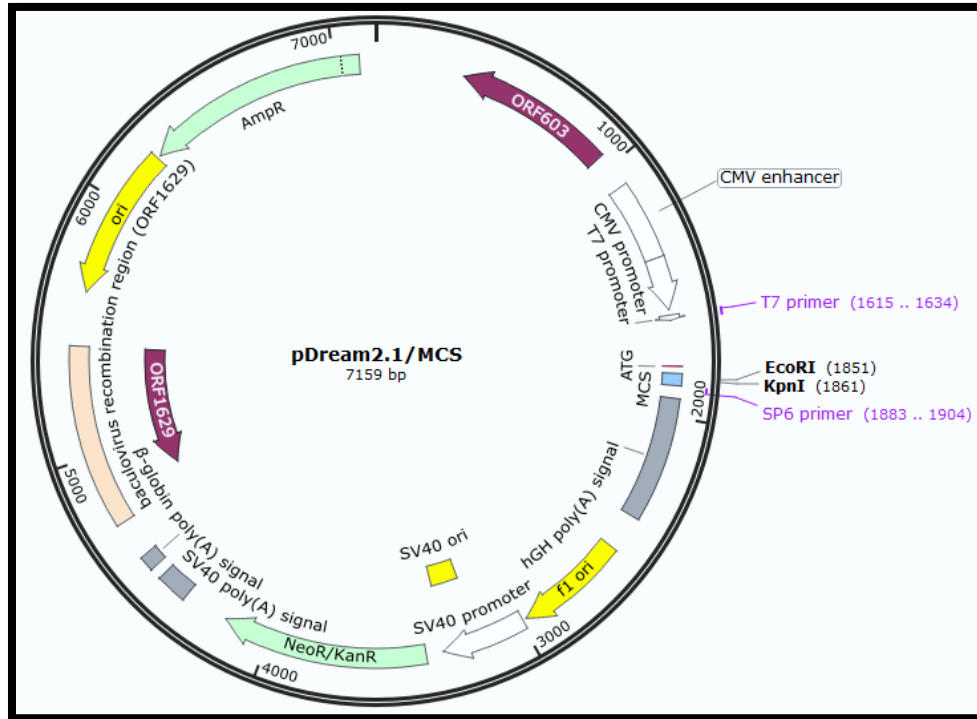


Figura 11. Plásmido pDream2.1/MCS/CII-6.

Fuente: Tomado y modificado de Contreras-Ortiz et al., (2016).

Por otro lado, con respecto a los canales iónicos, Hernández-Plata (2012) menciona que la expresión de los canales de Na⁺ en células cancerosas es fundamental para el desarrollo del fenotipo metastásico, por lo cual al bloquear la actividad de los canales de Na⁺ se puede evitar la adhesión, movilidad, invasividad y formación de colonias de células cancerosas. Como se ha mencionado anteriormente, los canales de Na⁺ presentan sobreexpresión en ciertos tipos de células cancerosas. No obstante, se ha demostrado que en células no cancerosas estos canales no se expresan o lo hacen en un nivel bajo y no se encuentran activos, lo que los convierten en una potencial blanco molecular con selección aparente (Besson *et al.*, 2017). Por lo tanto, de acuerdo con investigaciones previas, se sugiere que la subfracción CII-6 con afinidad a los canales de Na⁺ posee la capacidad de inhibir migración, crecimiento y angiogénesis de algunos tipos de células cancerosas, mostrando así, la importancia de realizar estudios que confirmen dichas

propiedades, principalmente en células cancerosas con sobreexpresión de canales de Na⁺.

4.- JUSTIFICACIÓN

El neuroblastoma es el tumor sólido extracraneal más frecuente durante la infancia y presenta una supervivencia general menor al 40%, en este tipo de cáncer, se ha demostrado que el uso de tratamientos convencionales presenta baja eficiencia e inducen efectos secundarios que afectan la calidad de vida del paciente.

A partir de lo anterior se han desarrollado diversas investigaciones que apoyan el estudio de tratamientos alternativos a base de recursos naturales que puedan actuar sobre algunos tipos de líneas celulares cancerosas. Una de esas alternativas, es el uso de veneno de alacrán crudo y sus fracciones aisladas. Los venenos más estudiados son los de la familia *Buthidae*, caracterizados por su capacidad de inducir muerte celular, arresto del ciclo celular e inhibición de la migración, tal es el caso de las especies *Buthus martensii* Karsch, *Tityus discrepans* y *Centruroides noxius*.

Los efectos del veneno de la especie *Centruroides limpidus* sobre células cancerosas han sido poco estudiados. El gen CII-6 del veneno de este alacrán (GenBank, AF491132) que codifica la subfracción neurotóxica CII-6 con afinidad a los canales de Na⁺ podría ser una alternativa de tratamiento contra células de neuroblastoma, dado que tiene afinidad por los canales de Na⁺ que regularmente están expresados en este tipo de células y resulta interesante determinar si el gen CII-6 es capaz de afectar la viabilidad de células de Neuroblastoma Humano (SH-SY5Y).

5.- OBJETIVOS

5.1.- OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del péptido expresado por el gen CII-6 en la línea celular de Neuroblastoma Humano (SH-SY5Y).

5.2.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Identificar la transcripción de la proteína expresada por el gen CII-6.
- 2.- Determinar el efecto sobre la viabilidad en cultivo de células de Neuroblastoma Humano (SH-SY5Y) después de exponerlas a la proteína CII-6.

6.- HIPÓTESIS

El producto de la expresión del gen CII-6 en las células de Neuroblastoma Humano (SY-SH5Y) reduce la viabilidad e induce muerte celular.

7.- MATERIALES Y MÉTODOS

En esta investigación, se llevó a cabo la evaluación del gen CII-6, el cual se encuentra inserto en el plásmido *pDream2.1/MCS/CII-6*. El plásmido fue transformado en bacterias *E. coli* de la sepa *DH5- α* para llevar a cabo su replicación, de manera simultánea el plásmido obtenido fue purificado y posteriormente transfectado con lípidos catiónicos en la línea celular NIH/3T3 de fibroblastos embrionarios de ratón, células que fungieron como productoras de la subfracción CII-6. Una vez identificada la transcripción del gen CII-6, en las células NIH/3T3 mediante la técnica RT-PCR, se replicó el proceso de transfección con la finalidad de obtener la subfracción CII-6, presente en el medio de cultivo pos-transfección, este denominado como “medio condicionado”, posteriormente fue aplicado como tratamiento en la línea celular SH-SY5Y de neuroblastoma humano y mediante un ensayo de viabilidad con MTT, se determinó el efecto que ejerce la subfracción CII-6 sobre dichas células, en 24, 48 y 72 horas de tratamiento. Por último, como estudio exploratorio, fue aplicado el medio condicionado en la línea celular U-87 de glioblastoma humano, en un tiempo de incubación de 72 horas.

7.1.- PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES

Se emplearon bacterias congeladas *E. coli DH5- α* almacenadas a -80 °C, las cuales fueron inoculadas en medio de crecimiento (sin antibiótico: ampicilina) estéril LB (Luria Bertani, Sigma SLBB9243), posteriormente se incubaron 16 horas a 37 °C con agitación continua (220 RPM). Después del tiempo establecido se tomó 1 ml del crecimiento celular y fue re-cultivado en 10 ml de medio LB estéril líquido, el cual se incubó en agitación por 4 horas a 220 RPM y 37°C, en un tubo Falcon de 50 ml estéril (Axygen Scientific, Cat. # 431621) (Sambrook & Fritsch, 1989).

Posteriormente se prepararon 2 tubos Falcon de 50 ml enfriados en hielo, donde fueron transferidas las bacterias para ser centrifugadas a 3000 RPM por 10 min a 0°C, se decantó el supernatante y durante 1 minuto se dejaron los tubos invertidos para retirar el medio restante del pellet. El pellet obtenido fue re-suspendido con 1

ml de CaCl₂ a 0.1 M (Frío) y fue centrifugado nuevamente por 10 min a 3000 RPM a 0 °C, finalmente las bacterias se re-suspendirón con 1 ml de CaCl₂ a 0.1 M para preparar 10 alícuotas con 100 µl de células bacterianas en viales estériles enfriados previamente, los cuales se etiquetaron como células competentes (Sambrook & Fritsch, 1989).

7.2.- TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES *E. COLI* (DH5-α) POR SHOCK TÉRMICO

En esta etapa se emplearon viales con 100µl de células competentes de *E. coli* (DH5-α), a las que se les adicionó 1.5µl de ADN del plásmido recombinante *pDream2.1/MCS/CII-6* (Concentración de plásmido: 200-220µg/µl), y se incubaron durante 30 min en hielo frappé. Pasado el tiempo de incubación los viales fueron trasferidos a 42°C (Baño Seco) por 45 segundos, finalmente se incubaron 2 minutos en hielo frappé para reducir el daño posible a las células por el cambio de temperatura (Sambrook & Fritsch, 1989); Adicionalmente se llevó a cabo el mismo proceso para el plásmido *pDsRed2-N2*. Para iniciar la replicación de los plásmidos, se prepararon viales con 900µl de LB estéril líquido y se homogenizaron con 100µl de células competentes con *pDream2.1/MCS/CII-6* y *pDsRed2-N2* de manera individual, finalmente los viales se incubaron por 1 hora a 37 °C con agitación continua a 220 RPM.

7.3.- REPLICACIÓN DE BACTERIAS TRANSFORMADAS *E. COLI* (XL-1) PARA LA AMPLIFICACIÓN DE *pDream2.1/MCS/CII-6* y *pDsRed2-N2*

Durante esta fase se usaron placas de LB agar con ampicilina 100mg/ml (Pentrexil Bristol-Myers Squibb) para la selección de bacterias trasformadas con el plásmido *pDream2.1/MCS/CII-6*, y placas de LB agar con kanamicina 50mg/ml (GOLDBIO Cat. #K-120) para la selección de bacterias trasformadas con el plásmido *pDsRed2-N2*, posteriormente se tomaron 10µl del cultivo de bacterias transformadas (*pDream2.1/MCS/CII-6/ pDsRed2-N2*) y fueron inoculadas por método de estría

simple, haciendo uso de un asa bacteriológica esterilizada con fuego. Se dejaron incubar por 16 horas a 37 °C y así observar crecimiento de colonias aisladas (Adaptado de: Sambrook & Fritsch, 1989).

7.4.- EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ADN PLÁSMIDICO

Para esta etapa, se seleccionó una colonia (*E. coli DH5-α*) de una placa selectiva con el plásmido *pDream2.1/MCS/CII-6* y *pDsRed2-N2* de manera individual, posteriormente se inoculó en 5ml LB medio suplementado con antibiótico de selección (ampicilina/kanamicina); Finalmente se incubó por 16 horas a 37 °C con agitación continua de 220 RPM. Completado el tiempo las muestras fueron centrifugadas por 10 min a 3000 RPM con temperatura ambiente, y se decantó el sobrenadante para retirar medio de cultivo (Adaptado de: Sambrook & Fritsch, 1989).

La extracción y purificación del ADN plasmídico se llevó a cabo con el kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega Cat. #A1330). Se siguió la metodología como dicta el protocolo: Una vez retirado el sobrenadante, las muestras se re-suspendieron en 250µl de Cell Resuspension Solution con el cual se homogenizaron completamente para evitar grupos de células, fueron transferidas a un tubo de microcentrífuga (1.5ml). Posteriormente se agregaron 250µl de Cell Lysis Solution y se mezclaron invirtiendo el tubo 4 veces, posteriormente se incubaron las suspensiones 5 min, pasado el tiempo, se adicionaron 10µl de Alkaline Protease Solution, subsiguientemente se mezclaron invirtiendo el tubo 4 veces y se dejaron incubar 5 min, continuamente se agregaron 350µl de Neutralization Solution, y se mezclaron las suspensiones inmediatamente invirtiendo el tubo 4 veces, enseguida se centrifugó el lisado bacteriano durante 10 min a 14,000 RPM para sedimentar restos celulares; El sobrenadante obtenido (lisado claro) de las muestras fue transferido a una columna de centrifugación Spin con un tubo de recolección de 1.5ml para cada muestra y fue centrifugado a 14,000 RPM por 1 min y se desechó el filtrado;

Consecutivamente se agregaron 750µl de Column Wash Solution y se centrifugo por 1 min a 14,000 RPM, se desechó nuevamente el filtrado, y se repitió el proceso con 250µl de Column Wash Solution, posteriormente se centrifugó 2 min a 14,000. Finalmente se transfirió la columna Spin de centrifugación en un tubo nuevo de microcentrífuga de 1.5ml para cada muestra, al cual se le agregaron 50µl de agua libre de nucleasas y se centrifugó durante 1 min a 14,000 RPM, obteniendo así 50µl de ADN plasmídico.

7.5.- CUANTIFICACIÓN DE ADN

Para determinar el rendimiento de la extracción de ADN se cuantificaron las muestras obtenidas de la siguiente forma: Se preparo 1.5 ml de agua libre de nucleasas, 1 vial con 4µl de ADN por cada muestra a cuantificar. La concentración se midió en nanogramos/microlitro (ng/µl) en una relación 260/280nm (Sambrook & Fritsch, 1989), con ayuda del espectrofotómetro UV-VIS (Quawell 5000); Se inicio con la limpieza del equipo con 1µl de agua libre de nucleasas, de cada vial preparado con la muestra a medir, se realizaron 3 cuantificaciones empleando 1µl de ADN purificado, entre cada intervalo de cuantificación se limpió la celda de la muestra del equipo, finalmente se obtuvo un promedio para estimar la concentración de ADN de cada muestra.

7.6.- DOBLE DIGESTIÓN ENZIMÁTICA Y ELECTROFORESIS

En cuanto a la determinación de la presencia del fragmento deseado (*pDream2.1/MCS/CII-6*) en la muestra de ADN plasmídico, se realizó una doble digestión con el ADN extraído previamente. En un vial estéril de 1.5ml, se adicionaron 12.8µl de agua libre de nucleasas grado biología molecular (Thermo SCIENTIFIC. Cat # R0581), 2µl de Buffer MULTI-CORE (MC) (PROMEGA. Ref. R999A.), 0.2µl de Bovine Serum Albumin (BSA) (PROMEGA. Cat # R396E), 0.5µl de la enzima de restricción EcoR1 (PROMEGA. Cat # R601A), 0.5µl de la enzima

de restricción Kpn1 (PROMEGA Cat # R634A) y 4µl de ADN plasmídico. Como control negativo, se empleó Agua libre de Nucleasas que sirve como reemplazo de ADN plasmídico. Se homogenizó la solución por pipeteo cuidadosamente y se incubó durante 1 hora a 37 °C. Por último, se visualizó la doble digestión en un gel de agarosa (Bio-Ted Cat. # K09813) al 2% (Sambrook & Fritsch, 1989).

El gel de agarosa al 2% se preparó con 2gr de Agarosa diluida en 100 ml de TAE 1X (PROMEGA. Cat # V1090.), posteriormente se calentó la agarosa en un horno de microondas hasta disolverla por completo, posteriormente se agregaron 8µl de Bromuro de Etidio a una concentración de 10mg/ml (PROMEGA. #Cat H5041) y se agito hasta homogenizar por completo la solución.

Para la electroforesis se depositó la agarosa al 2% al molde de la cámara de electroforesis (Horizon R 58. Cat # 41060), posteriormente se colocó el peine de esta para formar los pocillos. Al polimerizar el gel, se retiró el peine y se agregó TAE 1X a la cámara de electroforesis. En cuanto a la carga de muestras, se depositaron 5µl de la digestión enzimática más 2µl de 5x Green GoTaq Flexi Buffer (PROMEGA Cat # M891A) por duplicado, consecutivamente se depositó 1µl del marcador de peso molecular Gene Ruler TM 100 pb DNA Ladder (Thermo SCIENTIFIC. Cat # FERSMO241), asimismo se depositaron 5µl de la muestra de control negativo más 2 µl de 5x Green GoTaq Flexi Buffer. Finalmente se dejó correr el gel durante 60min a 70 Volts y se observó con luz ultravioleta mediante el uso del Transluminador (MiniBis Pro, Acceso Lab. Cat # 2416P1), todo con la finalidad de verificar la posición de las bandas, así también como el peso molecular aproximado de la muestra deseada (316 pb) (Sambrook & Fritsch, 1989).

7.7.- REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Para confirmar que la secuencia del gen CII-6 en el plásmido recombinante (*pDream2.1/MCS/CII-6*), empleado en la investigación, es semejante a la reportada en GenBank, se amplificó el ADN plasmídico obtenido por extracción de ADN,

mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), para ello se emplearon los siguientes cebadores:

“Cebador Directo” 5′ TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG^{3′}

“Cebador Reverso” 3′CAA TTA AGA AGC GTT ACA ATA^{5′}

Diseñados con el programa Primer 3 Plus. De acuerdo con el protocolo del kit comercial PCR Master Mix (. PROMEGA. Cat # M7502), se ajustaron las muestras para un volumen final de 25 µl de la siguiente forma: 12.5µl de PCR Master Mix, 1.0µl de cebador directo (10µM), 1.0µl de cebador reverso (10µM), 1µl de ADN (Dilución 1:10 200-18 ng/µl) y 9.5 µl de ALN, finalmente se homogenizaron lenta y cuidadosamente las reacciones.

Las reacciones se efectuaron en un Termociclador (Arktik TC A0096. ThermoScientific), con el siguiente programa:

- Desnaturalización inicial de 95°C por 5 minutos
- Desnaturalización continúa a 95°C por 30 segundos
- 35 ciclos de alineamiento a 50°C por 30 segundos
- Extensión inicial a 72°C por 30 segundos
- Extensión final a 72°C por 5 minutos
- Refrigeración a 4°C por 5 minutos

7.8.- ELECTROFORESIS DEL PRODUCTO DE PCR

Una vez más para verificar la presencia del fragmento de interés (CII-6) en los amplificados por PCR, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% (Bio-Ted. Cat # K09813) en cámara de electroforesis (Horizon R 58. Cat # 41060) por 60min a 70volts. En cuanto a la carga de las muestras, inicialmente se depositó 1µl del marcador de peso molecular de 100-1000pb Gene Ruler TM 100pb DNA Ladder

(Thermo SCIENTIFIC. Cat # FERSMO241.), posteriormente se depositaron 5µl de producto de PCR más 2µl de 5x Green GoTaq Flexi Buffer (PROMEGA. Cat # M891A.). Finalmente se dejó correr el gel durante 60min a 70 Volts y se observó con luz ultravioleta mediante el uso del Transluminador (MiniBis Pro, Acceso Lab, Cat. # 2416P1). (Adaptado de: Sambrook & Fritsch, 1989).

7.9.- PURIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR

Para llevar a cabo la purificación de los productos de PCR se empleó el kit Wizard® Plus SV Gel and PCR Clean-Up System (PROMEGA. Cat #A9281) (Promega Cat. #A1330). Se siguió la metodología establecida por protocolo del fabricante de la siguiente manera: inicialmente se realizó la amplificación del fragmento de interés (CII-6), una vez obtenidos los productos de PCR, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2 % (Bio-Ted- Cat # K09813), en cámara de electroforesis (Horizon R 58. Cat. # 41060) por 60min a 70 volts. Una vez finalizado el tiempo, se visualizó el gel para detectar el fragmento de interés en una lampara de UV, posteriormente haciendo uso de un bisturí se cortó el fragmento de interés a partir del gel de cada una de las muestras. La fracción de gel cortada que contiene el fragmento de interés se transfirió a un tubo de microcentrífuga (1.5ml) previamente pesado, a continuación, se registró el peso de la fracción de gel. Posteriormente se adicionó al tubo que contiene la fracción de gel 10µl de Membrane Binding Solution por cada 10mg de peso de la fracción del gel cortado, de manera simultánea, se mezcló en vortex la reacción y se incubó a 50-60°C durante 10 min. Para llevar a cabo la etapa de purificación, se colocó una mini-columna SV en un tubo de recolección por cada fracción de gel disuelto o amplificación por PCR, posteriormente se transfirió la mezcla de cada muestra preparada a la mini-columna SV y se incubó durante 1min a temperatura ambiente, pasado el tiempo se centrifugo cada muestra a 14,000 RPM durante 1 min, se retiró la mini-columna SV y se desechó el líquido del tubo de recolección; Se llevó a cabo el lavado de las muestras, para ello se adicionó 700µl de Membrane Wash Solution, y se centrifugó durante 1min a 14,000 RPM, se retiró nuevamente el líquido del tubo de recolección y se repitió el lavado con 700µl

de Membrane Wash Solution, adicionalmente se centrifugó a 14,000 RPM durante 5 min. Con la finalidad de evaporar el etanol residual, se vació el líquido del tubo de recolección y se centrifugó la minicolumna SV durante 1min a 14,000 RPM; De manera consecutiva, se transfirió la mini-columna SV a un tubo limpio de microcentrífuga (1.5ml) y se adicionó 50µl de agua libre de nucleasas al centro de la columna, se incubó a temperatura ambiente durante 1min y se centrifugó durante 1min a 14,000 RPM. Finalmente se retiró la mini-columna SV y se almacenaron los tubos de las muestras de ADN a -20°C.

7.10.- ELECTROFORESIS DE LOS PRODUCTOS DE PCR PURIFICADOS

Para verificar la presencia del fragmento de interés (CII-6) en los productos de PCR purificados, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% (Bio-Ted. Cat # K09813), en cámara de electroforesis (Horizon R 58. Cat. # 41060) por 60min a 70 volts. En cuanto a la carga de las muestras, inicialmente se depositó 1µl del marcador de peso molecular de 100-1000pb Gene Ruler TM 100pb DNA Ladder (Thermo SCIENTIFIC. Cat # FERSMO241), posteriormente se depositaron 5µl de producto de PCR más 2µl de 5x Green GoTaq Flexi Buffer (PROMEGA. Cat # M891A.). Finalmente se dejó correr el gel durante 60min a 70 Volts y se observó con luz ultravioleta mediante el uso del Transluminador (MiniBis Pro, Acceso Lab. Cat # 2416P1) (Adaptado de: Sambrook & Fritsch, 1989).

7.11.- SECUENCIACIÓN

Una vez identificado el fragmento de interés (CII-6) en los productos PCR purificados, se cuantificaron las muestras para obtener la concentración de ADN en ng/µl, para ello se hizo uso del espectrofotómetro (Quawell Q5000) y estimó la concentración en nanogramos/microlitro (ng/µl) en una relación 260/280 nm. Se prepararon alícuotas 4µl de ADN de las muestras a cuantificar, y un tubo adicional con 1.5 ml de agua libre de nucleasas. Posteriormente realizó la limpieza del equipo

con 1µl de agua libre de nucleasas, de manera consecutiva de cada muestra a medir, se realizaron 3 cuantificaciones empleando 1µl de ADN, entre cada intervalo de cuantificación se limpió la celda de la muestra del equipo y finalmente se obtuvo un promedio para estimar la concentración de ADN de cada muestra. Consecutivamente las muestras fueron empaquetadas y etiquetadas de manera individual en tubos de PCR en un volumen de 10µl con una concentración de 100ng/µl, también fueron preparados 10 µl de “Cebador Directo y Reverso” a una concentración de 10 µM para su envío a la empresa CINVESTAV UGA-LIANGEBIO para llevar a cabo la secuenciación mediante el método de Sanger (Cinvestav- Unidad de Genómica Avanzada-Langebio, Irapuato, Guanajuato, México; <http://langebio.cinvestav.mx/labsergen/>). Una vez recibidas las secuencias, estas fueron alineadas en el software MEGA X, empleando un alineamiento progresivo del tipo Clustal W, estas a su vez fueron alineadas con la secuencia del gen CII-6 del alacrán *Centruroides limpidus limpidus* reportado en Gen Bank con número de acceso AF491132, a partir de la alineación se obtuvo una secuencia consenso y a partir de esta mediante el software en línea EMBOSS Water (https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_water/), se estimó el porcentaje de homología de la secuencia consenso obtenida con respecto a la repostada en Gen Bank.

7.12.- MANTENIMIENTO Y CULTIVO CELULAR

Las células empleadas para este proyecto fueron la línea celular SH-SY5Y de neuroblastoma humano, las cuales fueron cultivadas en una mezcla 1:1 en medio DMEM alta glucosa formulado (Cat #30-2003) y medio F12; 10% SFB (Fetal Bovine Serum. Cat.: S11550, Atlanta Biológica) y penicilina-estreptomicina (Ref. 15140-122 GibcoLife Technologies); Fueron mantenidas en incubación a 37°C, 5% CO₂ y Humedad Relativa del 90-95%.

Por otra parte, como control negativo y células productoras de la subfracción CII-6, se empleó la línea celular NIH/3T3 de fibroblastos embrionarios de Ratón, las células fueron cultivadas en medio DMEM alta glucosa formulado (Cat #30-2003);

10% SFB (Fetal Bovine Serum. Cat.: S11550, Atlanta Biológica) y penicilina-estreptomicina (Ref. 15140-122 GibcoLife Technologies). Fueron mantenidas a 37 °C, 5% CO₂ y humedad Relativa del 90-95%.

7.13.- EVALUACIÓN DE LA TRANSFECCIÓN

La transfección mediada por lípidos catiónicos es uno de los métodos más populares para la introducción de material genético exógeno en las células de mamífero, se basa en polímeros de poliamidoaminas y lipopoliaminas con cargas positivas que se unen a las cargas negativas del DNA formando vesículas (complejos) multilaminales que interactúan con los lípidos de la membrana celular, facilitando la transferencia de los ácidos nucleicos al interior de las células, mediante un proceso de tipo endocitosis (Navarro *et al.*, 2008; López Heydeck *et al.*, 2008).

Para llevar a cabo la transfección, ésta fue mediada por lipofección, para ello se empleó el reactivo Lipofectamine™ 2000 (Thermo Fisher. Cat # 11668030), siguiendo el protocolo del fabricante. Con la finalidad de evaluar el proceso de transfección, se empleó el plásmido *pDsRed2-N2* que contiene inserto el gen DsRed-2 empleado como gen reportero visual, gracias a que expresa la proteína fluorescente roja (DsRed2) en células transfectadas, permitiendo conocer si las condiciones establecidas de lipofección son favorables para llevar a cabo una transfección exitosa.

Los grupos de tratamiento se llevaron a cabo de la siguiente forma:

En placa de 24 pozos fueron sembradas 50,000 células NIH-3T3 por pozo y se esperó a tener una confluencia del 80-90% al siguiente día para realizar la transfección, se realizó solo una repetición por tratamiento por cada condición.

Grupo 1: Control Negativo- Células sin Tratamiento

Grupo2: Células con Lipofectamine™ 2000

Grupo 3: Células Transfectadas con el plásmido *pDsRed2-N2*

Grupo 4: Células Transfectadas con el plásmido *pDream2.1/MCS/CII-6*.

Finalmente los grupos de tratamiento fueron monitoreados durante 24, 48 y 72 horas, los 4 grupos se observaron bajo microscopio con luz blanca, para tomar evidencia de los posibles cambios morfológicos o reducción en cuanto a viabilidad; con respecto al grupo transfectado con el plásmido *pDsRed2-N2*, se observó con un microscopio de fluorescencia (Nikon Diaphot TMD-EF fluorescence) equipado con un conjunto de filtros para excitación a 535–550 nm y emisión a 580 nm, condiciones necesarias para observar la fluorescencia de RFP (Red fluorescent protein) con excitación máxima de 558nm y emisión máxima de 583nm.

7.14.- RT-PCR

Como parte anexa a la evaluación de la transfección, se realizó la técnica de RT-PCR con la finalidad de determinar que el gen CII-6 se integró a las células hospederas (NIH/3T3) y llevó a cabo su transcripción, para ello se aisló el ARN total mediante extracción fenólica con Trizol™ (Invitrogen Life Technologies. Cat # 15596026) a partir de los grupos de tratamiento con células NIH-3T3 empleadas en el punto 7.13; Siguiendo el protocolo del fabricante, se adicionaron 200µl de Trizol™ directamente a los grupos de tratamiento para una superficie de 1.9cm² (área de cultivo de un pozo de una placa de cultivo celular de 24 pozos), posteriormente se mezcló cada muestra para obtener un homogenizado celular, a partir de éste se llevó a cabo la separación de fases, se inició con la incubación de las muestras homogenizadas durante 5 min a temperatura ambiente, consecutivamente se adicionaron 0.04ml de cloroformo para producir la lisis celular (Relación 0.2ml de cloroformo por 1 ml de Trizol™), se agitó el vial de cada una de las muestras durante 15seg con la mano, posteriormente se incubaron las muestras durante 3min a temperatura ambiente y se centrifugaron durante 20min a 14,000 RPM a 4°C; A partir de lo anterior, a cada una de las muestras se retiró la fase acuosa inclinando el vial a 45° y se transfirió a un vial estéril. Respecto al aislamiento de ARN, se adicionó

0.1ml de isopropanol al 100% (Relación 0.5ml de isopropanol al 100% por 1 ml de Trizol™) y se incubó a temperatura ambiente 10min cada muestra, posteriormente se centrifugó a 14,000 RPM durante 10min a 4°C. De manera consecutiva, se llevó a cabo el lavado de ARN, para ello se retiró el sobrenadante de cada vial dejando solo el pellet de ARN, posteriormente se adicionó 0.2ml de etanol al 75% (Relación 1ml de etanol al 75% por 1 ml de Trizol™), se agitaron brevemente los viales y fueron centrifugados a 14,000 RPM durante 5min a 4°C y a continuación se dejó secar el pellet de ARN mediante la inversión de los viales durante 10min. Finalmente, el pellet de ARN de cada muestra se resuspendió con agua libre de RNAsa y se incubaron en baño maría a 56°C durante 15min.

Una vez obtenidas las muestras de ARN, se determinó la concentración de ARN, por lo que se cuantificaron por triplicado mediante un espectrofotómetro UV-VIS (Quawell 5000), la concentración se midió en nanogramos/microlitro (ng/μl) a una relación 260/280 nm, asimismo para verificar la integridad del ARN, las muestras se visualizaron en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y se observó con luz UV en Transluminador (MiniBis Pro).

Para llevar a cabo la síntesis de ADNc, se usó 1μg de ARN total de cada una de las muestras obtenidas y se trataron con DNaseI (Biolabs), siguiendo el protocolo del fabricante, para cada muestra el tratamiento fue de la siguiente manera: en una relación de 1μg de ARN, se adiciono 1μl de Buffer10X, 1μl de DNAsa y agua libre de nucleasas como complemento para un volumen final de 10μl, consecutivamente se dejaron incubar las muestras 15min a temperatura ambiente, pasado el tiempo se adiciono 1μl de EDTA (50Mm) a cada muestra y se realizó una incubación de 10min a 70°C, al finalizar la incubación las muestras se transfirieron a hielo

Para llevar a cabo la síntesis de ADNc, cada una de las muestras se incubo 5min a 65°C en baño maría, pasado el tiempo se incubaron 5min en hielo, posteriormente se agregó en una relación de 1μg de ARN lo siguiente: 4μl de Buffer pM-MLV 5x, 2μl de DTT (100Mm), a continuación se incubaron durante 2min a 37°C en baño maría, de manera consecutiva se adiciono 1μl de M-MLV (Invitrogen) para una relación de 1μg de ARN, por último se incubaron las muestras durante 50min a

37°C en baño maría y al finalizar se inactiva la enzima M-MLV (Invitrogen) a 70°C durante 15 min.

A partir del ADNc, se llevó a cabo la amplificación del gen β -Actina como control de integridad de las muestras del grupo de Control Negativo y el Grupo Transfectado con el Gen CII-6, de la misma manera, se realizó una amplificación del gen CII-6. Para la amplificación del gen de β -Actina, se emplearon los siguientes cebadores (Chou-Lundberg & Bohn, 1995):

“Cebador Directo” 5'TCACGCACGATTTCCCTCTCAG^{3'}

“Cebador Reverso” 3'ATTTGGCACCACACTTTCTACA^{5'}

Respecto a la amplificación del gen de β -Actina, las reacciones se prepararon de la siguiente manera: 1 μ l del ADNc con una concentración de 50ng/ μ l, 0.25 μ l de cebador directo (20 μ M), 0.25 μ l de cebador reverse (20 μ M), 6.25 μ l de PCR Master Mix (Cat. # M7502. PROMEGA) y agua libre de nucleasas como complemento para un volumen final de 12.5 μ l.

Las reacciones se efectuaron en un Termociclador (BIO-RAD T100™), con el siguiente programa (Zarco, González-Ramírez, González, & Segovia., 2012):

- Desnaturalización inicial de 95°C por 5 minutos
- Desnaturalización continua a 95°C por 5 min
- 40 ciclos de alineamiento a 53°C por 30 segundos
- Extensión inicial a 72°C por 30 segundos
- Extensión final a 72°C por 10 minutos
- Refrigeración a 4°C por 5 minutos

Para la amplificación del gen CII-6 se emplearon los siguientes cebadores diseñados con el Software en línea Primer-Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>):

“Cebador Directo” 5'TGGTGAACATGAAACGGGC^{3'}

“Cebador Reverso” 3'GATTTACCAGGAAGGGGCCAA^{5'}

Las reacciones se prepararon de la siguiente manera: 2µl del ADNc con una concentración de 100ng/µl, 0.5µl de cebador directo (10µM), 0.5µl de cebador reverse (10µM), 6.25µl de PCR Master Mix (PROMEGA. Cat # M7502.) y agua libre de nucleasas como complemento para un volumen final de 12.5µl.

Las reacciones se efectuaron en un Termociclador (BIO-RAD T100™), con el siguiente programa:

- Desnaturalización inicial de 95°C por 5 minutos
- Desnaturalización continúa a 95°C por 30 segundos
- 40 ciclos de alineamiento a 60.2°C por 30 segundos
- Extensión inicial a 72°C por 20 segundos
- Extensión final a 72°C por 5 minutos
- Refrigeración a 4°C por 5 minutos

Finalmente, los productos de PCR de ambas amplificaciones se visualizaron en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y se observó con luz UV en Transluminador (MiniBis Pro).

7.15.- ENSAYO DE VIABILIDAD POS-TRANSFECCIÓN

Con la finalidad de determinar si la producción de la subfracción CII-6 en las células productoras (NIH/3T3) induce un efecto que reduce la viabilidad de estas, así también como determinar el efecto que ejerce sobre la viabilidad el uso de Lipofectamine™ 2000, se realizó un ensayo de viabilidad el cual se monitoreó en 3 tiempos, 24, 48 y 72 horas, para ello los grupos de tratamiento se establecieron como se muestra en la **Tabla 5**.

Tabla 5: Grupos de tratamiento administrados en células NIH/3T3 de fibroblastos embrionarios de ratón para la evaluación de la transfección

Grupo	Tratamiento
1	Control Negativo- Células sin Tratamiento
2	Células con Lipofectamine™ 2000
3	Células Transfectadas con el plásmido <i>pDsRed2-N2</i>
4	Células Transfectadas con el plásmido <i>pDream2.1/MCS/CII-6</i>

Nota. Los grupos fueron evaluados respecto al tiempo de incubación (24, 48 y 72 horas).

Este ensayo se realizó en placa de 96 pozos y de acuerdo con el tiempo de monitoreo, se sembraron células NIH-3T3 de la siguiente forma:

Tiempo 1 (24 hrs):

3,500 células por pozo en la línea A1-A12, con los 4 grupos de tratamiento, 3 días antes de la transfección esperando una confluencia del 80-90%, se realizó por triplicado para cada grupo de tratamiento.

Tiempo 2 (48 hrs):

6,000 células por pozo en la línea C1-C12, con los 4 grupos de tratamiento, 2 días antes de la transfección, esperando una confluencia del 80-90%, se realizó por triplicado para cada grupo de tratamiento.

Tiempo 3 (72 Hrs)

11,000 células por pozo en la línea E1-E12, con los 4 grupos de tratamiento, 1 día antes de la transfección, esperando una confluencia del 80-90%, se realizó por triplicado para cada grupo de tratamiento.

A continuación, en la **Figura 12** se muestra la organización de los grupos transfectados en la placa de 96 pozos.

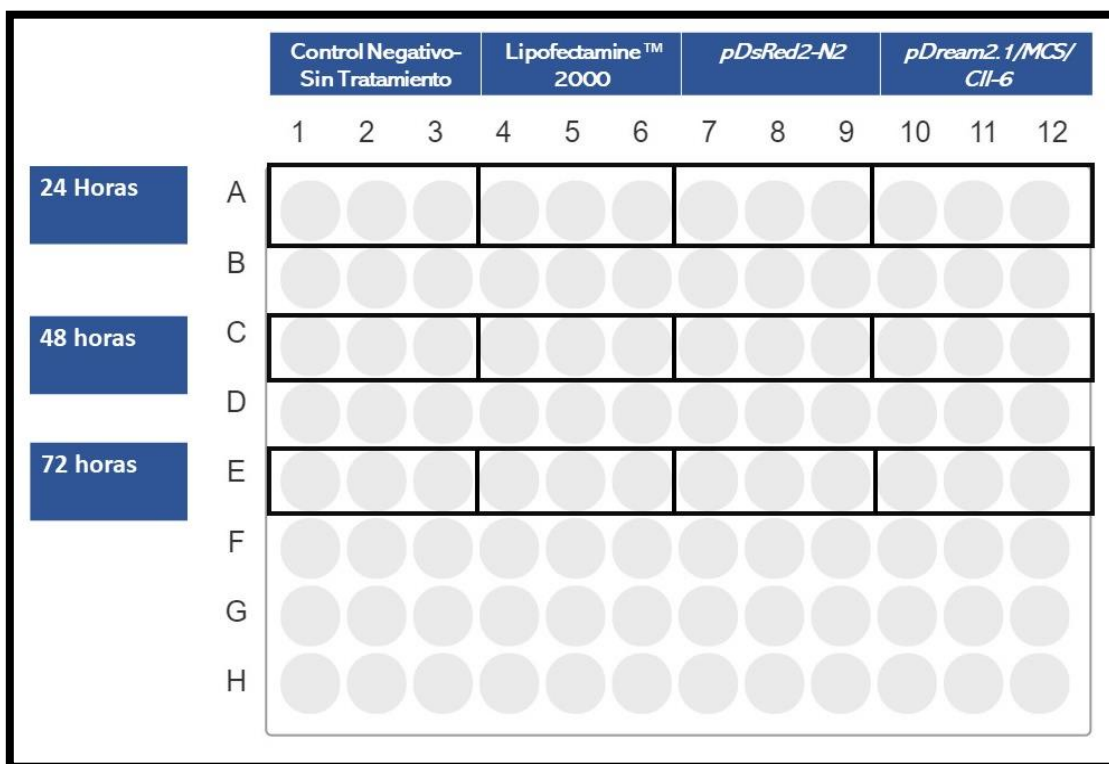


Figura 12. Organización de los grupos de tratamiento en células NIH/3T3.

Se incluyen los grupos transfectados con los plásmidos pDream2.1/MCS/CII-6 y pDsRed2-N2, así también como los grupos control sin tratamiento y con Lipofectamine™ 2000, con tiempos de incubación de 24, 48 y 72 horas, en placa de 96 pozos.

Al finalizar el periodo de monitoreo, se siguió el protocolo del fabricante del kit MTT, Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (Sigma®. Cat # M2128 1G) un ensayo colorimétrico empleado para la evaluación de la viabilidad celular. Para ello se preparó una solución 5mg/ml, se diluyó en PBS 1X, de manera simultánea se homogenizó la solución y se adicionaron en relación 1:10 con respecto al volumen final de medio de cada pozo de los grupos de tratamiento. Posteriormente se incubó la placa durante 2.5 horas, a 37 °C, 5% CO₂. Al finalizar el tiempo de incubación, se retiró el medio de cada grupo de tratamiento y se solubilizaron los cristales adicionando 40 µl de DMSO, por último, se registró la absorbancia a 570 nm en un

espectrofotómetro (Bio-Rad iMark Microplate Reader) y se determinó el porcentaje aproximado de células vivas.

7.16.- ENSAYO DE VIABILIDAD POSTRATAMIENTO CON LA SUBFRACCIÓN CII-6 EN CÉLULAS SH-SY5Y

Para determinar el efecto de la fracción CII-6 sobre las células de neuroblastoma humano (SH-SY5H), se realizó inicialmente la producción de esta, esto mediante la transfección de las células productoras (NIH/3T3), lo cual se describe a continuación:

Se llevo a cabo un conteo y una siembra de células de fibroblastos embrionarios de ratón (NIH/3T3), este ensayo se realizó en caja Petri para cultivo celular de 60mm de diámetro, para ello, se sembraron 2 cajas Petri con aproximadamente 700,000 células, los grupos transfectados se establecieron de la siguiente manera:

Grupo 1: Control Negativo- Células sin Tratamiento

Grupo 2: Células Transfectadas con el plásmido *pDream2.1/MCS/CII-6*.

La transfección se llevó a cabo haciendo uso de Lipofectamine™ 2000 (Thermo Fisher Cat #11668030), siguiendo el protocolo del fabricante. Los grupos de tratamiento fueron monitoreados durante 72 horas, una vez finalizado el periodo, se recolectó el medio de cada grupo en tubos de 15ml, se centrifugó a 1200RPM durante 3 min, posteriormente se filtró el medio con acrodisco de tamaño de poro de 0.22µm/PES (Corning Cat: 43122). Finalmente, los medios se almacenaron a -20°C.

***Nota:** El medio recolectado del grupo 2, transfectado con el plásmido *pDream2.1/MCS/CII-6*, se denomina medio condicionado.

Una vez realizada la producción de la subfracción CII-6, lo siguiente fue evaluar el efecto sobre la viabilidad de la línea celular de neuroblastoma humano (SH-SY5Y), para ello los grupos de tratamiento y la preparación de este, se realizó como se muestra en la **Tabla 6**.

Tabla 6: Grupos de tratamiento administrados en células SH-SY5Y de neuroblastoma humano para la evaluación de la subfracción CII-6

Grupo	Tratamiento	Preparación
1	Sin Tratamiento - Control Negativo	Medio Sin Tratamiento, volumen final 125µl.
2	Células con Tratamiento al 25%	Medio S/T (75%) + Medio Condicionado con CII-6 (25%), volumen final de 125µl.
3	Células con Tratamiento al 50%	Medio S/T (50%) + Medio Condicionado con CII-6 (50%), volumen final de 125µl.
4	Células con Tratamiento al 100%	Medio Condicionado con CII-6 (100%), volumen final de 125µl.

Nota. Los grupos fueron evaluados respecto al tiempo de incubación (24, 48 y 72 horas).

Este ensayo se realizó en placa de 96 pozos por triplicado y cada grupo de tratamiento se monitoreó 24, 48 y 72 horas, de acuerdo con el tiempo de monitoreo, se sembraron células SH-SY5Y de la siguiente forma:

Tiempo 1 (24 hrs):

6000 células por pozo en la línea A1-A12, con los 4 grupos de tratamiento, 3 días antes de la aplicación de este, esperando una confluencia del 80-90% del pocillo.

Tiempo 2 (48 hrs):

9,000 células por pozo en la línea C1-C12, con los 4 grupos de tratamiento, 2 días antes de la aplicación de este, esperando una confluencia del 80-90% del pocillo.

Tiempo 3 (72 Hrs)

14,000 células por pozo en la línea E1-E12, con los 4 grupos de tratamiento, 1 día antes de la aplicación de este, esperando una confluencia del 80-90% del pocillo.

A continuación, en la **Figura 13** se muestra la organización de la aplicación del tratamiento en la placa de 96 pozos.

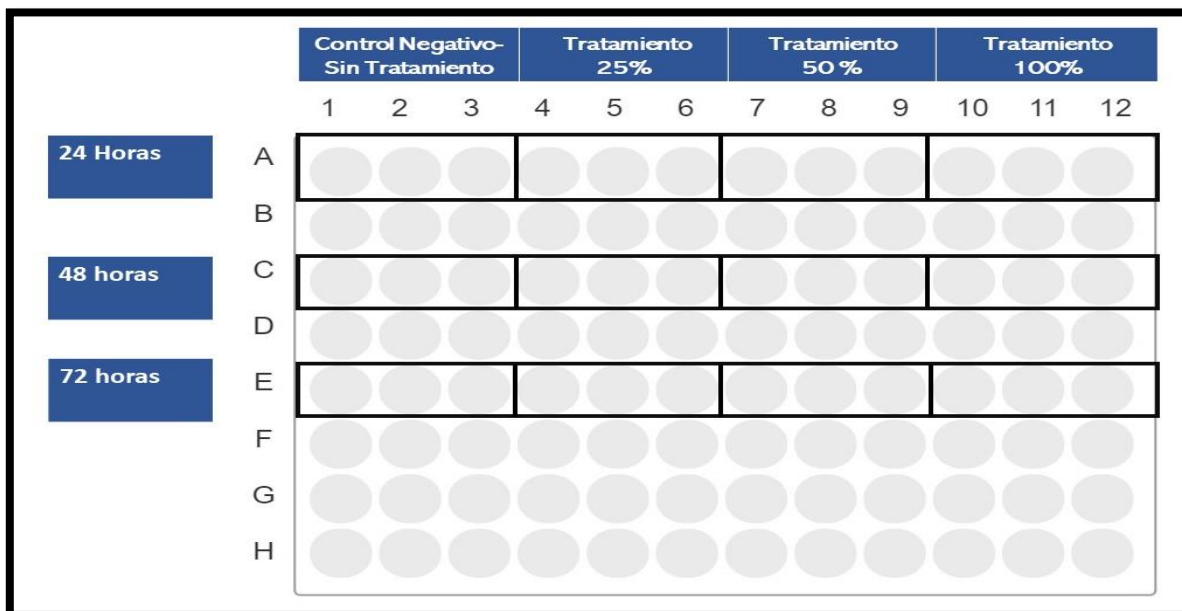


Figura 13. Organización de los grupos de tratados con CII-6 en células SH-SY5Y

Aplicación de CII-6 con diluciones al 25 y 50%, CII-6 al 100% y un grupo control sin tratamiento, con tiempos de incubación de 24, 48 y 72 horas, en placa de 96 pozos.

Al finalizar el periodo de monitoreo, se realizó el ensayo de viabilidad, siguiendo el protocolo del fabricante del kit MTT, Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (Sigma®. Cat # M2128 1G), se preparó una solución 5mg/ml, se diluyó en PBS 1X, de manera simultánea se homogenizó la solución y se adicionaron en relación 1:10 con respecto al volumen final de medio de cada pozo de los grupos de tratamiento. Posteriormente se incubó la placa durante 2.5 horas, a 37 °C, 5% CO₂. Al finalizar el tiempo de incubación, se retiró el medio de cada grupo de tratamiento y se solubilizaron los cristales adicionando 40 µl de DMSO, por último, se registró la absorbancia a 570 nm en un espectrofotómetro (Bio-Rad iMark Microplate Reader) y se determinó el porcentaje aproximado de células vivas.

7.17.- ENSAYO DE VIABILIDAD POSTRATAMIENTO: COMPARACIÓN DEL EFECTO DE LA FRACCIÓN CII-6 EN CÉLULAS DE NERUROBLASTOMA HUMANO (SH-SY5Y) Y GLIOBLASTOMA HUMANO (U-87)

Para determinar el efecto de la fracción CII-6 sobre células con características semejantes, específicamente en cuanto a la expresión de canales de sodio, se realizó una comparación del efecto que induce la fracción CII-6 en células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) y en células de glioblastoma humano (U-87) con un tiempo de monitoreo de 72 horas, para ello se, se realizó la producción de la fracción CII-6 como ya se ha descrito anteriormente en el apartado 7.16 de materiales y métodos. Por otro lado, respecto a la preparación del tratamiento, en este caso se optó solo por 2 de ellos, los cuales se muestran en la **Tabla 7**.

Tabla 7: Grupos de tratamiento administrados en células SH-SY5Y de neuroblastoma humano y U-87 de glioblastoma humano para la evaluación de la subfracción CII-6

Grupo	Tratamiento	Preparación
1	Sin Tratamiento- Control Negativo	Medio Sin Tratamiento, volumen final 125µl.
2	Células con Tratamiento al 100%	Medio Condicionado con CII-6 (100%), volumen final de 125µl.

Nota. Los grupos fueron evaluados respecto al tiempo de incubación (72 horas).

Este ensayo se realizó en placa de 96 pozos por triplicado y cada grupo de tratamiento se monitoreó por 72 horas, de acuerdo con el tiempo de monitoreo, se sembraron células SH-SY5Y de la siguiente forma:

Tiempo 1 (72 Hrs)

14,000 células por pozo en la línea A1-A6, con los 2 grupos de tratamiento, 1 día antes de la aplicación de este, esperando una confluencia del 80-90% del pocillo.

En cuanto a las células U-87, se sembraron de la siguiente forma:

11,000 células por pozo en la línea C1-C6, con los 2 grupos de tratamiento, 1 día antes de la aplicación de este, esperando una confluencia del 80-90% del pocillo.

A continuación, en la **Figura 14** se muestra la organización de la aplicación del tratamiento en la placa de 96 pozos.

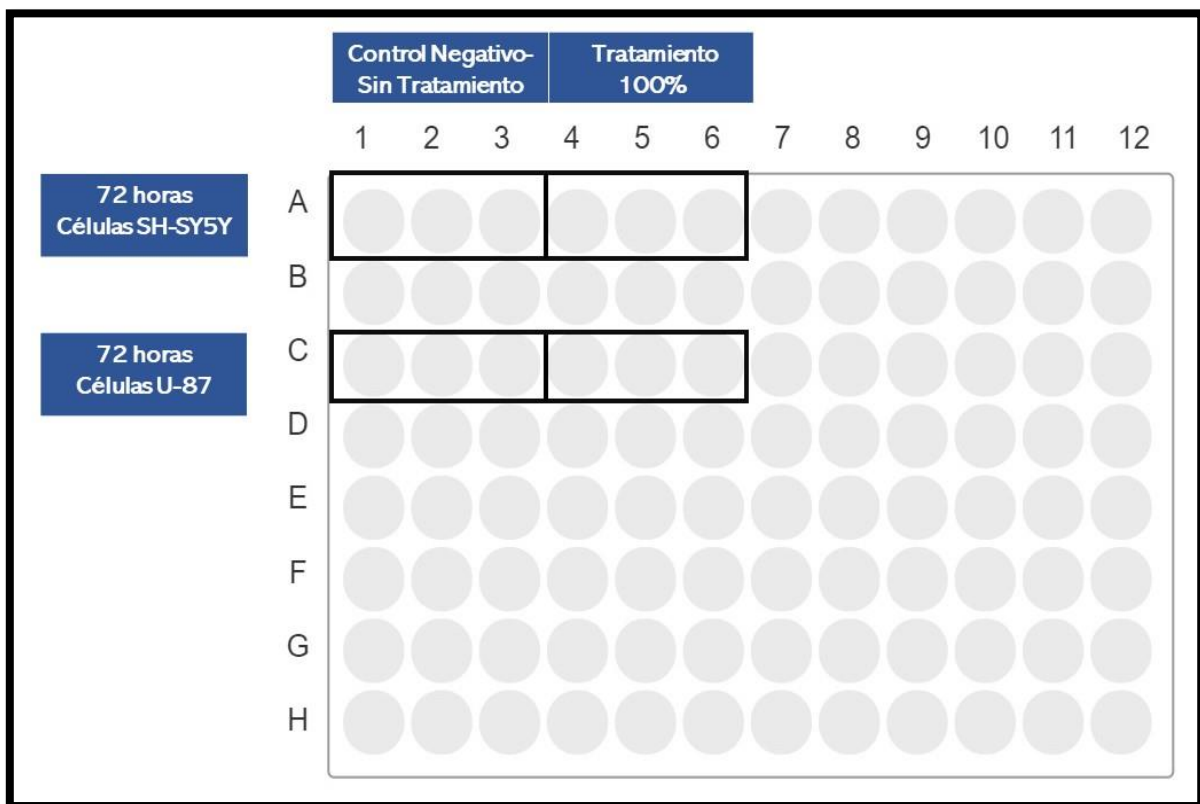


Figura 14. Organización de los grupos de tratamiento con CII-6 en células SH-SY5Y y U-87. Aplicación de CII-6 al 100%, con un tiempo de incubación de 72 horas, en placa de 96 pozos.

Al finalizar el periodo de monitoreo, se realizó el ensayo de viabilidad, siguiendo el protocolo del fabricante del kit MTT, Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (Sigma®. Cat # M2128 1G), se preparó una solución 5mg/ml, se diluyó en PBS 1X, de manera simultánea se homogenizó la solución y se adicionaron en relación 1:10 con respecto al volumen final de medio de cada pozo de los grupos de tratamiento. Posteriormente se incubó la placa durante 2.5 horas, a 37 °C, 5% CO₂. Al finalizar el tiempo de incubación, se retiró el medio de cada grupo de tratamiento y se solubilizaron los cristales adicionando 40 µl de DMSO, por último, se registró la

absorbancia a 570 nm en un espectrofotómetro (Bio-Rad iMark Microplate Reader) y se determinó el porcentaje aproximado de células vivas.

7.18.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se empleó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías con un análisis *post hoc* mediante el método de comparaciones múltiples Holm-Sidak, para analizar las diferencias entre los grupos de tratamiento con los grupos control, con las variables de reducción de la viabilidad y tiempo de tratamiento, este se ejecutó para los ensayos de viabilidad pos-transfección en células NIH/3T3 y viabilidad postratamiento con CII-6 en células SH-SY5Y. Por otro lado, para analizar las diferencias entre los grupos de tratamiento en el ensayo de viabilidad comparativo del efecto de CII-6 en las líneas celulares SH-SY5Y y U-87, con la variable a analizar que es tipo de línea celular, se llevó a cabo un análisis de varianza de una vía, con un análisis *post hoc* mediante el método de comparaciones múltiples Dunn. Todos los datos se expresarán como la media \pm desviación estándar y se consideró significativa cualquier variación con $p < 0.05$ (Gupta *et al.*, 2010; Zargan, J. *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2011; Escalona *et al.*, 2014).

8.- RESULTADOS

8.1.- DIGESTIÓN ENZIMÁTICA

Mediante la digestión enzimática empleando las enzimas EcoR1 y Kpn1, con 120 minutos de incubación a 37 °C, y por medio de electroforesis en gel de agarosa al 2 % (**Figura 15**), se confirmó que el ADN plasmídico obtenido por la extracción de ADN contiene el inserto del Gen CII-6 con un peso molecular de 316 pb, presentes en la posición de las bandas en el gel de agarosa.

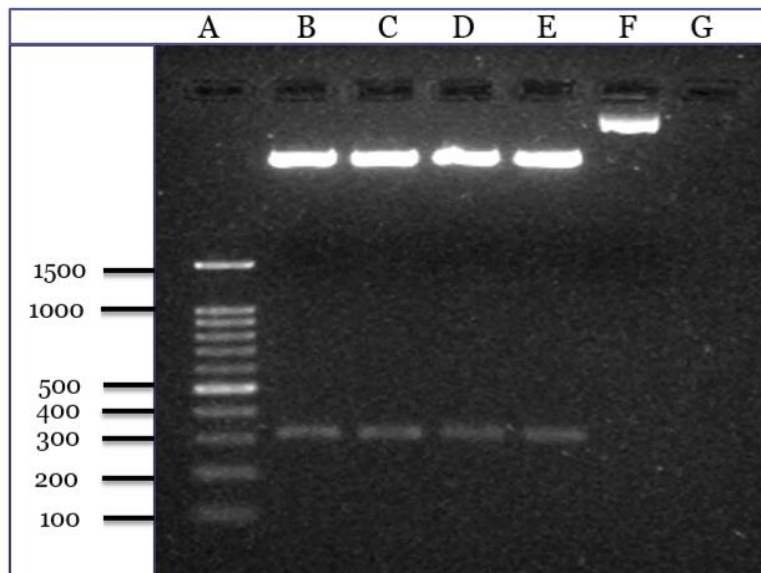


Figura 15. Digestión enzimática del gen CII-6

Gel de agarosa al 2 %, carril A marcador de peso molecular que va de 100-1500 pb. Digestión enzimática del plásmido recombinante (pDrema2.1/MCS/CII-6) presente en los carriles B, C, D y E; carril F ADN sin digerir y carril G control negativo.

8.2.- REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA y PURIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR

Se realizó la electroforesis de los productos PCR en gel de agarosa al 2 %, estos presentaron una banda aproximada de 559 pb, hecho que apoya a la confirmación de la presencia del gen CII-6 de interés (**Figura 16**), consecutivamente se realizó purificación de estos para ser enviados a secuenciar (**Figura 17**).

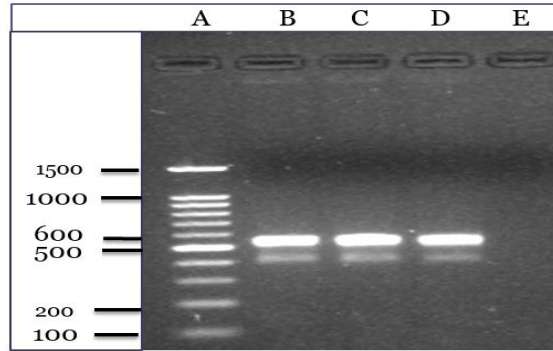


Figura 16. Amplificación del CII-6 mediante PCR

Gel de agarosa al 2 %, carril A marcador de peso molecular que va de 100-1500 pb. Carril B, C y D amplicones de 559 pb del gen CII-6; Carril E control negativo.

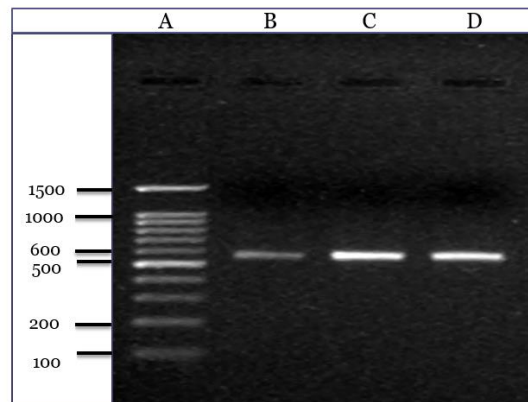


Figura 17. Amplicones purificados del gen CII-6

Gel de agarosa al 2 %, carril A marcador de peso molecular que va de 100-1500 pb. Carril B, C y D amplicones de 559 pb purificados del gen CII-6.

8.3.- ANÁLISIS DE SECUENCIACIÓN

Las secuencias enviadas por la empresa UGA-LANGEBIO, se alinearon mediante el software Mega X con la secuencia reportada en Gen Bank con número de acceso AF491132, se obtuvo una secuencia consenso la cuál posteriormente mediante el software en línea EMBOSS Water, se estimó el porcentaje de homología de la misma con respecto a la reportada en Gen Bank, obteniendo un 100% de similitud (**Figura 18**), confirmando así la presencia del gen CII.6 y la correcta construcción del plásmido (*pDream2.1/MCS/CII-6*).

```

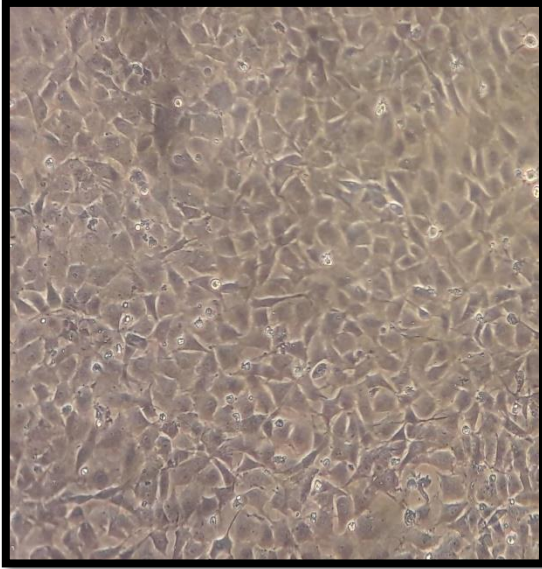
#####
# Program: water
# Rundate: Sat 21 Sep 2019 21:34:07
# Commandline: water
# -auto
# -stdout
# -asequence emboss_water-I20190921-213404-0355-65976175-plm.asequence
# -bsequence emboss_water-I20190921-213404-0355-65976175-plm.bsequence
# -datafile EBLOSUM62
# -gapopen 10.0
# -gapextend 0.5
# -aformat3 pair
# -sprotein1
# -sprotein2
# Align_format: pair
# Report_file: stdout
#####
#-----
#
# Aligned_sequences: 2
# 1: EMBOSS_001
# 2: EMBOSS_001
# Matrix: EBLOSUM62
# Gap_penalty: 10.0
# Extend_penalty: 0.5
#
# Length: 282
# Identity:      282/282 (100.0%)
# Similarity:   282/282 (100.0%)
# Gaps:         0/282 ( 0.0%)
# Score: 1598.0
#
#-----
EMBOSS_001      1 GAAGATGAACTCGTTGTTGATGATTATTGGTTGTTTGGTCCTGATCGGAA      50
EMBOSS_001      1 GAAGATGAACTCGTTGTTGATGATTATTGGTTGTTTGGTCCTGATCGGAA      50
EMBOSS_001     51 CAGTGTGGACAAAGGAAGGTTATCTGGTGAACATGAAAAACGGGCTGCAAA     100
EMBOSS_001     51 CAGTGTGGACAAAGGAAGGTTATCTGGTGAACATGAAAAACGGGCTGCAAA     100
EMBOSS_001    101 TACGGGTGCTATGAATTGGGTGACAACGGTTACTGCGATAGGAAATGCAA     150
EMBOSS_001    101 TACGGGTGCTATGAATTGGGTGACAACGGTTACTGCGATAGGAAATGCAA     150
EMBOSS_001    151 AGCGGAGAGCGGTAACACGGCTATTGCTATACTGTTGGGTGCTGGTGCG     200
EMBOSS_001    151 AGCGGAGAGCGGTAACACGGCTATTGCTATACTGTTGGGTGCTGGTGCG     200
EMBOSS_001    201 AAGGATTGCCCAATAGTAAACCGACTTGGCCCCCTTCTGGTAAATCATGC     250
EMBOSS_001    201 AAGGATTGCCCAATAGTAAACCGACTTGGCCCCCTTCTGGTAAATCATGC     250
EMBOSS_001    251 AGCGGAAAAATAATAGCAACGCTCTTTTATTGT      282
EMBOSS_001    251 AGCGGAAAAATAATAGCAACGCTCTTTTATTGT      282

```

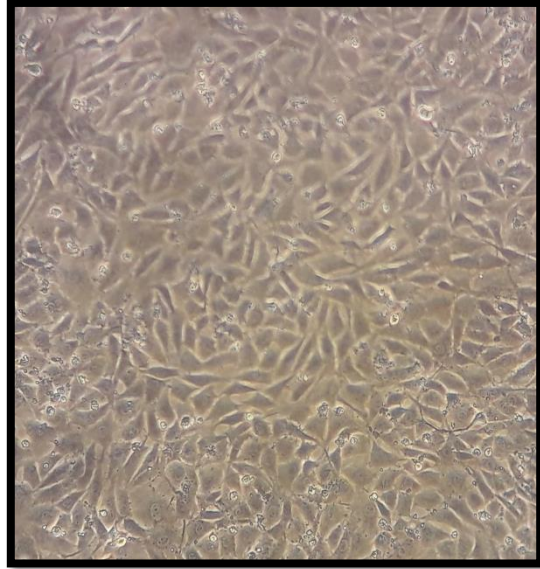
Figura 18. Secuencia CII-6 (AF491132) y secuencia enviada por LANGEBIO alineadas en el software EMBOSS Water.

8.4.- EVALUACIÓN DE LA TRANSFECCIÓN

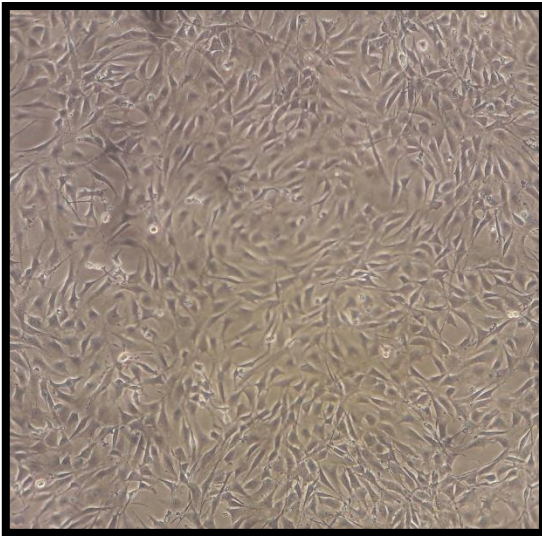
Para optimizar la transfección mediada por lipofección (Lipofectamine™ 2000), durante esta etapa fueron evaluadas las condiciones establecidas por el fabricante, para ello se monitorearon los grupos de tratamiento (Grupo 1: Control Negativo-Células sin tratamiento; Grupo2: Células con Lipofectamine™ 2000; Grupo 3: Células Transfectadas con el plásmido *pDsRed2-N2*; Grupo 4: Células Transfectadas con el plásmido *pDream2.1/MCS/CII-6* **Figura 19**) durante 24, 48 y 72 horas; de acuerdo a lo que se observó bajo microscopía con luz blanca, se detectó que no hay cambios en cuanto a la morfología inicial post-transfección al comparar a las 72 hrs, el grupo 1 (Células sin tratamiento) con los grupos 3 y 4 transfectados con su respectivo plásmido. Con respecto a la viabilidad, se estableció que los grupos 3 y 4 presentan una confluencia semejante del 85-90% y es producida por el efecto de la transfección, no obstante, tanto el grupo 1 y 2 mantiene una confluencia del 90-100%.



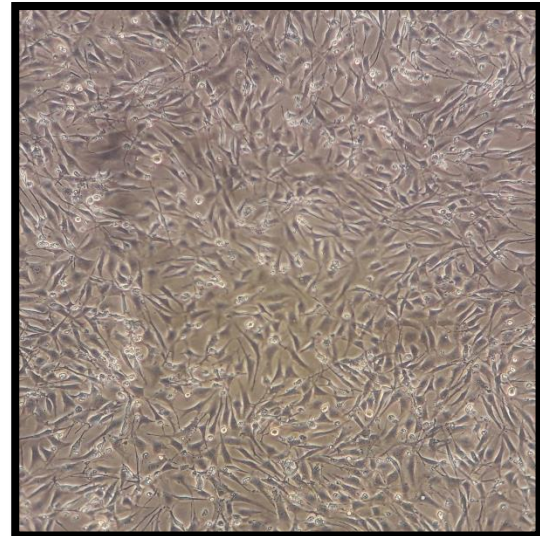
a) Grupo 1: Células Sin Tratamiento



b) Grupo 2: Células con Lipofectamine™ 2000



d) Grupo 3: Células transfectadas
con pDsRed2-N2



e) Grupo 4: Células transfectadas con
pDream2.1/MCS/CII-6

Figura 19. Comparación de grupos transfectados de células de Fibroblastos embrionarios de ratón (NIH/3T3).

a) ST, b) Células con Lipofectamine™ 2000, c) pDsRed2-N1p y D) pDream2.1/MCS/CII-6 después de 72 horas; Campos observados mediante objetivo 10x.

Con respecto al grupo 3 de células transfectadas con el plásmido *pDsRed2-N2*, estas se monitorearon hasta 72 horas (**Figura 20**), donde se observaron células con fluorescencia roja, indicativo de que las condiciones establecidas de lipofección permiten llevar a cabo una transfección exitosa.

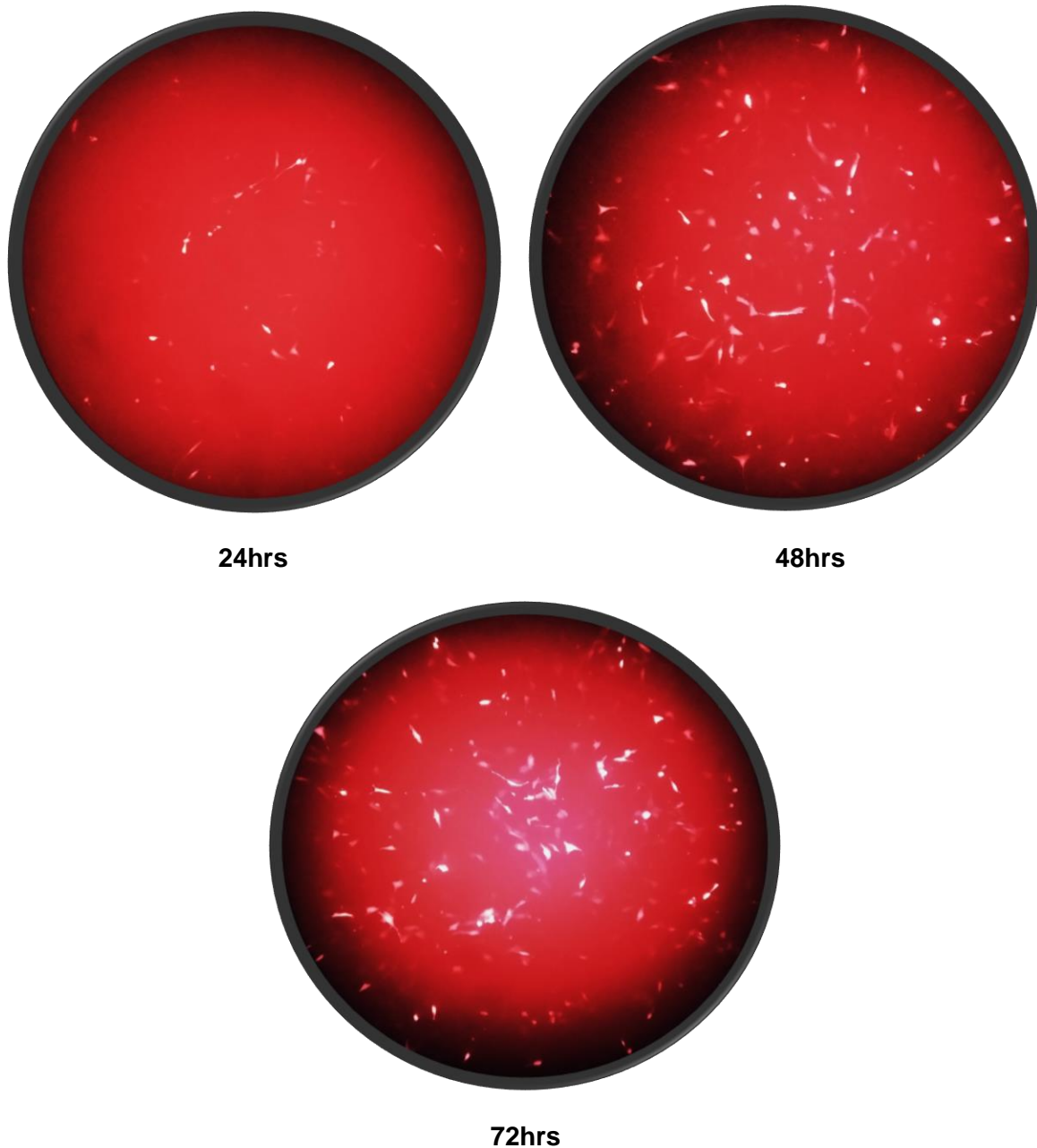


Figura 20. Grupos transfectados de células de Fibroblastos embrionarios de ratón (NIH/3T3) con el plásmido *pDsRed2-N2*.

Monitoreo a las 24, 48 y 72 horas. Campos observados mediante objetivo 10x, con filtro de fluorescencia rojo.

8.5.- RT-PCR POS-TRANSFECCIÓN

Se realizó la electroforesis de los productos PCR que amplificaron el gen de β -Actina como control en las muestras de ADNc obtenidas del ensayo de evaluación de transfección, estos presentaron una banda de aproximada de 376pb (**Figura 21**); Empleando las mismas muestras de ADNc, se realizó la amplificación del gen CII-6, donde se presentó una banda aproximada de 172pb en las muestras del grupo transfectado con el plásmido *pDream2.1/MCS/CII-6* y confirmando también mediante la amplificación de la banda de 172pb en el control positivo (**Figura 22**), hecho que demuestra que el gen CII-6 se transcribe y se integró a las células productoras (NIH/3T3) de forma exitosa.

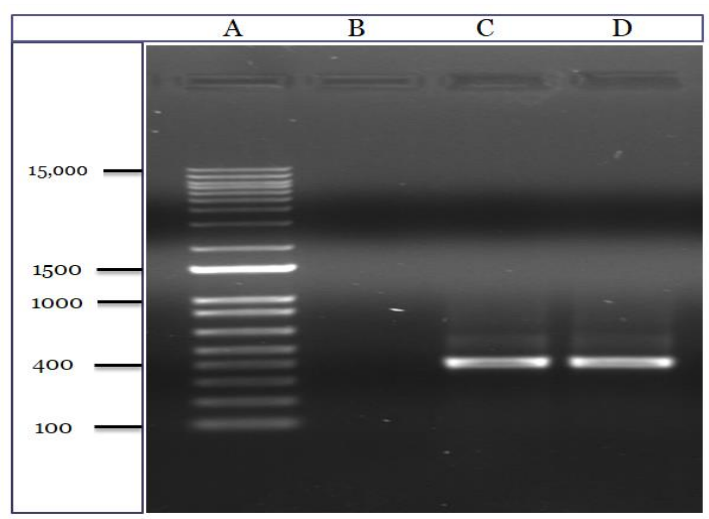


Figura 21. Amplificación del gen de β -Actina a partir de ADNc

Gel de agarosa al 1%, carril A marcador de peso molecular que va de 100-15,000 pb. Carril B Control Negativo, Carril C CN (Tratamientos) y Carril D CII-6 (Tratamiento) de 376 pb.

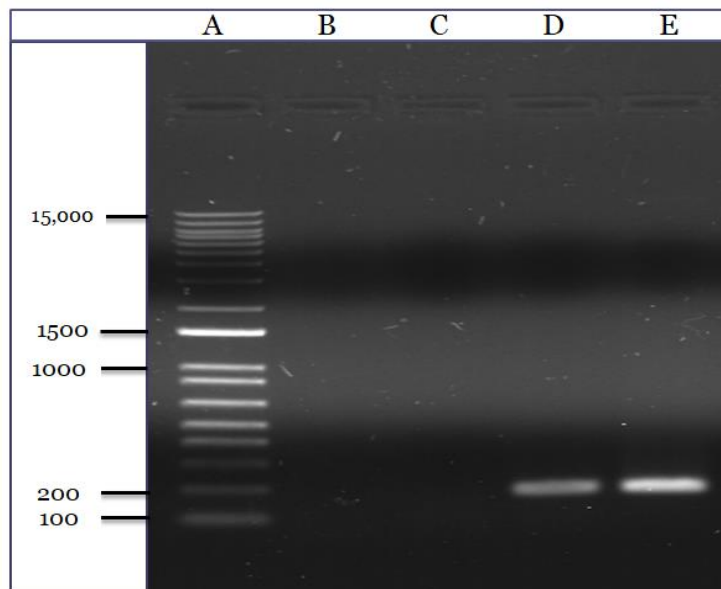
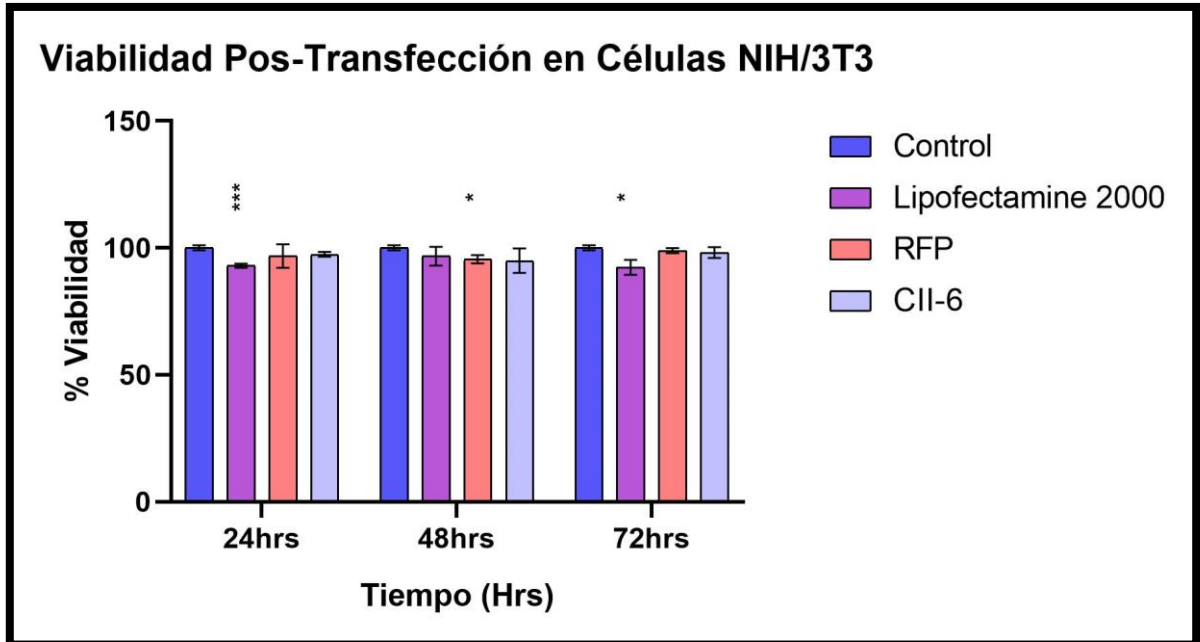


Figura 22. Amplificación del gen CII-6 a partir de ADNc

Gel de agarosa al 1%, carril A marcador de peso molecular que va de 100-15,000 pb. Carril B Control Negativo, Carril CN (Tratamientos), Carril D amplicon CII-6 (Tratamiento) de 172 pb y Carril E amplicon Control Positivo de 172pb.

8.6.- ENSAYO DE VIABILIDAD POS-TRANSFECCIÓN

Adicional a la evaluación de la transfección, se realizó un ensayo de viabilidad pos-transfección con el kit MTT, monitoreado durante 24, 48 y 72 horas, para ello los grupos de tratamiento fueron: Control (Sin tratamiento), Lipofectamine™ 2000, plásmido *pDsRed2-N2* y el plásmido *pDream2.1/MCS/CII-6*, con la finalidad de demostrar que las células empleadas como productoras (NIH/3T3) de la proteína CII-6, no presentan un efecto negativo sobre su viabilidad tras la producción de esta. De acuerdo con los resultados del grupo control con Lipofectamine™ 2000, se detectó que, bajo las condiciones establecidas para la transfección, el reactivo ejerce un 6.9% de reducción de viabilidad tras las primeras 24 horas, 3.24% a las 48 horas y 7.62% a las 72 horas, por lo que se realizó un ajuste a los datos obtenidos de los grupos transfectados (*pDsRed2-N2* y *pDream2.1/MCS/CII-6*) al sumar el porcentaje de reducción de viabilidad para cada uno de los tres tiempos en estos, debido al efecto citotóxico que produce por si solo el reactivo en las células NIH/3T3; Por otro lado al observar los resultados de los grupo transfectados con el plásmido *pDream2.1/MCS/CII-6*, se obtuvo 2.5%, 5.0% y 1.7% de reducción de viabilidad a 24, 48 y 72 horas, no obstante mediante el análisis estadístico se determinó que no existen diferencias significativas al comparar los resultados de los tres tiempos de monitoreo (**Grafica 1**).



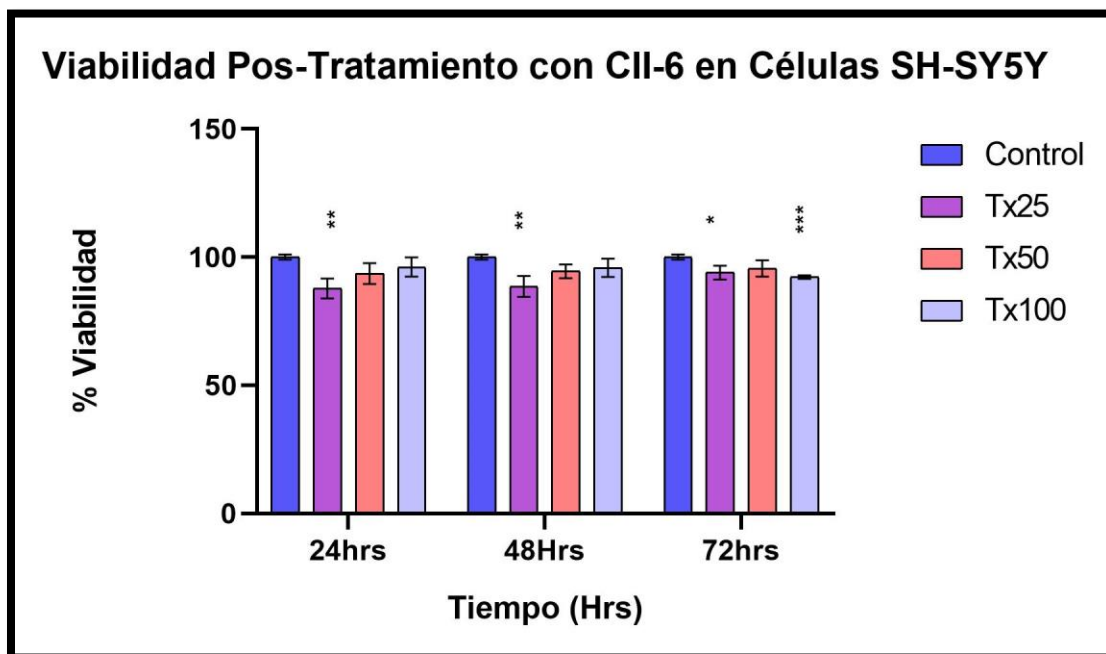
Gráfica 1. Viabilidad Pos-Transfección en células NIH/3T3

Determinación del efecto sobre la viabilidad pos-transfección en células NIH/3T3 con los grupos de tratamiento: Control (Sin tratamiento), Lipofectamine™ 2000, pDsRed2-N2 y pDream2.1/MCS/CII-6 con ensayo MTT, monitoreado durante 24, 48 y 72 horas. Las barras representan la media \pm DS de tres ensayos independientes realizados por triplicado. Las diferencias significativas indicadas se muestran en comparación con el control. NS (no significativo), * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ y *** $p < 0.0001$.

8.7.- ENSAYO DE VIABILIDAD POS-TRATAMIENTO CON CII-6 EN CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA HUMANO (SHSY-5Y)

Para determinar el efecto de la subfracción CII-6 sobre la viabilidad de la línea celular de neuroblastoma humano (SH-SY5Y), en esta etapa se aplicó como tratamiento la subfracción CII-6 a través del medio recolectado de las células productoras (NIH/3T3), el cual se denomina medio condicionado, este ensayo tuvo un tiempo de incubación de 24, 48 y 72 horas, pasado este se ejecutó un ensayo de viabilidad con el kit MTT, para ello los grupos de tratamiento fueron los siguientes: Control (Sin Tratamiento), Tx25 (Células con Tratamiento al 25%), TX50 (Células con Tratamiento al 50%), TX100 (Células con Tratamiento al 100%). De acuerdo con los resultados de las 24 horas al comparar el grupo control con los 3 grupos con tratamiento, se observa el siguiente comportamiento de reducción de viabilidad: TX25 12.22%, TX50 6.37% y TX100 3.82%, sin embargo, de acuerdo con el análisis estadístico se demostró que solo existe diferencia significativa con el tratamiento TX25 al comparar con el grupo control. Por otro lado, al observar los resultados tras pasar 48 horas y comparando el grupo control con los 3 grupos con tratamiento, se detectó una reducción de viabilidad por parte de estos grupos, obteniendo los siguientes datos: TX25 11.34%, TX50 5.45% y TX100 4.1%, y de manera similar con los resultados de 24 horas, solo el tratamiento TX25 presento

diferencias significativas al compararlo con el grupo control. Finalmente, respecto a los resultados de 72 horas, al comparar el grupo control con los 3 grupos con tratamiento, la reducción de viabilidad obtenida fue la siguiente: TX25 5.98%, TX50 4.38% y TX100 7.74%, por otro lado, se encontraron diferencias significativas en los tratamientos TX25 y TX100 al comparar los tratamientos con el grupo control (Gráfica. 2).



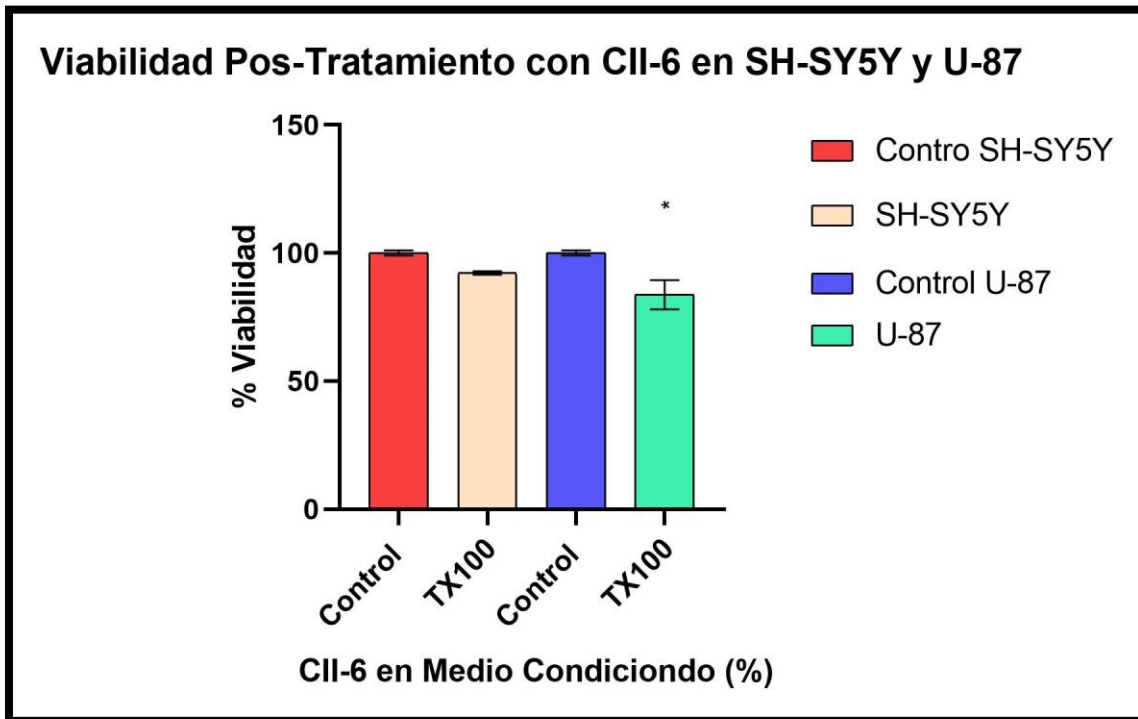
Gráfica 2. Viabilidad Pos-Tratamiento con CII-6 en células SH-SY5Y

*Determinación del efecto sobre la viabilidad pos-tratamiento con CII-6 en células SH-SY5Y con los grupos de tratamiento: Control (Sin Tratamiento), TX25-medio condicionado con CII-6 al 25%, Tx50-medio condicionado con CII-6 al 50% y TX100-medio condicionado con CII-6 al 100%, con ensayo MTT; Monitoreado durante 24, 48 y 72 horas. Las barras representan la media \pm DS de tres ensayos independientes realizados por triplicado. Las diferencias significativas indicadas se muestran en comparación con el control. NS (no significativo), * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ y *** $p < 0.0001$.*

8.8.- ENSAYO DE VIABILIDAD POS-TRATAMIENTO: COMPARACIÓN DEL EFECTO DE CII-6 EN CÉLULAS DE NERUROBLASTOMA HUMANO (SH-SY5Y) Y GLIOBLASTOMA HUMANO (U-87)

Con la finalidad de comparar el efecto inducido por parte la subfracción CII-6 en la línea celular de neuroblastoma humano (SH-SY5Y), con otra línea celular con características semejantes, específicamente en cuanto a la sobreexpresión de canales de sodio, blanco de la subfracción CII-6, esta fue aplicada en la línea celular de glioblastoma humano (U-87) durante un tiempo de incubación de 72 horas, en esta etapa de igual forma se aplicó como tratamiento la subfracción CII-6 a través del medio condicionado, pasado el tiempo se ejecutó un ensayo de viabilidad con el kit MTT, para ello los grupos de tratamiento fueron los siguientes: Control (Sin

tratamiento) y TX100 (Células con Tratamiento al 100%); De acuerdo con los resultados al finalizar el tiempo de monitoreo, al comparar el grupo control, con el grupo con tratamiento (Tx100), se observó una reducción de viabilidad en la línea celular SH-SY5Y del 7.74% sin embargo mediante el análisis estadístico se determinó que no existen diferencias significativas al comparar el grupo control con el grupo tratado. Por otro lado, con los resultados respectivos a la línea celular U:87, se obtuvo una reducción de viabilidad del 16.24% y mediante el análisis estadístico al comparar el grupo control con el grupo tratado se determinó que existen diferencias significativas (**Gráfica.3**).



Gráfica 3. Viabilidad Pos-Tratamiento con CII-6 en SH-SY5Y y U-87

*Determinación del efecto sobre la viabilidad pos-tratamiento con CII-6 en células SH-SY5Y y U-87, con los grupos de tratamiento: Control (Sin Tratamiento) y TX100-medio condicionado con CII-6 al 100%, con ensayo MTT; Monitoreado durante 72 horas. Las barras representan la media ± DS de tres ensayos independientes realizados por triplicado. Las diferencias significativas indicadas se muestran en comparación con el control. NS (no significativo), * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$.*

9.- DISCUSIÓN

De acuerdo con investigaciones recientes, el uso de veneno y/o toxinas asiladas a partir de especies de alacrán de la familia *Buthidae*, empleados como agente anticáncer, han demostrado tener la capacidad de reducir la viabilidad de una variedad de líneas celulares cancerosas, a través de los siguientes mecanismos de acción: inhibir el crecimiento al producir arresto celular, inducción de apoptosis mediante la vía intrínseca y/o extrínseca, inhibir la metástasis al bloquear canales iónicos específicos e inhibir la invasión de células de cáncer mediante la unión a un sitio específico (diferente de un canal iónico) en la membrana plasmática (Desales-Salazar *et al.*, 2020). Una de las especies de alacrán que ha tomado importancia por parte de la comunidad científica es *Centruroides limpidus*, de la cual, se ha reportado el gen CII-6 que expresa una neurotoxina con capacidad de inhibir los canales iónicos de Na⁺ activados por voltaje (NaV), estructuras que presentan una sobreexpresión en ciertos tipos de cáncer y se han asociado a la progresión de la metástasis, dentro de estos tipos de cáncer, se encuentra el neuroblastoma, el tumor sólido extracraneal más frecuente durante la infancia (Contreras-Ortiz *et al.*, 2016; Besson *et al.*, 2017; Szewczyk, 2018).

En la presente investigación fue evaluado el efecto del gen CII-6 sobre la viabilidad en la línea celular de neuroblastoma humano (SH-SY5Y), empleando el plásmido *pDream2.1/MCS/CII-6* que contiene inserto el gen CII-6, con la finalidad de realizar la producción de la subfracción CII-6, haciendo uso de la línea celular NIH/3T3 de fibroblastos embrionarios de ratón como células productoras. Inicialmente se realizó la estandarización de la transfección con el plásmido *pDsRed2-N2* el cual tiene inserto una variante del gen de la proteína de fluorescencia roja de *Discosoma* sp, fungiendo así como gen reportero visual, *pDsRed2-N2* fue usado debido a que el plásmido que contiene inserto el gen CII-6 carece de un gen reportero que nos permitiría identificar aquellas células que han sido transfectadas de forma exitosa; Bajo las condiciones propuestas para mediar la transfección con el reactivo Lipofectamine™ 2000 en la línea celular NIH/3T3, se demostró que permiten llevar a cabo el proceso de transfección de manera exitosa, ya que al monitorear los

grupos de células transfectadas con el plásmido *pDsRed2-N2* durante 24, 48 y 72 horas, mediante microscopia de fluorescencia, se observaron grupos de células expresando la proteína de fluorescencia roja, siendo las 72 horas, el tiempo donde se observan una mayor cantidad de células fluorescentes en comparación a los grupos monitoreados a 24 y 48 horas, sin embargo, también se detectó que el reactivo Lipofectamine™ 2000 en la línea celular NIH/3T3 es citotóxico, ya que el grupo de tratamiento al cual solo se le adiciono Lipofectamine™ 2000, al transcurrir las primeras 24 horas presentó una reducción de viabilidad del 6.9%, a las 48 horas 3.24% y a las 72 horas 7.62%. De acuerdo a estos datos, se decidió realizar un ajuste a los datos obtenidos de los grupos transfectados (*pDsRed2-N2* y *pDream2.1/MCS/CII-6*) al sumar el porcentaje de reducción de viabilidad para cada uno de los tres tiempos en estos, debido al efecto citotóxico que produce por si solo el reactivo en las células NIH/3T3; A partir de lo anterior, el grupo que fue transfectado con el plásmido *pDream2.1/MCS/CII-6* en la línea celular NIH/3T3 presentó una reducción de viabilidad de 2.5% a las 24 horas, 5% a las 48 horas y 1.77% a las 72 horas. Con base a estos resultados, se demuestra que la transcripción del gen CII-6 no afecta la viabilidad de células no cancerosas. Con respecto a los canales de Na⁺ Frelin *et al.*, (1982) señalan que ciertos tipos de líneas celulares de fibroblastos expresan canales de Na⁺, una de ellas es la línea celular CCL39 de fibroblastos de pulmón de hámster chino, la cual también se identificó que presenta sitios receptores para toxinas de alacrán, específicamente la Toxina II aislada de la especie *Androctonus australis*. Considerando lo anterior, se sugiere que la línea celular NIH/3T3 de fibroblastos embrionarios de ratón también expresan canales de Na⁺, y por lo tanto a pesar de que la subfracción CII-6 tiene la capacidad de bloquear los canales de Na⁺, esta no presenta un efecto sobre estos que pueda afectar el crecimiento y la estructura normal de estas células no cancerosas, lo cual podría estar relacionado con lo mencionado por Besson *et al.*, (2017), ya que mediante investigaciones electrofisiológicas, en células normales no se detectaron corrientes internas de sodio, a pesar que la proteína estaba presente. Sin embargo, a través de comparación de tinciones inmunohistoquímicas en tejidos correspondientes tumorales y no tumorales, se demostró que los canales de sodio

activados por voltaje se expresaron en tumores, no en las biopsias epiteliales normales, dicho nivel de sobreexpresión de los canales de Na⁺, en células cancerosas, está relacionado con la agresividad del tumor como es el caso de cáncer de colon, cáncer de ovario, cáncer cervical, glioma y leucemia. Considerado lo mencionado, se puede establecer que la subfracción CII-6 presenta selectividad aparente por células cancerosas ya que de acuerdo con los resultados obtenidos del ensayo de viabilidad pos-tratamiento, se determinó que la subfracción CII-6 tiene la capacidad de reducir la viabilidad de las líneas celulares de neuroblastoma (SH-SY5Y) y glioblastoma humano (U-87).

Respecto a los resultados del ensayo de viabilidad pos-tratamiento en la línea celular de neuroblastoma humano (SH-SY5Y), se determinó que el tratamiento más eficiente fue Tx25 (Medio S/T [75%] + Medio Condicionado con CII-6 [25%]) tras 24 horas de incubación, obteniendo 12.22% de reducción de viabilidad, mientras que, al comparar el comportamiento del tratamiento TX25 a 48 y 72 horas de incubación, se observa un descenso de la eficiencia del tratamiento del 11.34% y 5.98% respectivamente. Dicho comportamiento puede relacionarse con la capacidad de desplazamiento o paso de los fármacos a través de la membrana celular, este proceso puede llevarse a cabo de dos maneras (cinética de primer orden y cinética de ord en cero), debido a la naturaleza de la subfracción CII-6, se sugiere que esta emplea una cinética de orden cero, la cual implica la participación de un sistema enzimático o de transporte saturable (canales iónicos) para llevar a cabo la eliminación o paso del fármaco de un compartimiento a otro, en esta cinética la vida media de eliminación de un fármaco aumenta al incrementar la dosis o la concentración en el plasma. Sin embargo, una vez que la concentración plasmática, o en un compartimiento es más baja que la capacidad de transporte, el fármaco se elimina o desplaza mediante la cinética de primer orden, en la cual la capacidad de eliminación decrece conforme disminuye la concentración en el plasma. Tomando en cuenta lo antes mencionado, se puede establecer que debido a que el tratamiento TX25 contiene la concentración más baja de la subfracción CII-6, ésta se está eliminando de manera más lenta. Sin embargo, una vez que es eliminada conforme al tiempo transcurrido, el efecto ejercido en las células SH-SY5Y decae,

es por ello que se sugiere incluir intervalos de dosificación del tratamiento, para mantener el efecto y posiblemente mejorar la tasa de eficiencia del tratamiento sin aplicar concentraciones altas de tratamiento, ya que de acuerdo con los resultados del tratamiento TX100 (Medio Condicionado con CII-6 [100%]), este produce una reducción de viabilidad máxima del 7.74% a las 72 horas de incubación, lo cual se sugiere está relacionado a la capacidad de absorción que tienen las células SH-SY5Y a través de los canales de Na⁺, es decir que debido a que la subfracción CII-6 tiene afinidad por los canales de Na⁺, el número de receptores para la subfracción CII-6 se agota, ocasionando una saturación del sistema con altas concentraciones de la misma y finalmente produciendo que el paso de la subfracción CII-6 al interior de las células sea bloqueado y no se presente un efecto sobre la viabilidad de las células SH-SY5Y como ya se ha observado con el tratamiento TX25 en un tiempo menor (24 horas) (Sumano-López & Ocampo-Camberos, 2006).

Una vez determinado que la subfracción CII-6 tiene la capacidad de reducir la viabilidad de células cancerosas con sobreexpresión de canales de Na⁺ como es el caso de la línea celular SY-SY5Y de neuroblastoma humano, adicionalmente se llevó a cabo un ensayo comparativo con la finalidad de conocer si la reducción de viabilidad observada en la línea celular SH-SY5Y con la subfracción CII-6 se replicaba o incluso se incrementaba en otra línea celular con características semejantes, específicamente hablando de la sobreexpresión de canales de Na⁺, para ello fue seleccionada la línea celular U-87 de glioblastoma humano. En cuanto a los resultados del ensayo de viabilidad pos-tratamiento en la línea celular U-87, empleando el tratamiento TX100 (Medio Condicionado con CII-6 [100%]) en 72 horas de incubación, se obtuvo 16.24% de reducción de viabilidad y al compararlo con los resultados de la línea celular SH-SY5Y con las mismas condiciones (tipo de tratamiento [TX100] y tiempo de incubación [72 horas]), es evidente que la reducción de viabilidad (7.74%) es menor en la línea celular SH-SY5Y. Lo anterior posiblemente está relacionado con los canales de Na⁺ y sus isoformas, ya que como lo menciona Besson *et al.*, (2017) existen 9 isoformas de los canales de Na⁺, de las cuales se conoce que los glioblastoma expresan las isoformas NaV1.1, NaV1.2 y NaV1.3 y los neuroblastomas la isoforma Nav.1.5, por lo tanto se sugiere que la

diferencia en cuanto a eficiencia del tratamiento entre las líneas celulares evaluadas está asociado con la selectividad de la subfracción CII-6 por alguna isoforma en específico (Ou *et al.*, 2005; Schrey *et al.*, 2002; Hernández-Plata, 2012). Por otro lado, se conoce que los fibroblastos humanos expresan las isoforma NaV1.2 y NaV1.5, considerando que el modelo biológico empleado para la producción de la subfracción CII-6 fueron fibroblastos embrionarios de ratón en los cuales no se presentó un efecto de reducción de viabilidad semejante a las células cancerosas, es posible que de acuerdo a lo anterior, la subfracción CII-6 tenga mayor afinidad por las isoforma NaV1.1 o NaV1.3, en comparación a las isoformas NaV1.2 y NaV1.5 que también son expresadas en las líneas celulares cancerosas evaluadas. Sin embargo, se requieren de ensayos complementarios para identificar con exactitud la isoforma con la cual la subfracción CII-6 tiene mayor afinidad (Chatelier *et al.*, 2012).

10.- CONCLUSIONES

El gen CII-6, se transcribe de forma correcta al ser transfectado en la línea celular NIH/3T3 de fibroblastos embrionarios de ratón y mediante ensayos de viabilidad se determinó que no ejerce un efecto sobre la viabilidad de células no cancerosas.

En las líneas celulares de glioblastoma (U-87) y neuroblastoma (SH-SY5Y) humano la subfracción CII-6 induce un efecto de reducción de viabilidad. El tratamiento mostro una mayor eficiencia cuando se administró en una concentración del 25% con un periodo de incubación de 24 horas en la línea celular SH-SY5Y. Por otro lado, en la línea celular U-87 se observó un mayor efecto inducido por la subfracción CII-6 en comparación con el observado en la línea celular SH-SY5Y en 72 horas de incubación, administrando a una concentración del 100% la subfracción CII-6.

11.- SUGERENCIAS

Es evidente que el porcentaje de reducción de viabilidad es bajo y posiblemente está relacionado a la forma de obtención de la subfracción CII-6, por lo tanto, es necesario un ensayo de selección con antibiótico de las células transfectadas para obtener en su totalidad células que producen la subfracción CII-6, ya que mediante los ensayos realizados, a pesar de haber empleado 700,000 células, debido a que no se tiene un gen reportero inserto en el plásmido que contiene el gen CII-6, se desconoce la cantidad de células exacta que fueron transfectadas de manera exitosa y por lo tanto es posible que la población celular que expresa el gen CII-6 sea menor que la población inicial, afectando directamente a la cantidad de subfracción CII-6 obtenida en el medio condicionado recolectado al finalizar el tiempo de incubación.

Otro factor importante, es determinar mediante ensayos de viabilidad si aplicando intervalos de dosificación de la subfracción CII-6 al 25%, la reducción de viabilidad puede ser mantenida e incrementada respecto al tiempo de incubación.

Finalmente, de manera complementaria, es necesario identificar la presencia de la subfracción CII-6 en las células transfectadas, mediante la técnica Wester-Blot, con el objetivo de corroborar la traducción correcta de la misma.

12.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abbastabar, M., Kheyrollah, M., Azizian, K., Bagherlou, N., Tehrani, S. S., Maniati, M., & Karimian, A. (2018). *Multiple functions of p27 in cell cycle, apoptosis, epigenetic modification and transcriptional regulation for the control of cell growth: A double-edged sword protein*. DNA Repair, 69, 63-72. DOI: 10.1016/j.dnarep.2018.07.008
2. Aibar, S., Celano, C., Chambi, M., Estrada, S., Gandur, N., Gange, P., González, C., Gonzáles, O., Grance, G., Junin, M., Kohen, N., Molina, J., Núñez, M., Sáenz, M., Troncoso, M., Vallejos, A. (2009). *Manual de Enfermería Oncológica*. Buenos Aires: Instituto Nacional del Cancer, Modulo 1.
3. Akef, H., Kotb, N., Abo-Elmatty, D., & Salem, S. (2017). *Anti-proliferative Effects of Androctonus amoreuxi Scorpion and Cerastes cerastes Snake Venoms on Human Prostate Cancer Cells*. Journal of Cancer Prevention, 22(1), 40-46. DOI:10.15430/JCP.2017.22.1.40
4. Almaaytah, A., & Albalas, Q. (2014). *Scorpion venom peptides with no disulfide bridges: A review*. Peptides, 51, 35–45. DOI: 10.1016/j.peptides.2013.10.021.
5. Almaaytah, A., Tarazi, S., Mhaidat, N., Al-Balas, Q., & Mukattash, T. L. (2013). *Mauriporin, a Novel Cationic α -Helical Peptide with Selective Cytotoxic Activity Against Prostate Cancer Cell Lines from the Venom of the Scorpion Androctonus mauritanicus*. International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 19(4), 281–293. DOI: 10.1007/s10989-013-9350-3.
6. Al-Asmari, A.K., Islam, M., & Al-Zahrani, A.M. (2016). *In vitro analysis of the anticancer properties of scorpion venom in colorectal and breast cancer cell lines*. Oncology Letters, 11(2), 1256–1262. DOI: 10.3892/ol.2015.4036.
7. Álvarez, A. M., & Lamarre, R. (2012). *Estado del Arte: Tumores de Cresta Neural, Neuroblastoma Fisiopatología, Diagnóstico y Tratamiento*. Revista Med, 29-49.
8. Arpornsuwan, T., Sriwai, W., Jaresitthikunchai, J., Phaonakrop, N., Sritanaudomchai, H., & Roytrakul, S. (2014). *Anticancer Activities of Antimicrobial BmKn2 Peptides Against Oral and Colon Cancer Cells*. International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 20(4), 501–509.

9. Ascieto, P.A., Kirkwood, J.M., Grob, J.-J., Simeone, E., Grimaldi, A.M., Maio, M., ... Mozzillo, N. (2012). The role of BRAF V600 mutation in melanoma. *Journal of Translational Medicine*, 10(1), 85. DOI: 10.1186/1479-5876-10-85.
10. Barker, B.S., Young, G.T., Soubrane, C.H., Stephens, G.J., Stevens, E.B., Patel, M.K. (2017). *Chapter 2: Ion Channels*. Conn's Translational Neuroscience, Academic Press, 11-43. DOI: 10.1016/B978-0-12-802381-5.00002-6.
11. Bastaki, S., Irandoust, M., Ahmadi, A., Hojjat-Farsangi, M., Ambrose, P., Hallaj, S., ...Jadidi-Niaragh, F. (2020). *PD-L1/PD-1 axis as a potent therapeutic target in breast cancer*. *Life Sciences*, 247(117437). DOI: 10.1016/j.lfs.2020.117437.
12. Besson, P., Driffort, V., Bon, É., Gradek, F., Chevalier, S., & Roger, S. (2015). *How do voltage-gated sodium channels enhance migration and invasiveness in cancer cells?*, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Biomembranes*, 1848 (10), 2493-2501. DOI: 10.1016/j.bbamem.2015.04.013.
13. Brackenbury, W.J (2016). *Chapter 6 - Ion Channels in Cancer*. *Ion Channels in Health and Disease*. Academic Press, 131-163. DOI: 10.1016/B978-0-12-802002-9.00006-6.
14. Brisson, L., Driffort, V., Benoist, L., Poet, M., Counillon, L., Antelmi, E., ... Roger, S. (2013). *NaV1.5 Na⁺ channels allosterically regulate the NHE-1 exchanger and promote the activity of breast cancer cell invadopodia*. *Journal of Cell Science*, 126(21), 4835–4842. DOI:10.1242/jcs.123901.
15. Bos, P.D., Plitas, G., Rudra, D., Lee, S.Y., Rudensky, A.Y. (2013). *Transient regulatory T cell ablation deters oncogene-driven breast cancer enhances radiotherapy*. *The Journal of Experimental Medicine*, 210(11), 2435-2466. DOI: 10.1084/jem.20130762.
16. Bouree, P., Frinot Joseph, P., Fernot Joseph, P., Gil, R.E., Fils-Aime, F., Barrera, R.R., Goyffon, M., 2005. *Les piqures de scorpion: un probleme de sante publique a Morelos (Mexique)*. *Cahiers Sante* 15, 217–223.

17. British Society for immunology (BSI). (2020). *T-cell activation*. Obtenido de: <https://www.immunology.org/public-information/bitesized-immunology/systems-and-processes/t-cell-activation> (17 de Abril de 2020).
18. British Journal of Pharmacology (BJP). (2009). *Chloride Channels*. British Journal of Pharmacology, 158 (Supl. 1), S130-S134. DOI:10.1111/j.1476-5381.2009.00503_6.x.
19. Caliskan, F., Quintero-Hernández, V., Restano-Cassulini, R., Coronas-Valderrama, F. I., Corzo, G., & Possani, L. D. (2013). *Molecular cloning and biochemical characterization of the first Na⁺-channel α -type toxin peptide (Acra4) from Androctonus crassicauda scorpion venom*. Biochimie, 95(6), 1216–1222.
20. Cascales, M., & Álvarez-Gómez, J.A. (2010). *Metaloproteinasas, matriz extracelular y cáncer*. Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia, 76(1), 59-84. Recuperado de: https://analesranf.com/wp-content/uploads/2010/76_01/7601_01.pdf.
21. Catterall, W. (2012). *Voltage-gated sodium channels at 60: structure, function and pathophysiology*. The Journal of Physiology, 590(11), 2577-2589. DOI:10.1113/jphysiol.2011.224204.
22. Catterall, W. (2014). *Structure and function of voltage-gated sodium channels at atomic resolution*. Experimental Physiology, 99(1), 35-51. DOI:10.1113/expphysiol.2013.071969.
23. Chatelier, A., Mercier, A., Tremblier, B., Thériault, O., Moubarak, M., Benamer, N., ... Faivre, J. F. (2012). *A distinct de novo expression of Na_v1.5 sodium channels in human atrial fibroblasts differentiated into myofibroblasts*. The Journal of Physiology, 590(17), 4307–4319. DOI:10.1113/jphysiol.2012.233593.
24. Chen. (2011). *Cantharidin induces G2/M phase arrest and apoptosis in human colorectal cancer colo 205 cells through inhibition of CDK1 activity and caspase-dependent signaling pathways*. International Journal of Oncology, 38(4).

25. Cohen-Inbar, O., & Zaaroor, M. (2016). *Glioblastoma multiforme targeted therapy: The Chlorotoxin story*. Journal of Clinical Neuroscience, 33, 52–58. DOI: 10.1016/j.jocn.2016.04.012
26. Contreras-Ortiz, J. M., Vázquez-Chagoyán, J.C., Martínez-Castañeda, J., Estrada-Franco, J., Aparicio-Burgos, J., Acosta-Dibarrat, J., & Barbabosa-Pliego, A. (2013). *Resistance of cervical adenocarcinoma cells (HeLa) to venom from the scorpion Centruroides limpidus limpidus*. Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases, 19(1), 20. DOI: 10.1186/1678-9199-19-20
27. Contreras-Ortiz, J.M., Espinosa-García, M.A, Rosas-Aguilar, M.C., Desales-Salazar, E., Vázquez-Chagoyán, J.C., Barbabosa-Pliego, A. (2016). *Designing, cloning and amplification of pDream2.1/MCS/CII-6 recombinant plasmid which includes a mexican scorpion Centruroides limpidus limpidus CII-6 gen*. SciForum Mol2Net. DOI: 10.3390/mol2net-02-12002
28. Cottliar, A.S & Slavutsky, I.R. (2001). Telómeros y actividad de telomerasa: su participación en el envejecimiento y el desarrollo neoplásico. *Medicina (Buenos Aires)*, 61.
29. Cuevas, C., & Covarrubias, A. (2011). Las proteínas desordenadas y su función: Una nueva forma de ver la estructura de las proteínas y la respuesta de las plantas al estrés. TIP. Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, 14(2), 97-105. Recuperado de: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-888X2011000200004&lng=es&tlng=es.
30. Desales-Salazar, E. (2016). *Evaluación del Efecto de la Viabilidad de Células de Carcinoma Hepatocelular (HuH-7) Post-Transfección con el Plásmido Recombinante pDream2.1/MCS/CII-6*. Tesis de Licenciatura. Universidad Politécnica del Valle de Toluca. División de Ingeniería en Biotecnología. Toluca, México.
31. Desales-Salazar, E., Khusro, A., Cipriano-Salazar, M., Barbabosa-Pliego, A., Rivas-Caceres, R.R. (2020). *Scorpion venoms and associated toxins as anticancer agents: update on their application and mechanism of action*. Journal of Applied Toxicology, 1-15. DOI: 10.1002/jat.3976.

32. Denac, H., Mevissen, M., & Scholtysik, G. (2000). *Structure, function and pharmacology of voltage-gated sodium channels*. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 362(6), 453–479.
33. Deshane, J., Garner, C. C., & Sontheimer, H. (2002). *Chlorotoxin Inhibits Glioma Cell Invasion via Matrix Metalloproteinase-2*. *Journal of Biological Chemistry*, 278(6), 4135–4144.
34. Díaz-García, A., Morier-Díaz, L., Frión-Herrera, Y., Rodríguez-Sánchez, H., Caballero-Lorenzo, Y., Mendoza-Llanes, D., & Fraga-Castro, J. A. (2013). *In vitro anticancer effect of venom from Cuban scorpion *Rhopalurus junceus* against a panel of human cancer cell lines*. *Journal of Venom Research*, 4, 5-12.
35. Ding, J., Chua, P.-J., Bay, B.-H., & Gopalakrishnakone, P. (2014). *Scorpion venoms as a potential source of novel cancer therapeutic compounds*. *Experimental Biology and Medicine*, 239(4), 387–393.
36. Douglas, H., & Weinberg, R.A. (2011). *Hallmarks of Cancer: The Next Generation*. *Cell*, 144(5), 646-674. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
37. D'Suze, G., Rosales, A., Salazar, V., & Sevcik, C. (2010). *Apoptogenic peptides from *Tityus discrepans* scorpion venom acting against the SKBR3 breast cancer cell line*. *Toxicon*, 56(8), 1497–1505.
38. Escalona, M. P., Batista, C. V., Cassulini, R. R., Rios, M. S., Coronas, F. I., & Possani, L. D. (2014). *A proteomic analysis of the early secondary molecular effects caused by *Cn2* scorpion toxin on neuroblastoma cells*. *Journal of proteomics*, 111, 212-223.
39. Evans, E., & Staffurth, J. (2018). *Principles of cancer treatment by radiotherapy*. *Surgery (Oxford)*, 36(3), 111–116.
40. Fitzmaurice, C., Abate, D., Abbasi, N., Abbastabar, H., Abd-Allah, F., Abdel-Rahman, O., ...Abdelalim, Ahmed. (2019). *Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived with Disability, and Disability-Adjusted Life-Years for 29 Cancer Groups, 1990 to 2017: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study*. *JAMA. Oncol*; 5 (12): 1749–1768.

41. Flores-Reséndiz, D., Castellanos-Juárez, E., & Benítez-Bribiesca, L. (2009). *Las proteasas en la progresión neoplásica*. Gaceta Medica de México, 146(2), 131-142. Recuperado de: https://www.anmm.org.mx/GMM/2009/n2/49_vol_145_n2.pdf.
42. Frelin, C., Lombet, A., Vigne, P., Romey, G., & Lazdunski, M. (1982). *Properties of Na⁺ channels in fibroblasts*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 107(1), 202-208. DOI: 10.1016/0006-291X(82)91689-8.
43. Galdiero, M.R., Bonavita, E., Barajon, I., Garlanda, C., Mantovani, A., & Jaillon, S. (2013). *Tumor associated macrophages and neutrophils in cancer*. Immunobiology, 218(11), 1402-1410. DOI: 10.1016/j.imbio.2013.06.003.
44. GLOBOCAN. (2018). *Globocan: International Agency for Research on Cancer*. Obtenido de <http://globocan.iarc.fr/> (28 de Septiembre de 2018).
45. Gómez, L.M., Cañas, C & Anaya, J.M. (2005). *Receptores Fcγ y autoinmunidad*. Acta Medica Colombiana, 30(1), 27-35. Obtenido de: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-24482005000100006&lng=en&tlng=es (24 de Abril de 2020). ISSN: 0120-2448.
46. Gómez, L.J., Muñoz, A.X., Sierra, J., Román, L.M., Corredor, C. (2019). *Scorpion Venom: New promise in the treatment of cancer*. Acta Biologica Colombiana, 24(2), 213-223. DOI: 10.15446/abc.v24n2.71512.
47. González-Avila, G., González, A., Delgado, J., Gutiérrez-González, L.H. (2009). *Participación de las metaloproteinasas de matriz en la progresión del cáncer*. Revista del Instituto de Enfermedades Respiratorias, 20(4), 328-336. Recuperado de: <https://www.medigraphic.com/pdfs/iner/in-2009/in094i.pdf>.
48. González-Santillán, E., & Possani, L. D. (2018). *North American scorpion species of public health importance with a reappraisal of historical epidemiology*. Acta tropica, 187, 264-274. DOI: 10.1016/j.actatropica.2018.08.002
49. Guerra, N., Tan, Y.X., Joncker, N.T., Choy, A., Gallardo, F., Xiong, N.,... Raulet, D.H. (2008). *NKG2D-Deficient mice are defective in tumor*

- surveillance in models of spontaneous malignancy*. *Immunity*, 28(4), 571-580.
DOI: 10.1016/j.immuni.2008.02.016.
50. Gun, S.Y., Lee, S.W.L., Sieow, J.L., Wong, S.C. (2019). *Targeting immune cells for cancer therapy*. *Redox Biology*, 25:101174. DOI: 10.1016/j.redox.2019.101174.
51. Gupta, S.D., Debnath, A., Saha, A., Giri, B., Tripathi, G., Vedasiromoni, J. R., & Gomes, A. (2007). *Indian black scorpion (Heterometrus bengalensis Koch) venom induced antiproliferative and apoptogenic activity against human leukemic cell lines U937 and K562*. *Leukemia Research*, 31(6), 817–825.
52. Gupta, S. D., Gomes, A., Debnath, A., Saha, A., & Gomes, A. (2010). *Apoptosis induction in human leukemic cells by a novel protein Bengalin, isolated from Indian black scorpion venom: Through mitochondrial pathway and inhibition of heat shock proteins*. *Chemico-Biological Interactions*, 183(2), 293–303.
53. Hackett, J. A., Feldser, D. M., & Greider, C. W. (2001). *Telomere Dysfunction Increases Mutation Rate and Genomic Instability*. *Cell*, 106(3), 275–286.
54. Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). *Hallmarks of Cancer: The Next Generation*. *Cell*, 144(5), 646–674.
55. Harrington, J. K. (2016). *The Biology of Cancer*. *Medicine*, 44(1), 1-5.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.mpmed.2015.10.005>.
56. Hernández, O., Casado, I., Iglesias, E., Ramírez, A., del Risco, J., & Rodríguez, A. (2009). *In vitro toxicity assessment caused by Rophalurus junceus scorpion poison through a cellular assay*. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 28(1), 1-11. Recuperado de: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03002009000100006&lng=es&tlng=en.
57. Hernández-Plata, E. (2012). *Papel de los canales de sodio activados por voltaje en la capacidad metastásica de las células cancerosas*. *Revista de Investigación Clínica*, 64 (6), 567-575. Recuperado de: <https://www.medigraphic.com/pdfs/revinvcli/nn-2012/nn126j.pdf>

58. Hirayama, M., Wei, F.-Y., Chujo, T., Oki, S., Yakita, M., Kobayashi, D., ... Tomizawa, K. (2020). *FTO Demethylates Cyclin D1 mRNA and Controls Cell-Cycle Progression*. *Cell Reports*, 31(1), 107464. DOI: 10.1016/j.celrep.2020.03.028
59. Im, D. J., & Jeong, S.-N. (2017). *Transfection of Jurkat T cells by droplet electroporation*. *Biochemical Engineering Journal*, 122, 133–140.
60. INEGI. (2018). *Intituto Nacional de Estadística y Geografía: Estadísticas a Proposito del Día Mundial contra el Cáncer*. Obtenido de http://www.beta.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2018/cancer2018_Nal.pdf (28 de Agosto de 2018).
61. Jäger, H., Dreker, T., Buck, A., Giehl, K., Gress, T., & Grissmer, S. (2004). *Blockage of intermediate-Conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels inhibit human pancreatic cancer cell growth in vitro*. *Molecular Pharmacology*, 65(3), 630-638.
62. Kale, V.P., Amin S.G., & Pandey, M.K. (2015). *Targeting ion channels for cancer therapy by repurposing the approved drugs*. *B. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Biomembranes*, 1848 (10), 2747-2755. DOI: 10.1016/j.bbamem.2015.03.034.
63. King, G. F. (2011). *Venoms as a platform for human drugs: translating toxins into therapeutics*. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 11(11), 1469–1484.
64. Khan, A.R., Hams, E., Floudas, A., Sparwasser, T., Weaver, C.T & Fallon, P.G. (2015). *PD-L1^{hi} B cells are critical regulators of humoral immunity*. *Nature Communications*, 6(1), DOI: 10.1038/ncomms6997.
65. Khusro, A., Aarti, C., Barbabosa-Pliego, A., Rivas-Cáceres, R. R., & Cipriano-Salazar, M. (2018). *Venom as therapeutic weapon to combat dreadful diseases of 21st century: A systematic review on cancer, TB, and HIV/AIDS*. *Microbial Pathogenesis*.
66. Kuang, Q., Purhonen, P., & Hebert, H. (2015). *Structure of potassium channels*. *Cellular and molecular life sciences*, 72(19), 3677–3693. DOI:10.1007/s00018-015-1948-5.

67. Kudva, A., & Modak, S. (2019). *Chapter 9: Immunotherapy for Neuroblastoma*. S.K. Ray (Ed), Neuroblastoma: Molecular Mechanisms and Therapeutic Interventions, pp 157-173. Academic Press. DOI: 10.1016/B978-0-12-812005-7.00009-6.
68. Lai, D., Visser-Grieve, S., & Yang, X. (2012). Tumour suppressor genes in chemotherapeutic drug response. *Bioscience Reports*, 32(4), 361–374. doi:10.1042/bsr20110125.
69. Lange, I., Koster, J., & Koomoa, D.-L.T. (2019). *Calcium signaling regulates fundamental processes involved in Neuroblastoma progression*. *Cell Calcium*, 82, 102052. Doi: 10.1016/j.ceca.2019.06.006.
70. Lastraioli, E., Iorio, J., & Arcangeli, A. (2015). *Ion channel expression as promising cancer biomarker*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1848(10), 2685–2702. DOI:10.1016/j.bbamem.2014.12.016.
71. Lebreton, F., Delepierre, M., Ramirez, A. N., Balderas, C., & Possani, L. D. (1995). *NMR three-dimensional structure determination of a novel crustacean toxin from the venom of the scorpion *Centruroides limpidus limpidus* Karsch*. *Toxicon*, 33(9), 1127
72. Li, S.-H., Li, J.-P., Chen, L., & Liu, J.-L. (2018). *miR-146a induces apoptosis in neuroblastoma cells by targeting BCL11A*. *Medical Hypotheses*, 117, 21-27.
73. Li, W., Li, Y., Zhao, Y., Yuan, J., & Mao, W. (2014). *Inhibition Effects of Scorpion Venom Extracts (*Buthus matensii karsch*) on the Growth of Human Breast Cancer MCF-7 cells*. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 11(5), 105. DOI: 10.4314/ajtcam.v11i5.17
74. López-Heydeck, S., Cajero-Juárez, M., Alonso-Morales, Ro., Martínez-Castañeda, J., Robles-González, J., Barbabosa-Pliego, A., Vázquez-Chagoyán, J. (2009). *Lipofection improves gene targeting efficiency in E14 TG2a mouse embryonic stem cells*. *Veterinaria México*, 40(1),85-93. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=42311566009>
75. Ma, J., Hu, Y., Guo, M., Huang, Z., Li, W., & Wu, Y. (2013). *hERG Potassium Channel Blockage by Scorpion Toxin BmKKx2 Enhances Erythroid Differentiation of Human Leukemia Cells K562*. *PloS ONE*, 8(12), e84903. DOI: 10.1371/journal.pone.0084903

76. Macian, F. (2005). *NFAT proteins: Key regulators of T-cell development and function*. Nature Reviews Immunology, 5(6), 472-484. DOI: 10.1038/nri1632
77. Martínez-Gámez, D.C., Molano-Luque, M., Mercedes-Bravo, M. (2006) *Telomerase's activity as a biomarker of progression in uterine cervical lesions*. Rev. Colombiana de Cancerología, 10(2):125-133.
78. Martínez-Bastidas, T., Romero-Castillo, R., Amarillas-Bueno, L., López-Meyer, M., Ramírez, K., Sañudo-Barajas, J., Osuna-Enciso, T., Basilio Heredia, J., Lightbourn-Rojas, L., León-Félix, J. (2017). *Proteínas G Heterotriméricas: Señalización de plantas en condiciones de estrés ambiental*. Revista Fitotecnia Mexicana, 40(2),169-180. ISSN: 0187-7380.
79. Nabi, G., Ahmad, N., Ullah, S., Dr, G., Khan, S. (2014). *Therapeutic Applications of Scorpion Venom in Cancer: Mini Review*. Journal of Biology and Life Science, 6 (1), 57-66. DOI: 10.5296/jbls.v6i1.6418.
80. NCBI. (2018). *Centruroides limpidus limpidus sodium-channel1 modifier toxin Cll6, precursor, mRNA, COMPLETE CDS*. Obtenido de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/AF491132> (21 de Septiembre de 2018).
81. Navarro Partida, J., Sandoval Rodríguez, A.S., Armendáriz Borunda, J. (2008). *Biología Molecular en Medicina*. Mensaje Bioquímico Vol. XXXII, 163.174. Recuperado de: <https://biblat.unam.mx/es/revista/mensaje-bioquimico/articulo/biologia-molecular-en-medicina>
82. Newman, E. A., Abdessalam, S., Aldrink, J. H., Austin, M., Heaton, T. E., Bruny, J., ... Madonna, M. B. (2018). *Update on neuroblastoma*. Journal of Pediatric Surgery.54 (3), 283-389. DOI:10.1016/j.jpedsurg.2018.09.004
83. Nowicki, M. O., Dmitrieva, N., Stein, A. M., Cutter, J. L., Godlewski, J., Saeki, Y., ... Lawler, S. (2008). *Lithium inhibits invasion of glioma cells; possible involvement of glycogen synthase kinase-3*. Neuro-Oncology, 10(5), 690–699. DOI:10.1215/15228517-2008-041
84. Olkhanud, P.B., Damdinsuren, B., Bodogai, M., Gress, R.E., Sen, R., Wejksza, K., ... Biragyn, A. (2011). *Tumor-Evoked Regulatory B Cells*

Promote Breast Cancer Metastasis by Converting Resting CD4⁺ T Cells to T-Regulatory Cells. *Cancer Research*, 71(10), 3505-3515. DOI: 10.1158 / 0008-5472.CAN-10-4316.

85. Olsen, M. L., Schade, S., Lyons, S. A., Amaral, M. D., & Sontheimer, H. (2003). *Expression of voltage-gated chloride channels in human glioma cells.* *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 23(13), 5572–5582. DOI:10.1523/JNEUROSCI.23-13-05572.2003
86. Ortiz, E., Gurrola, G.B., Schwartz, E.F., & Possani, L.D. (2015). *Scorpion venom components as potential candidates for drug development.* *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 93, 125-135. DOI: 10.1016/j.toxicon.2014.11.233
87. Ou, S. W., Kameyama, A., Hao, L. Y., Horiuchi, M., Minobe, E., Wang, W. Y., ... Makita, N. (2005). *Tetrodotoxin-resistant Na⁺ channels in human neuroblastoma cells are encoded by new variants of Nav1.5/SCN5A.* *The European Journal of Neuroscience*, 22(4), 793–801. DOI:10.1111/j.1460-9568.2005.04280.x
88. Pedraza-Escalona, M., & Possani, L. (2013). *Scorpion beta-toxins and voltage-gated sodium channels: Interactions and effects.* *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, 18, 572–587. DOI:10.2741/4121.
89. Ponce-Saavedra, J., Francke, O.F., Quijano-Ravell, A.F., Cortés Santillán, R. (2016). *Alacranes (Arachnida: Scorpiones) de importancia para la salud pública de México.* *Folia Entomológica Mex.* 2(3), 45-70
90. Rasmi, R. R., Sakthivel, K. M., & Guruvayoorappan, C. (2020). *NF-κB inhibitors in treatment and prevention of lung cancer.* *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 130, 110569. DOI:10.1016/j.biopha.2020.110569
91. Romero-Gutiérrez, M.T., Santibáñez-López, C.E., Jiménez-Vargas, J.M., Batista, C.V., Ortiz, E., & Possani, L.D. (2018). *Transcriptomic and Proteomic Analyses Reveal the Diversity of Venom Components from the Vaejovid Scorpion *Serradigitus gertschi*.* *Toxins (Basel)*, 10(9), 359. DOI: 10.3390/toxins10090359.

92. Rosas-Aguilar, M. C. (2016). *Efecto de la Transfección del Plásmido Recombinante pDream2.1/MCS/CII-6 sobre la viabilidad de la línea celular HELA*. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de México. Facultad de Veterinaria y Zootecnia. Toluca, México.
93. Sait, S., & Modak, S. (2017). Anti-GD2 immunotherapy for neuroblastoma. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 17(10), 889-904. DOI: 10.1080/14737140.2017.1364995
94. Sambrook, J., & Fritsch, T. M. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Segunda Edición. Editorial Spring Harbor Laboratories. New York. USA.
95. Santibáñez-López, C.E., Cid-Urbe, J.I., Batista, C.V., Ortiz, E., & Possani, L.D. (2016) *Venom Gland Transcriptomic and Proteomic Analyses of the Enigmatic Scorpion Superstitionia donensis (Scorpiones: Superstitioniidae), with Insights on the Evolution of Its Venom Components*. *Toxins (Basel)*, 8(12), 367. DOI: 10.3390/toxins8120367
96. Secretaría de Salud. (2010). *Diagnóstico y Tratamiento del Neuroblastoma en el Paciente Pediátrico*. México: CENETEC.
97. Shananeh, T.B., Molodtsov, A.K., Steinberg, S.M., Zhang, P., Torres, G.M., Mohamed, G.A., ... Turk, M.J. (2018) Oncogenic BRAFV600E governs regulatory T cell recruitment during melanoma tumorigenesis. *Cancer Research*, 78(17), 5038-5049. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-18.0365.
98. Schrey, M., Codina, C., Kraft, R., Beetz, C., Kalgg, R., Wölfl, S., & Patt, S. (2002). *Molecular characterization of voltage-gated sodium channels in human gliomas*. *NeuroReport*, 13(18), 2493–2498. DOI:10.1097/00001756-200212200-00023
99. Smith, V. & Foster, J. (2018). *High-Risk Neuroblastoma Treatment Review*. *Children*, 5(9):114. DOI: 10.3390/children5090114
100. Smith, L., Fiebig, K., Schwalbe, H., & Dobson, C. (1996). *The concept of a random coil: Residual structure in peptides and denatured proteins*. *Folding and Design*, 1(5), R95–R106. DOI:10.1016/s1359-0278(96)00046-6

101. Soroceanu, L., Manning, T. J., & Sontheimer, H. (1999). *Modulation of glioma cell migration and invasion using Cl⁻ and K⁺ ion channel blockers*. The Journal of neuroscience: The official journal of the Society for Neuroscience, 19(14), 5942–5954. DOI:10.1523/JNEUROSCI.19-14-05942.1999
102. Stroka, K. M., Jiang, H., Chen, S.-H., Tong, Z., Wirtz, D., Sun, S. X., & Konstantopoulos, K. (2014). *Water Permeation Drives Tumor Cell Migration in Confined Microenvironments*. Cell, 157(3), 611–623.
103. Strong, T.V. (2018). *Cancer Genetics and Biology*. Pediatric Cancer Genetics, 41-46.
104. Suppiramaniam, V., Bloemer, J., Reed, M., & Bhattacharya, S. (2018). 6.12- *Ion Channels*. Editor: C. McQueen, Comprehensive Toxicology (Third Edition), 6, 202-241. Auburn, Alabama, USA, Editorial: Elsevier. DOI: 10.1016/B978-0-12-801238-3.02194-2.
105. Sumano-López, H & Ocampo-Camberos, L. (2006). *Farmacología Veterinaria*. México: McGraw-Hill Interamericana.
106. Szewczyk, K. (2018). *Comparison of the human tumor metastasis gene expression level in neuroblastoma patients with MYCN amplification and 2p gain: Pilot study*. Pediatric Hematology Oncology Journal, 3(2), 48–50.
107. Tong-ngam, P., Roytrakul, S., & Sritanaudomchai, H. (2015). *BmKn-2 scorpion venom peptide for killing oral cancer cells by apoptosis*. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 16(7), 2807-11. DOI: 10.7314/apjcp.2015.16.7.2807
108. Wang, Z., Fu, W. H., Lu, X. Y., & Cai, G. X. (2011). *Effects of Buthus martensii Karsch Venom on Cell Proliferation and Cytotoxicity in Hela Cells*. Advanced Materials Research, 345, 393–398. DOI: 10.4028/www.scientific.net/amr.345.393.
109. Weir, C.J. (2020). *Ion channels, receptors, agonists and antagonists*. Anaesthesia & Intensive Care Medicine, 21(1), 62-68. DOI: 10.1016/j.mpaic.2019.10.022.
110. Zarco, N., González-Ramírez, R., González, R. O., & Segovia, J. (2012). *GAS1 induces cell death through an intrinsic apoptotic pathway*. Apoptosis:

An international Journal on Programmed Cell Death 17(6), 627-635. DOI:10.1007/s10495-011-0696-8

111. Zargan, J., Sajad, M., Umar, S., Naime, M., Ali, S., & Khan, H. A. (2011). *Scorpion (Androctonus crassicauda) venom limits growth of transformed cells (SH-SY5Y and MCF-7) by cytotoxicity and cell cycle arrest*. *Experimental and Molecular Pathology*, 91(1), 447–454.
112. Zeng, X-C., Luo, F., & Li, W-X. (2006). *Molecular dissection of venom from Chinese scorpion Mesobuthus martensii: Identification and characterization of four novel disulfide-bridged venom peptides*. *Peptides*, 27(7), 1745-1754. DOI: 10.1016/j.peptides.2006.01.012
113. Zhao, Q., Liu, Y., Zhang, Y., Meng, L., Wei, J., Wang, B., ... Wang, H. (2020). *Role and toxicity of radiation therapy in neuroblastoma patients: A literatura review*. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 149:102924. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2020.102924.

12.- ANEXOS

Received: 31 January 2020 | Revised: 1 March 2020 | Accepted: 5 March 2020
DOI: 10.1002/jat.3976



REVIEW ARTICLE

Journal of
Applied Toxicology WILEY

Scorpion venoms and associated toxins as anticancer agents: update on their application and mechanism of action

Erasto Desales-Salazar¹ | Ameer Khusro² | Moisés Cipriano-Salazar³ |
Alberto Barbabosa-Pliego¹ | Raymundo Rene Rivas-Caceres⁴

¹Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA), Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM), Toluca, Mexico

²Research Department of Plant Biology and Biotechnology, Loyola College, Nungambakkam, Chennai, Tamil Nadu, India

³Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Guerrero, Guerrero, Mexico

⁴Autonomous University of Ciudad Juárez, Ciudad Juárez, Chihuahua, Mexico

Correspondence

Moisés Cipriano-Salazar, Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Guerrero, Km. 3.5 Carretera Cd. Altamirano-Iguala, CP 40660, Cd. Altamirano, Guerrero, Mexico.
Email: cipraano@hotmail.com

Alberto Barbabosa-Pliego, Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA), Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM), Toluca, Mexico.
Email: albertobarbabosa@yahoo.com.mx

Abstract

Cancer remains one of the deadliest non-infectious diseases of the 21st century, causing millions of mortalities per year worldwide. Analyses of conventional treatments, such as radiotherapy and chemotherapy, have shown not only a lower therapeutic efficiency rate but also plethora of side-effects. Considering the desperate need to identify promising anticancer agents, researchers are in quest to design and develop new tumoricidal drugs from natural sources. Over the past few years, scorpion venoms have shown exemplary roles as pivotal anticancer agents. Scorpion venoms associated metabolites, particularly toxins demonstrated *in vitro* anticancer attributes against diversified cell lines by inhibiting the growth and progression of the cell cycle, inhibiting metastasis by blocking ion channels such as K⁺ and Cl⁻, and/or inducing apoptosis by intrinsic and extrinsic pathways. This review sheds light not only on *in vitro* anticancer properties of distinct scorpion venoms and their toxins, but also on their mechanism of action for designing and developing new therapeutic drugs in future.

KEYWORDS

anticancer agents, cancer, mechanism of action, scorpion venom, toxins

1 | INTRODUCTION

Cancer or malignancy is a group of diseases that represents the continuous proliferation of abnormal cells capable of invasion and destruction of other tissues (Aibar et al., 2009). The uncontrolled growth of abnormal cells has made this disease a global health concern for humankind. According to GLOBOCAN (2018), there were a prevalence of 43 841 302 new cases of breast, colorectal, prostate, pulmonary, thyroid, bladder, and stomach cancers worldwide in both males and females.

Consequently, chemotherapy, radiotherapy, and immunotherapy have been implemented for the treatment of cancer. Despite the fact that chemotherapy has the capacity of destroying cancer cells and effectively suppressing tumor growth in patients with cancer, a

significant proportion of tumors do not respond to treatment or later develop resistance to these chemotherapeutics (Lai, Visser Grieve, & Yang, 2012). Radiotherapy plays an integral role in the treatment of >50% of cancer cases (Evans & Staffurth, 2018). Unfortunately, there are severe side-effects (fibrosis, atrophy, vascular damage, hormonal deficiencies, infertility, and secondary malignancies) of this therapy that can be permanent, particularly in slow proliferating tissues such as kidneys, heart, and the central nervous system (CNS) (Bamett et al., 2009). In contrast, immunotherapy for cancer has shown some positive aspects by generating a tumor-specific immune response, which is capable of eliminating cancer cells selectively. Although immunotherapy has shown high efficacy for a variety of malignancies (Wilcox, Ramakrishna, & Magge, 2018), it is imperative to expand its application in humans with reduced toxicity.

Considering the adverse impact of conventional cancer treatments on human health, it is of vital importance to identify novel and effective agents from un/less exploited natural sources. Over the past few years, scorpion venoms have received considerable attention amongst the scientific community, due to the tremendous *in vitro* anticancer potency of their bioactive constituents against varied cancer cell lines (Ding, Chua, Bay, & Gopalakrishnakone, 2014).

2 | SCORPION VENOMS: PROMISING ANTICANCER AGENTS

The scorpion is one of the oldest known arthropods of kingdom Animalia. It has existed on earth for >400 million years and is widely distributed around the world. Among 1700 species described to date (Simard & Watt, 1990; Stockmann & Ythier, 2010), only the Buthidae family, with 30 species of scorpions, is considered dangerous to humans. Recently 21 species and one sub-species of medically important scorpion have been identified in Mexico and the USA. The *Centruroides* genus is the most common and widespread in Mexico (González-Santillán & Possani, 2018). Scorpion stings represent an important risk factor for human health in several countries. Annually, >1.5 million scorpion stings are registered worldwide, with an estimate of ~3000 being fatal (Chippaux, 2012). Scorpion venoms have been used in traditional therapies since antiquity in different countries, particularly in India, China, Africa, Cuba, and Spain (Díaz-García et al., 2013; González & Vallejo, 2013; Khusro, Aarti, Barbabosa-Pliego, Rivas-Cáceres, & Cipriano-Salazar, 2018; Ortiz, Gurrola, Schwartz, & Possani, 2015).

The scorpion venom is a complex mixture of neurotoxins, cardiotoxins, hemolytic toxins, antimicrobial peptides, enzymes, lipids, nucleotides, mucopolysaccharides, and biogenic amines. Neurotoxins (low-molecular-weight proteins) are considered as the main components of the venom and are responsible for the toxicity because they block or modify the function of ion channels (Escalona et al., 2014). In general, ion channels are integral membrane proteins that allow particular ions to pass through the plasma membrane. The plasma membrane acts as a barrier that separates the inner constituents of cell from the outside. The ionic concentrations inside the cell can be maintained at levels considerably different from those in the extracellular fluid, which results in the generation of an electrochemical gradient between the cytoplasm and the external medium through the plasma membrane for each species of ion. It creates an aqueous pore that becomes accessible to the ions after a conformational change in the structure of the protein, thereby opening the ion channels (Barker et al., 2017; Denac, Mevissen, & Scholtysik, 2000). The kinetics of ion channels activated by voltage are modulated by the membrane potential, while the ligand-activated ion channels are activated by the binding of a specific ligand to the ion channel (Suppiramaniam, Bloemer, Reed, & Bhattacharya, 2018).

Channels-based ion transport across the cell membrane is involved in the regulation of cancer cell survival and motility. As a matter of fact, ion transport across the cell membrane plays a

paramount role in fundamental tumor cell functions, such as cell volume regulation, migration, cell cycle progression, and cell proliferation (Turner & Sontheimer, 2014). The survival and metastasis of cancer cells rely on these functions. Several ion channels or transporters, eg, mitochondrial channels (Leanza et al., 2013), cell membrane water channels (Tie et al., 2012), Na⁺/H⁺ exchanger (Andersen, Moreira, & Pedersen, 2014), Na⁺, K⁺, Cl⁻ cotransporters (Maeno, Takahashi, & Okada, 2006), KCl cotransporters (Gagnon, 2012), Na⁺, K⁺-ATPase (Bortner, Gomez-Angelats, & Cidlowski, 2001), and multi-drug resistance (Hoffmann & Lambert, 2014); as well as several H⁺ transporters such as vacuolar H⁺-ATPases, H⁺/Cl⁻ symporters, monocarboxylate transporters, and Na⁺-dependent Cl⁻/HCO₃⁻ exchangers (Harguindey, Arranz, Wahl, Orive, & Reshkin, 2009) are involved in cell proliferation, cell death, tumor growth, and migration. In addition, intracellular ion channels expressed in several sub-cellular compartments such as the nucleus, endoplasmic reticulum, Golgi apparatus, lysosome, and mitochondria play a crucial role in cancer development and/or progression. Most of the identified oncogenic intracellular channels are located in the outer or inner mitochondrial membrane (Lang & Stourmaras, 2014).

The voltage-dependent anion channel mediates metabolic cross-talk between the mitochondria and the rest of the cell (Reddy, 2013), and plays key role in the regulation of mitochondria-mediated apoptosis. Indeed, a series of events occurring following permeability transition pore opening, including mitochondrial depolarization, generation of reactive oxygen species, release of mitochondrial Ca²⁺, and swelling of mitochondria lead to breaches in the outer mitochondrial membrane that induce the release of intermembrane proteins and promote this channel as a promising oncological target (Lang & Stourmaras, 2014). The mitochondrial calcium uniporter expression correlates with metastasis and invasiveness of breast cancer (Tang et al., 2015). Kv1.3 is a member of the Shaker family of the potassium channel (Gutman et al., 2005) and is the most expressed channel in the T lymphocytes. Kv1.3 displays an altered expression level in various cancers. The uncoupling protein family belongs to the mitochondrial anion-carrier proteins (Krauss, Zhang, & Lowell, 2005) and it is inner mitochondrial membrane protein that is ubiquitously expressed in various tumors such as breast, ovarian, bladder, esophagus, testicular, colorectal, kidney, pancreatic, lung, prostate, and leukemia (Leanza, Zoratti, Gulbins, & Szabo, 2014). The chloride intracellular channels (CLICs) are an emerging class of chloride-permeable channels involved in cancer growth. In particular, chloride intracellular channel 4 (CLIC4) is the most well-characterized member of a family of channel proteins that is highly conserved from *Caenorhabditis elegans* to humans. In general, alteration in the expression and sub-cellular localization of CLIC4 occur early in tumorigenesis. CLIC4 is emerging as a potential biomarker to monitor tumor progression and recurrence in multiple human cancers (Peruzzo, Biasutto, Szabó, & Leanza, 2016). The transient receptor potential (TRP) channel superfamily is one of the largest families of cation channels (Nilius & Owsianik, 2011). The TRP family comprises 28 members, divided into subfamilies, which are TRPC (canonical), TRPM (melastatin), TRPP (polycystin), TRPV (vanilloid), TRPML (mucolipin), and TRPA (ankyrin-like) (Nilius, 2007).

Among them, TRPM8 and TRPC1 are related to cancer development and progression. The calcium-permeable TRPM8 is located in the endoplasmic reticulum membrane and is over-expressed in several tumors (Zhang & Barritt, 2004).

Moreover, Ca^{2+} channels, K^+ channels, and Na^+ channels are of great importance for tumor growth and metastasis, and thus, these are considered as potential targets in the treatment of malignancy. Considering the importance of ion channels in the progression of cancer, Hernández-Plata (2012) demonstrated that the expression of ion channels, such as Na^+ , in cancer cells is essential for the development of the metastatic phenotype. Hence, the adhesion, mobility, and invasiveness of cancer cells can be eliminated by blocking the activity of Na^+ channels. Stroka et al. (2014) revealed that ion channels played a critical role in the pathophysiology of cancer using several mechanisms. Ca^{2+} , Na^+ , and K^+ channels are implicated in the proliferation of cancer cells by controlling and regulating several key signaling pathways of survival and membrane potential. They are also involved in the development of distinctive features of cancer, including insensitivity to the signals of anti-growth, evasion of apoptosis, unlimited replicative potential, and metastasis (Kale, Amin, & Pandey, 2015).

Scorpion venoms inhibit the growth of several kinds of cancer cell lines. However, only limited groups of toxins are responsible for anticancer characteristics via three different mechanisms: i) blocking a specific ion channel (Jäger et al., 2004), ii) inhibiting the invasion of cancer cells by binding to a specific site (different from an ion channel) in the plasma membrane (Deshane, Garner, & Sontheimer, 2002), and iii) activating intracellular pathways that induce apoptosis (Gupta, Gomes, Debnath, Saha, & Gomes, 2010).

Recent investigations have revealed pronounced activities of scorpion venoms against various cancer cell lines (Table 1). Al-Asmari, Islam, and Al-Zahrani (2016) demonstrated anticancer activity of *Androctonus crassicauda* against the HCT-8 cell line (human colorectal adenocarcinoma), which showed 98% cell death after 24 h at a concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Akef, Kotb, Abo-Elmatty, and Salem (2017) reported anticancer characteristics of *Androctonus amoreuxi* against the PC-3 cell line (human prostate adenocarcinoma), exhibiting 93% cancer cells death within 24 h at a concentration of 5.58 $\mu\text{g}/\text{mL}$. *A. amoreuxi*, at a concentration of 0.61 $\mu\text{g}/\text{mL}$ showed anticancer activity against the MCF-7 cell line (human breast adenocarcinoma) with 83.7% cancer cells death within 24 h (Salem, Shoukry, Teleb, Abdel-Daim, & Abdel-Rahman, 2016). *A. crassicauda*, at a concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ had anticancer activity against the HCT-116 cell line (human colorectal carcinoma), which showed 80% of cancer cells death (Al-Asmari et al., 2016). In another study, *A. crassicauda* at 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$, had an anticancer trait against the MDA-MB-231 cell line (human breast adenocarcinoma), with 24% of cancer cells death within 24 h (Salem et al., 2016). Díaz-García et al. (2013) reported anticancer attributes of *Rhopalurus junceus* (1 mg/mL) against the MDA-MB-468 cell line (human breast adenocarcinoma), which showed 64.5% of cancer cells death after 72 h. Al-Asmari et al. (2016) demonstrated tumoricidal property of *Androctonus bicolor* (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in the MDA-MB-231 cell line, with 63% cancer cell death after 24 h. Similarly, *Leiurus quinquestriatus* showed 63% cancer cells death

against the MDA-MB-231 after 24 h (Al-Asmari et al., 2016). Díaz-García et al. (2013) reported anticancer characteristic of *R. junceus* against the A549 cancer cell line (human lung carcinoma), with 61.5% of cancer cells death after 72 h. *Buthus martensii* Karsch was investigated for its tumoricidal attribute against the HeLa cancer cell line (uterine cervix adenocarcinoma), which exhibited 50% of cancer cells death at a dose of 34.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Wang, Fu, Lu, & Cai, 2011).

3 | SCORPION VENOM ASSOCIATED TOXINS AS CYTOTOXIC AGENTS: PRODUCTION AND ANALYSIS

Guo et al. (2013) isolated various toxins from the venom of *Tityus serrulatus*. Using TsAP-S1 fraction, 98.5% (half-maximal inhibitory concentration [IC_{50}] value: 1.5 μM) of cell mortality was obtained against the NCI-H157 (human squamous cell carcinoma) and NCI-H838 (human lung adenocarcinoma) cell lines, 97.5% (IC_{50} value: 2.8 μM) against the U-251 cell line (human glioblastoma), 91.5% against the PC-3 cell line (IC_{50} value: 2.07 μM), and 89.5% against the MCF-7 cell line (IC_{50} value: 1.7 μM). TsAP-S2 was tested against the NCI-H838, U-251, NCI-H157, PC-3, and MCF-7 cell lines, revealing 98.5% (IC_{50} value: 1.6 μM), 97.5% (IC_{50} value: 2.04 μM), 91.5% (IC_{50} : 1.6 μM), and 89.5% (IC_{50} value: 1.8 μM) of cell mortality, respectively. TsAP-1 was assessed against the HCT-H838 and NCI-H157 cell lines exhibiting 58.8% (IC_{50} value: 5.2 μM) and 55.5% (IC_{50} value: 5.9 μM) of cell mortality, respectively. Likewise, the TsAP-2 fraction was tested against the NCI-H838, U-251, PC-3, MCF-7, and NCI-H157 cell lines, revealing 97% (IC_{50} value: 1.1 μM), 96.5% (IC_{50} value: 1.5 μM), 90.5% (IC_{50} value: 1.6 μM), 85.5% (IC_{50} value: 6.3 μM), and 80% (IC_{50} value: 4.1 μM) of cells death, respectively (Table 5).

Tong-ngam, Roytrakul, and Sritanaudomchai (2015) determined the anticancer attribute of *B. martensii* Karsch venom against an oral cancer cell line with a mortality rate of 95% within 24 h. Li, Hu, Zhang, and Wei (2006) revealed a tumoricidal property of a venom fraction against the HepG2 cell line (human hepatocellular carcinoma), with a mortality rate of 91.2% with an IC_{50} value of 200 mg. As per the investigation of Almaaytah, Tarazi, Mhaidat, Al-Balas, and Mukattash (2013), the toxin Mauriporin was isolated from the venom of *Androctonus mauritanicus* and exhibited tumoricidal characteristics against the PC-3 (adenocarcinoma of human prostate), as well as LNCaP and DU 145 cell lines (carcinoma of prostate) with high mortality rates (Table 5).

Gu, Liu, Ju, Li, and Cao (2012) reported the anticancer trait of recombinant analgesic-antitumor peptide (rAGAP) toxin (isolated from the *B. martensii* Karsch venom) against the SW-480 cell line (colorectal adenocarcinoma) and reported a mortality rate of 78.8% with an IC_{50} value of 8.4 μM . Fu, Jiao, Zheng, Liang, and Hu (2014) transfected the plasmid pEGFP-N1-BmK (4.0 μg of DNA), containing the BmK CT gene (isolated from *B. martensii* Karsch) into rat glioma C6 cells. Subsequently, the therapeutic agent LiCl (50 mM), which inhibits migration and invasion in glioma cells, was added as a co-treatment, obtaining 75% cytotoxicity within 24 h. Song et al. (2012) purified

TABLE 1 Crude scorpion venoms against various cancer cell lines

Cell line	Origin/source	Types of cancer	Scorpion species	Activity period, h	Viability reduction, %	Dose	References
HCT-8	Human	Adenocarcinoma-Ileocecal Colorectal	<i>A. crassicauda</i>	24	75/98	80/100 µg/ml	Al-Asmari et al. (2016)
PC-3	Human	Adenocarcinoma-Prostate	<i>A. amoreuxi</i>	24	93	5.58 µg/ml	Akef et al. (2017)
PC-3	Human	Adenocarcinoma-Prostate	<i>A. amoreuxi</i>	24	88	3.04 µg/ml	Akef et al. (2017)
MCF-7	Human	Adenocarcinoma-Breast	<i>A. amoreuxi</i>	24	83.7	0.61 µg/ml	Salem et al. (2016)
HCT-116	Human	Carcinoma-Colorectal	<i>A. crassicauda</i>	24	50/80	50/100 µg/ml	Al-Asmari et al. (2016)
MDA-MB-231	Human	Adenocarcinoma-Breast	<i>A. crassicauda</i>	24	67-72	40/80 µg/ml	Al-Asmari et al. (2016)
MDA-MB-468	Human	Adenocarcinoma-Breast	<i>R. junceus</i>	72	64.5	1 mg/ml	Diaz-García et al. (2013)
MDA-MB-231	Human	Adenocarcinoma-Breast	<i>A. bicolor</i>	24	50/63	50/100 µg/ml	Al-Asmari et al. (2016)
MDA-MB-231	Human	Adenocarcinoma-Breast	<i>L. quinquestratus</i>	24	50/63	50/100 µg/ml	Al-Asmari et al. (2016)
A549	Human	Carcinoma-Lung	<i>R. junceus</i>	72	61.5	1 mg/ml	Diaz-García et al. (2013)
Hela	Human	Adenocarcinoma-Cervix	<i>B. martensii</i> Karsch	48	50	34.5 µg/ml	Wang et al. (2011)
MDA-MB-231	Human	Adenocarcinoma-Breast	<i>R. junceus</i>	72	47.5	1 mg/ml	Diaz-García et al. (2013)
Hep-2	Human	Adenocarcinoma-Cervix	<i>R. junceus</i>	72	47.5	1 mg/ml	Diaz-García et al. (2013)
SH-SY5Y	Human	Neuroblastoma	<i>A. crassicauda</i>	24	46	200 µg/ml	Zargan et al. (2011)
MCF-7	Human	Adenocarcinoma-Breast	<i>A. crassicauda</i>	24	43.2	200 µg/ml	Zargan et al. (2011)
NCI-H292	Human	Carcinoma-Lung	<i>R. junceus</i>	72	41.5	1 mg/ml	Diaz-García et al. (2013)
Hela	Human	Adenocarcinoma-Cervix	<i>R. junceus</i>	72	40	1 mg/ml	Diaz-García et al. (2013)
MCF-7	Human	Adenocarcinoma-Breast	<i>B. martensii</i> Karsch	24	40	800 µg/ml	Li, Xin, et al. (2014)
U-937	Human	Histiocytic lymphoma	<i>H. bengalensis</i> Koch	48	36.5	41.5 µg/ml	Gupta et al. (2007)
HT-29	Human	Adenocarcinoma-Colorectal	<i>R. junceus</i>	72	35.5	1 mg/ml	Diaz-García et al. (2013)
KYSE-510	Human	Carcinoma-Esophageal Squamous	<i>H. liangi</i>	48	34.68	34.5 µg/ml	Li et al. (2015)
SiHa	Human	Adenocarcinoma-Cervix	<i>R. junceus</i>	72	31.5	1 mg/ml	Diaz-García et al. (2013)
KYSE-510	Human	Carcinoma-Esophageal Squamous	<i>H. liangi</i>	24	30.74	100 µg/ml	Li et al. (2015)
SMMC-7721	Human	Carcinoma-Hepatocellular	<i>B. martensii</i> Karsch	24	30	800 µg/ml	Li, Li, et al. (2014)
KYSE-510	Human	Carcinoma-Esophageal Squamous	<i>H. liangi</i>	48	28.54	50 µg/ml	Li et al. (2015)
K-562	Human	Chronic myeloid leukemia	<i>H. bengalensis</i> Koch	48	27.2	88.3 µg/ml	Gupta et al. (2007)
KYSE-510	Human	Carcinoma-Esophageal Squamous	<i>H. liangi</i>	24	24.63	50 µg/ml	Li et al. (2015)
U-937	Human	Histiocytic lymphoma	<i>R. junceus</i>	72	20	1 mg/ml	Diaz-García et al. (2013)
K-562	Human	Chronic myeloid leukemia	<i>R. junceus</i>	72	15.5	1 mg/ml	Diaz-García et al. (2013)
Hela	Human	Adenocarcinoma-Cervix	<i>C. limpoidus</i> limpoidus	24	0.005	400 µg/ml	Contreras-Ortiz et al. (2013)

TABLE 2 Scorpion venoms associated toxins against various cancer cell lines

Cell line	Origin/source	Types of cancer	Scorpion species	Activity period, h	Viability reduction, %	Toxins isolated	IC ₅₀ values	References
NCI-H157	Human	Carcinoma-Squamous	<i>T. serrulatus</i>	24	98.5	TsAP-S1	1.5 μM	Guo et al. (2013)
NCI-H838	Human	Adenocarcinoma-Lung	<i>T. serrulatus</i>	24	98.5	TsAP-S1	1.5 μM	Guo et al. (2013)
NCI-H838	Human	Adenocarcinoma-Lung	<i>T. serrulatus</i>	24	98.5	TsAP-S2	1.6 μM	Guo et al. (2013)
U-251	Human	Glioblastoma	<i>T. serrulatus</i>	24	97.5	TsAP-S1	2.8 μM	Guo et al. (2013)
U-251	Human	Glioblastoma	<i>T. serrulatus</i>	24	97.5	TsAP-S2	2.04 μM	Guo et al. (2013)
NCI-H838	Human	Adenocarcinoma-Lung	<i>T. serrulatus</i>	24	97	TsAP-2	1.1 μM	Guo et al. (2013)
U-251	Human	Glioblastoma	<i>T. serrulatus</i>	24	96.5	TsAP-2	1.5 μM	Guo et al. (2013)
HSC-4	Human	Carcinoma-Oral Squamous	<i>Mesobuthus martensii</i> Karsch	24	95	BmkPr-2	29 μg/mL	Tong-ngam et al. (2015)
NCI-H157	Human	Carcinoma-Squamous	<i>T. serrulatus</i>	24	94.5	TsAP-S2	8.2 μM	Guo et al. (2013)
PC-3	Human	Adenocarcinoma-Prostate	<i>T. serrulatus</i>	24	91.5	TsAP-S1	2.07 μM	Guo et al. (2013)
PC-3	Human	Adenocarcinoma-Prostate	<i>T. serrulatus</i>	24	91.5	TsAP-S2	1.6 μM	Guo et al. (2013)
Hep G2	Human	Carcinoma-Hepatocellular	<i>B. martensii</i> Karsch	12	91.2	Fraction III	200 mg	Li et al. (2006)
PC-3	Human	Adenocarcinoma-Prostate	<i>T. serrulatus</i>	24	90.5	TsAP-2	1.3 μM	Guo et al. (2013)
MCF-7	Human	Adenocarcinoma-Breast	<i>T. serrulatus</i>	24	89.5	TsAP-S1	1.7 μM	Guo et al. (2013)
MCF-7	Human	Adenocarcinoma-Breast	<i>T. serrulatus</i>	24	89.5	TsAP-S2	1.8 μM	Guo et al. (2013)
MCF-7	Human	Adenocarcinoma-Breast	<i>T. serrulatus</i>	24	85.5	TsAP-2	6.3 μM	Guo et al. (2013)
PC-3	Human	Adenocarcinoma-Prostate	<i>A. mauritanicus</i>	24	81.5	Mauriporin	50 μM	Almaayrah et al. (2013)
LNCaP	Human	Carcinoma-Prostate	<i>A. mauritanicus</i>	24	81.5	Mauriporin	50 μM	Almaayrah et al. (2013)
DU 145	Human	Carcinoma-Prostate	<i>A. mauritanicus</i>	24	81.5	Mauriporin	50 μM	Almaayrah et al. (2013)
NCI-H157	Human	Carcinoma-Squamous	<i>T. serrulatus</i>	24	80	TsAP-2	4.1 μM	Guo et al. (2013)
SW-480	Human	Adenocarcinoma-Colorectal	<i>B. martensii</i> Karsch	24	78.8	rAGAP	18.4 μM	Gu et al. (2012)
C6	Rat	Gloma	<i>B. martensii</i> Karsch	24	75	pEGFP-N1-Bmk CT + LiCl	4.0 μg of DNA + 50 mM	Fu et al. (2014)
THP-1	Human	Acute monocytic leukemia	<i>B. martensii</i> Karsch	48	66.6	SVCIII	50 μg/mL	Song et al. (2012)
C6	Rat	Gloma	<i>B. martensii</i> Karsch	48	60.5	I-Bmk CT	2.0 mg/mL	Zhao et al. (2010)
Jurkat	Human	Acute T-cell leukemia	<i>B. martensii</i> Karsch	48	58.7	SVCIII	50 μg/mL	Song et al. (2012)
NCI-H838	Human	Adenocarcinoma-Lung	<i>T. serrulatus</i>	24	58.5	TsAP-1	5.2 μM	Guo et al. (2013)
NCI-H157	Human	Carcinoma-Squamous	<i>T. serrulatus</i>	24	55.5	TsAP-1	5.9 μM	Guo et al. (2013)
U-937	Human	Histiocytic lymphoma	<i>H. bengalensis</i> Koch	24	54.7	Bengalin	3.7 μg/mL	Gupta et al. (2010)

(Continues)

TABLE 2 (Continued)

Cell line	Origin/source	Types of cancer	Scorpion species	Activity period, h	Viability reduction, %	Toxins isolated	IC ₅₀ values	References
HSC-4	Human	Carcinoma-Squamous Oral	<i>B. maritensis</i> Karsch	24	50	BmKn2	17.26 μM	Arpomsuwan et al. (2014)
SW620	Human	Adenocarcinoma-Colorectal	<i>B. maritensis</i> Karsch	24	50	BmKn2	40 μM	Arpomsuwan et al. (2014)
MCF-7	Human	Adenocarcinoma-Breast	<i>Vaejovis mexicanus smithi</i>	24	50	VmCT1	25 μM/L	Pedron et al. (2017)
C6	Rat	Glioma	<i>L. quinquestratus</i>	24	50/40	CTX-GO + DOX	2.5/5.0 μg/mL	Wang et al. (2014)
K-562	Human	Chronic myeloid leukemia	<i>H. bengalensis</i> Koch	24	47.8	Bengalin	4.1 μg/mL	Gupta et al. (2010)
MCF-7	Human	Adenocarcinoma-Breast	<i>B. maritensis</i> Karsch	24	45	LMWSVP	N/A	Li, Xin, et al. (2014)
F98	Rat	Malignant Glioma Not Differentiated	<i>B. maritensis</i> Karsch	48	40	CTX-23	6 μM	Xu et al. (2016)
U-251	Human	Glioblastoma	<i>B. maritensis</i> Karsch	48	40	CTX-23	6 μM	Xu et al. (2016)
F11	Mouse	Neuroblastoma	<i>Centruroides noxius Hoffmann</i>	48	40	Cn2	160 nM	Escalona et al. (2014)
F98	Rat	Malignant Glioma Not Differentiated	<i>B. maritensis</i> Karsch	48	38.5	CA4	6 μM	Xu et al. (2016)
U-251	Human	Glioblastoma	<i>B. maritensis</i> Karsch	48	35.5	CA4	6 μM	Xu et al. (2016)
SMMC-7721	Human	Carcinoma-Hepatocellular	<i>B. maritensis</i> Karsch	24	34.5	LMWSVP	0.28, 0.7, 1.4, 2.8, and 5.6 μg/mL	Li, Li, et al. (2014)
U-937	Human	Histiocytic lymphoma	<i>H. bengalensis</i> Koch	24	33.3	Bengalin	3.7 μg/ml	Gupta et al. (2010)
K-562	Human	Chronic myeloid leukemia	<i>H. bengalensis</i> Koch	24	29.8	Bengalin	4.1 μg/ml	Gupta et al. (2010)
K-562	Human	Chronic myeloid leukemia	<i>B. maritensis</i> Karsch	48	20	BmKKx2	6.7 nM	Ma et al. (2013)
SK-BR-3	Human	Adenocarcinoma-Breast	<i>Tityus discrepan</i>	5	6.3	Neopladine 1	33 μM	D'Suze et al. (2010)
SK-BR-3	Human	Adenocarcinoma-Breast	<i>T. discrepan</i>	5	5.6	rNeo2a	33 μM	Olvera et al. (2016)
SK-BR-3	Human	Adenocarcinoma-Breast	<i>T. discrepan</i>	5	4.1	Neopladine 2	33 μM	D'Suze et al. (2010)
PC-3	Human	Adenocarcinoma-Prostate	<i>T. serrulatus</i>	24	0	TsAP-1	N/A	Guo et al. (2013)
MCF-7	Human	Adenocarcinoma-Breast	<i>T. serrulatus</i>	24	0	TsAP-1	N/A	Guo et al. (2013)
U-251	Human	Glioblastoma	<i>T. serrulatus</i>	24	0	TsAP-1	N/A	Guo et al. (2013)

DOX, doxorubicin; N/A, not available.

TABLE 3 Mechanisms of action of various scorpion venoms against distinct cancer cell lines

Cell line	Origin/source	Types of cancer	Scorpion species	Cell death	Mechanisms of action	References
PC-3	Human	Adenocarcinoma-Prostate	<i>A. amoreuxi</i>	Apoptosis	Negative regulation of Bcl-2	Akef et al. (2017)
MCF-7	Human	Adenocarcinoma-Breast	<i>A. amoreuxi</i>	Apoptosis	Expression of C-3	Salem et al. (2016)
A549	Human	Carcinoma-Lung	<i>R. junceus</i>	Necrosis	Expression of p53 and Bax	Díaz-García et al. (2013)
HeLa	Human	Adenocarcinoma-Cervix	<i>B. martensii</i> Karsch	Apoptosis	Positive regulation of p21	Wang et al. (2011)
Hep-2	Human	Adenocarcinoma-Cervix	<i>R. junceus</i>	Apoptosis	Overexpression of p53 and Bax	Díaz-García et al. (2013)
SH-SY5Y	Human	Neuroblastoma	<i>A. crassicauda</i>	Apoptosis	Cell arrest in S phase/production of INOS/ expression of C-3/DNA fragmentation	Zargan et al. (2011)
MCF-7	Human	Adenocarcinoma-Breast	<i>A. crassicauda</i>	Apoptosis	Cell arrest in S phase/production of INOS/ expression of C-3/DNA fragmentation	Zargan et al. (2011)
NCI-H292	Human	Carcinoma-Lung	<i>R. junceus</i>	Necrosis	Expression of p53 and Bax	Díaz-García et al. (2013)
HeLa	Human	Adenocarcinoma-Cervix	<i>R. junceus</i>	Apoptosis	Over expression of p53, Bax, C-3, and C-9	Díaz-García et al. (2013)
MCF-7	Human	Adenocarcinoma-Breast	<i>B. martensii</i> Karsch	Apoptosis	Expression of C-3, inhibition of Bcl-2, and cell arrest in G1 and S phase	Li, Xin, et al. (2014)
U-937	Human	Histiocytic lymphoma	<i>H. bergalensis</i> Koch	Apoptosis	Cell arrest in Sub-G1 phase	Gupta et al. (2007)
KYSE-510	Human	Carcinoma-Esophageal Squamous	<i>H. liangi</i>	Apoptosis	Expression of C-3 and p21	Li et al. (2015)
SiHa	Human	Adenocarcinoma-Cervix	<i>R. junceus</i>	Apoptosis	Over expression of p53, Bax, C-3, and C-9	Díaz-García et al. (2013)
KYSE-510	Human	Carcinoma-Esophageal Squamous	<i>H. liangi</i>	Apoptosis	Expression of C-3 and p21	Li et al. (2015)
SMIMC-7721	Human	Carcinoma-Hepatocellular	<i>B. martensii</i> Karsch	Apoptosis	Expression of C-3, inhibition of Bcl-2, and cell arrest in G1 and S phase	Li, Li, et al. (2014)
KYSE-510	Human	Carcinoma-Esophageal Squamous	<i>H. liangi</i>	Apoptosis	Expression of C-3 and p21	Li et al. (2015)
K-562	Human	Chronic myeloid leukemia	<i>H. bergalensis</i> Koch	Apoptosis	Cell arrest in Sub-G1 phase	Gupta et al. (2007)
KYSE-510	Human	Carcinoma-Esophageal Squamous	<i>H. liangi</i>	Apoptosis	Expression of C-3 and p21	Li et al. (2015)

INOS, inducible nitric oxide synthase.

TABLE 4 Mechanisms of action of scorpion venoms associated toxins

Cell line	Origin/ source	Type of cancer	Scorpion species	Toxin isolated	Cell death	Mechanisms of action	References
HSC-4	Human	Carcinoma-Oral Squamous	<i>B. martensii</i> Karsch	BmkN-2	Apoptosis	Expression of C-3, C-9, and Bcl-2	Tong-ngam et al. (2015)
HepG2	Human	Carcinoma-Hepatocellular	<i>B. martensii</i> Karsch	Fracción III	Apoptosis	Negative regulation of Bcl-2 and activity of C-3	Li et al. (2006)
SW-480	Human	Adenocarcinoma-Colorectal	<i>B. martensii</i> Karsch	rAGAP	Apoptosis	Expression of p27/Bax and, cell arrest in G1 phase	Gu et al. (2012)
C6	Rat	Glioma	<i>B. martensii</i> Karsch	pEGFP-N1-Bmk CT + LICI	Apoptosis	Inhibition of MMP, GSK-3, and B-Catenin	Fu et al. (2014)
THP-1	Human	Acute monocytic leukemia	<i>B. martensii</i> Karsch	SVCIll	N/A	Cell arrest in G1 phase by inhibition of NF-κB	Song et al. (2012)
C6	Rat	Glioma	<i>B. martensii</i> Karsch	I-BmkCT	N/A	Cell arrest in S and G2/M phases	Zhao et al. (2010)
Jurkat	Human	Acute T-cell leukemia	<i>B. martensii</i> Karsch	SVCIll	N/A	Cell arrest in G1 phase by inhibition of NF-κB	Song et al. (2012)
U-937	Human	Histiocytic lymphoma	<i>H. bengalensis</i> Koch	Bengalin	Apoptosis	Cell arrest in Sub-G1 phase/activity of C-3/reduction of telomerase activity	Gupta et al. (2010)
C6	Rat	Glioma	<i>L. quinquestriatus</i>	CTX-GO + DOX	N/A	Blocking of Cl ⁻ channels and MMP2- inhibition	Wang et al. (2014)
K-562	Human	Chronic myeloid leukemia	<i>H. bengalensis</i> Koch	Bengalin	Apoptosis	Cell arrest in Sub-G1 phase/activity of C-3/reduction of telomerase activity	Gupta et al. (2010)
F98	Rat	Malignant Glioma Not Differentiated	<i>B. martensii</i> Karsch	CTX-23	N/A	Blocking of Cl ⁻ channels, inhibition of angiogenesis, and cell migration	Xu et al. (2016)
U-251	Human	Glioblastoma	<i>B. martensii</i> Karsch	CTX-23	N/A	Blocking of Cl ⁻ channels, inhibition of angiogenesis, and cell migration	Xu et al. (2016)
F11	Mouse	Neuroblastoma	<i>C. noxius</i> Hoffmann	Cn2	Apoptosis	Blocking of Na channels and cell arrest in G0/G1phase	Escalona et al. (2014)
F98	Rat	Malignant Glioma Not Differentiated	<i>B. martensii</i> Karsch	CA4	N/A	Blocking of Cl ⁻ channels, inhibition of angiogenesis, and cell migration	Xu et al. (2016)
U-251	Human	Glioblastoma	<i>B. martensii</i> Karsch	CA4	N/A	Blocking of Cl ⁻ channels, inhibition of angiogenesis, and cell migration	Xu et al. (2016)
SNMC-7721	Human	Carcinoma-Hepatocellular	<i>B. martensii</i> Karsch	LMWSVP	Apoptosis	Expression of C-3 and inhibition of Bcl-2	Li, Li, et al. (2014)

TABLE 4 (Continued)

Cell line	Origin/ source	Type of cancer	Scorpion species	Toxin isolated	Cell death	Mechanisms of action	References
U-937	Human	Histiocytic lymphoma	<i>H. bengalensis</i> Koch	Bengalin	Apoptosis	Cell arrest in Sub-G1 phase/activity of C-3/reduction of telomerase activity	Gupta et al. (2010)
K-562	Human	Chronic myeloid leukemia	<i>H. bengalensis</i> Koch	Bengalin	Apoptosis	Cell arrest in Sub-G1 phase/activity of C-3/reduction of telomerase activity	Gupta et al. (2010)
K-562	Human	Chronic myeloid leukemia	<i>B. martensii</i> Karsch	BmKx2	Apoptosis	hERG potassium channel blocking	Ma et al. (2013)
SK-BR-3	Human	Adenocarcinoma-Breast	<i>Tityus discrepans</i>	Neopladine1	Apoptosis	Expression of FasL	D'Suza et al. (2010)
SK-BR-3	Human	Adenocarcinoma-Breast	<i>T. discrepans</i>	rNeo2a	Apoptosis/ Necrosis	Over expression of FasL	Olvera et al. (2016)
SK-BR-3	Human	Adenocarcinoma-Breast	<i>T. discrepans</i>	Neopladine 2	Apoptosis	Expression of FasL	D'Suza et al. (2010)

DOX, doxorubicin; N/A, not available.

SVIII toxin from *B. martensii* Karsch venom and investigated its anti-cancer potential against the THP-1 (acute monocytic leukemia) and Jurkat cell lines (acute T cell leukemia), obtaining 66.6% (IC₅₀ value: 50 µg/mL) and 58.7% (IC₅₀ value: 50 µg/mL) of cytotoxicity, respectively. Similarly, Zhao, Qiao, Zhang, and Shao (2010) utilized I-BmK CT fraction against the C6 cell line, and showed a mortality rate of 60.5% with an IC₅₀ value of 2.0 mg/mL. Gupta et al. (2010) isolated Bangalin toxin from the venom of *Heterometrus bengalensis* Koch and evaluated its anticancer characteristics against the U-937 (human histiocytic lymphoma) and K-562 cell lines (human chronic myeloid leukemia), obtaining 54.7% (IC₅₀ value: 3.7 µg/ml) and 47.8% (IC₅₀ value: 4.1 µg/ml) of cells death, respectively within 24 h. BmKn2 isolated from *B. martensii* Karsch venom had anticancer activities against the HSC-4 and SW620 (human colorectal adenocarcinoma) cell lines too (Arpornsuwan et al., 2014). VmCT1, isolated from *Vaejovis mexicanus smithi* venom had a tumoricidal property against the MCF-7 cell line and showed a 50% rate of cells death with an IC₅₀ value of 25 µM/L (Table 5).

4 | CYTOTOXICITY OF SCORPION VENOM: MECHANISM OF ACTION

Apoptosis plays a crucial role in tumoricidal properties of disparate scorpion venoms and their associated toxins. Apoptosis occurs via two mechanisms: the intrinsic and extrinsic pathways. The intrinsic pathway is related to the enhancement of the permeability of the mitochondrial membrane, thereby eliciting cytochrome c release due to the negative regulation of B cell leukemia/lymphoma 2 (Bcl2) that avoids its release and positive regulation of Bcl2-associated X (Bax), apoptosis regulator that promotes its release. Subsequently, the activation of caspase is executed, activating caspase 9 that cleaves procaspase-3 downstream and results in the activation of caspase 3 that culminates in the cytotoxicity (Gupta et al., 2010). The extrinsic pathway is stimulated by the overexpression of Fas ligand (FasL) (D'Suza, Rosales, Salazar, & Sevcik, 2010), which binds to the Fas receptor (a protein of the cytotoxicity-inducing receptors family present on the surface of the cell membrane) (Fulda, 2015; Sánchez Torres & Diosdado Vargas, 2003). The caspase 3 and 7 consist of various substrates such as poly ADP-ribose polymerase (PARP), lamin, caspase-activated DNase inhibitor (iCAD), and the protein 8-related to XK (XKr8). Caspases cleaves these substrates by modulating distinctive events of apoptosis, particularly by nuclear condensation, DNA fragmentation, membrane blisters, and phosphatidylserine exposure (McArthur & Kile, 2018).

Diverse species of scorpions' venoms affect the intrinsic pathway of apoptosis. *A. amoreuxi* regulated Bcl-2 adversely and induced the expression of caspase 3 (Li, Xiao, & Wang, 2015; Salem et al., 2016; Zargan et al., 2011), *Rhopalurus junceus* over-expressed Bax, caspase 3, and caspase 9 (Díaz-García et al., 2013). *B. martensii* Karsch expressed caspase 3 and regulated Bcl-2 negatively (Li et al., 2014). BmKn-2 expressed caspase 3 and 9, and inhibited Bcl-2 (Tong-ngam et al., 2015). Fraction III presented negative regulation of Bcl-2 and

TABLE 5 Toxins of scorpion venoms as cell growth inducers

Cell line	Origin/Source	Types of cancer	Scorpion species	Toxins isolated	Cell growth, %	References
PC-3	Human	Adenocarcinoma-Prostate	<i>A. crassicauda</i>	AcrAP1	35	Du et al. (2014)
NCI-H460	Human	Adenocarcinoma-Lung	<i>A. crassicauda</i>	AcrAP1	45	Du et al. (2014)
U-87	Human	Glioblastoma	<i>Scorpiops jendeki</i> Kovařík	pET-28a-Sj7170	75	Song et al. (2014)

caspase 3 activity (Li et al., 2006). rAGAP expressed Bax (Gu et al., 2012), Bengal activated caspase 3 (Gupta et al., 2010), and LMWSVP expressed caspase 3, as well as inhibited Bcl-2 (Li, Xin, et al., 2014) (Table 2 and 3). Neopladine 1 and 2 induced the expression of FasL (D'Suze et al., 2010), while rNeo2a over-expressed FasL (Olvera et al., 2016) (Table 2 and 3).

Another feature that was identified with the use of crude venom and toxins or isolated fractions is that they are capable of arresting the cell cycle at different phases (G0/G1, G2/M, G1/S). In the G2/M transition, the cyclin-dependent kinase 1(CDK1)/Cyclin B complex is the main regulator that leads to the progression of this phase. The presence of p21, a potent inhibitor of cyclin-dependent kinase is a key regulator that inhibits the activity of CDK1 and arrests the G2/M phase, which explains the inhibition of progression of cancer cells (Huang et al., 2011). *B. martensii* Karsh and *Heterometrus tangi* venom regulated p21 (Li et al., 2015; Wang et al., 2011). Tumor protein 53 (p53) was expressed in the presence of *R. junceus* venom too (Díaz-García et al., 2013). p53 is a protein that has the ability to induce cell cycle arrest (mainly through the activation of p21) (Labuschagne, Zani, & Vousden, 2018). During the G0/G1 transition of the cell cycle, the CDK2/Cyclin A complex is essential for its progression. The p27 protein has the potentiality to arrest cell cycle phases (Abbastabar et al., 2018; Gu et al., 2012) (Table 2).

In order to determine the capacity of the crude venom and isolated toxins to arrest the cell cycle, *A. crassicauda* induced cell cycle arrest in the S phase (Zargan et al., 2011). *B. martensii* arrested the cell cycle in the G1 and S phases (Li, Li, Zhao, Yuan, & Mao, 2014), while *H. bengalensis* arrested the cell cycle in the sub-G1 phase (Gupta et al., 2007). rAGAP and scorpion venom component III (SVCIII) induced cellular arrest in G1 phase (Gu et al., 2012; Song et al., 2012). On the other hand, Bengal and Cn2 arrested the cell cycle in sub-G1 and G0/G1 phases, respectively (Escalona et al., 2014; Gupta et al., 2010) (Table 3).

Another mechanism that induces cytotoxicity involves ion channels activation by voltage. In glioma cells, the Cl⁻ channels present in the cell membrane are up-regulated after DNA damage, thereby promoting cell survival and giving the cells an improved capacity to transport Cl⁻. The ion flux mediated by the channels can induce the osmotic flow of water through the nearby aquaporins at the edge of a migrating cell. The Na-K-Cl cotransporter 1 (NKCC1), located at the leading edge of the human glioma cell facilitates the accumulation of Cl⁻ and in turn provides an electrochemical driving force. The flow of Cl⁻ osmotically regulates the level of cytoplasmic water. It not only produces the modulation of morphological changes but also promotes metastasis (Brackenbury, 2016; Kale et al., 2015; Olsen, Schade, Lyons, Amaral, & Sontheimer, 2003; Soroceanu, Manning, &

Sontheimer, 1999). Fu et al. (2014) purified rBmkCTa toxin from *B. martensii* Karsch. It has specific affinity for binding to C6 cells of rat glioma, thereby promoting the inhibition of chlorine channels and cell proliferation. It was also found that this fraction has the ability to bind and block matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) from the extracellular matrix. The MMP-2 activation mechanism is modulated by various proteins that constitute a macromolecular complex for facilitating the migration and invasion of tumor cells (Cohen-Inbar & Zaaroor, 2016). On the other hand, the use of chlorotoxin conjugated graphene oxide (CTX-GO) fraction isolated from *L. quinquestratus* venom was evaluated in rat glioma C6 cell line (Wang, Gu, Xiao, Ye, & Xu, 2014) (Table 3).

Potassium channels are considered crucial in cancer cells. The overexpression of these channels has been linked with the characteristics of the malignant transformation such as rapid growth, loss of inhibition by cell contact, and insensitivity to anti-growth signals (Kale et al., 2015; Pardo et al., 1999). The over expression of human ether-a-go-go-related gene (hERG) channels has been studied in neoplastic hematopoietic cells (Smith et al., 2002). BmKkx2 (isolated from *B. martensii* Karsch) showed the ability to block the hERG channels and induce cell cycle in the G1 phase. It was also shown that cell differentiation occurred after treatment with BmKkx2, often accompanied by apoptosis. Leukemic cells tend to be more sensitive to the inducers of apoptosis during the differentiation process. However, apoptotic cell death was not promoted in the prior studies (Hietakangas et al., 2003; Ma et al., 2013) (Table 3).

5 | CANCER CELLS GROWTH INDUCTION BY SCORPION VENOM

Some toxins isolated from scorpion venom induce growth in cancer cells. AcrAP1 (isolated from *A. crassicauda*) tends to increase the growth rate by 35–45% in the PC-3 and NCI-H460 cancer cell lines (Du et al., 2014). In a similar manner, pET-28a-Sj7170 (isolated from *Scorpiops jendeki*) induced growth by 75% in the U-87 (human glioblastoma) cell line compared to the control group. It increased the cell population in the S phase and promoted the expression of cyclin D1 (Song et al., 2014) (Table 4).

6 | EFFECT OF SCORPION TOXINS ON EXCITABLE TISSUE DISORDERS

Scorpion venoms-associated neurotoxins have the potential to modify distinct functional traits of ion channels in excitable tissues.

Symptoms such as pain, fever, sweating, and hypertension are observed due to the massive release of neurotransmitters and repetitive neuronal depolarizations (Quintero-Hernandez, Jimenez-Vargas, Gurrola, Valdivia, & Possani, 2013). In addition, cardiac failure, pulmonary edema, and shock occur in severe cases (Aboumaad et al., 2014). The liver and kidney are also targeted by scorpion venoms. The major lesions in hepatotoxicity/nephron-toxicity being reported are edema, necrosis, hemorrhage, and inflammatory cell infiltration (Adi-Bessalem & Laraba-Djebari, 2013; Al-Harbi & Al-Hasawi, 2014). Cardiac abnormalities (sinus tachycardia, sinus bradycardia, sinoatrial, atrioventricular block, ventricular ectopic beats, and idioventricular rhythm) have been recorded after the application of scorpion venoms (e.g. *L. quinquestriatus quinquestriatus*, *Mesobuthus tumulus*, *T. serrulatus*) on experimental animals (Teixeira et al., 2001).

Scorpion venoms are also known to cause varied inflammatory disorders through complex mechanisms in various tissues. Lamraoui, Adi-Bessalem, and Laraba-Djebari (2015) examined the involvement of phospholipase A2 (PLA2) and cyclo-oxygenase (COX)-derived metabolites in hepatic and renal inflammation responses *in vivo*. Mice were envenomed with *Androctonus australis hector* scorpion venom in the absence or presence of inhibitors that can interfere with lipid inflammatory mediator synthesis, i.e., dexamethasone (PLA2 inhibitor), indomethacin (non-selective COX-1/COX-2 inhibitor), or celecoxib (selective COX-2 inhibitor). Findings showed that the venom alone induced an inflammatory response in tissues, marked by increased microvascular permeability and inflammatory cell infiltration, increases in levels of nitric oxide and lipid peroxidation, and decreases in antioxidant defense. Pre-treatment of mice with dexamethasone led to significant decrease in the inflammatory disorders in the hepatic parenchyma. Celecoxib pre-treatment showed more effectiveness against renal inflammation. Indomethacin pre-treatment slightly reduced the inflammatory disorders in the tissues. Results suggested that the induced inflammation response in the liver was mediated mainly by PLA2 activation, while the renal inflammatory process was mediated by prostaglandin formation by COX-2.

A previous study investigated the cardiotoxicity and mode of action of *A. bicolor* venom on isolated toad hearts. Direct application of scorpion venom into isolated toad hearts induced a remarkable bradycardia concomitant with a protraction in the conduction time (P–R interval). Also, a significant increase in the R-wave amplitude (ventricular contraction) was recorded after venom perfusion. Various cardiac disorders were recorded such as sinus arrhythmias, ectopic beats, and different degrees of heart blockage. The findings indicated that the venom of *A. bicolor* directly influenced the cardiac electrical activity of toads through β -adrenergic receptors (Abdel-Rahman, Aayed, Abdel-Mottaleb, Omran, & Nabil, 2015).

Paneque Peres et al. (2009) reported that the Brazilian scorpion *T. serrulatus* caused increased lung, kidney, liver, and heart inflammation, characterized by an increased density of mononuclear cells after injection in rats. They concluded that the venom leads to acute lung injury, characterized by distorted lung mechanisms and increased pulmonary inflammation. *T. serrulatus* venom also affected hemodynamics probably by a direct vasoconstrictor action, leading to

increased renal flow in mice (Severino, Pereira, Knysak, Candido, & Kwasniewski, 2009).

Studies have reported that blood glucose levels increased after envenomation, thereby resulting in hyperglycemia in animal models. This might be due to a massive release of catecholamines, increased glucagon and cortisol levels, changes in thyroid hormone levels, and changes in insulin secretion (Adi-Bessalem, Hammoudi-Triki, & Laraba-Djebari, 2008; Petricevich & Peña, 2002). The elevation of circulatory catecholamines and angiotensin resulted in intense vasoconstriction and cardiac stimulation, increased myocardial oxygen requirement, and altered myocardial perfusion and metabolism, with hyperglycemia and an increase in circulating free fatty acids (Murthy, 2000).

Nencioni, Neto, de Freitas, and Dorce (2018) summarized in detail the major findings on the impact of Brazilian scorpion venoms on the central nervous system (CNS). Most of the studies have been performed with *Tityus* spp. The authors concluded that although the central effects rarely appear in patients, they can be fatal, requiring special attention in the treatment of envenoming cases. Additionally, these scorpion toxins may be pivotal tools for CNS studies.

7 | FINAL OBSERVATIONS

Although the purpose of exploitation of purified toxins was to increase the rate of cancer cell mortality with high efficacy and affinity, they have shown a lower cytotoxicity rate as compared to the crude venoms of scorpions. It is also important to note that there is the possibility of observing no effect of scorpion venom fractions against cancer cell lines. TsAP-1 isolated from *Tityus discrepans* showed a lack of anticancer activities against the PC-3, MCF-7, and U-251 cell lines (Guo et al., 2013). Crude venoms of different scorpion species have been reported to exhibit low cytotoxicity rates against certain cancer cell lines. *R. junceus* showed 31.5%, 20%, and 25.5% cytotoxicity against the SiHa, U-937, and K562 cancer cells, respectively (Díaz-García et al., 2013). On the other hand, the crude venom of *Centruroides limpidus limpidus* showed a lack of anticancer activity against the HeLa cell line (Contreras-Ortiz et al., 2013) (Table 5).

8 | CONCLUSIONS AND FUTURE PERSPECTIVES

In recent years, cancer has become one of the main public health problems, keeping the world population in a constant state of alert. Based on recent statistics, chemotherapy and radiotherapy are no longer effective and produce resistance in cancer cells. Scorpion venoms have shown exemplary cytotoxic activities against various cancer cell lines through the induction of apoptosis. In addition, venoms have revealed a unique potential to block ion channels in cancer cells, which lead to the inhibition of distinct characteristics. Venoms and their toxins are known to induce cell cycle arrest at early stages in the

G1, G2, and S phases, thereby avoiding the uncontrolled proliferation of cancer cells.

Despite a plethora of *in vitro* reports revealing the anticancer attributes of scorpion venoms against diversified cell lines, the usefulness of these toxins as promising tumoricidal agents is limited. Further, in depth *in vivo* research is essential to explore the anticancer attributes of scorpion venoms against a wide array of cancer cell lines using appropriate model organisms, which can undoubtedly set a robust foundation and open a new door for the scientific communities towards cancer treatment in future. Most importantly, scorpion toxin-associated anticancer drugs can be designed and commercialized only after obtaining zero toxicity in normal human cells during clinical trial phases.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no competing interests

REFERENCES

- Abbastabar, M., Kheyrollah, M., Azizian, K., Bagherlou, N., Tehrani, S. S., Maniati, M., & Karimian, A. (2018). Multiple functions of p27 in cell cycle, apoptosis, epigenetic modification and transcriptional regulation for the control of cell growth: A double-edged sword protein. *DNA Repair*, 69, 63–72. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2018.07.008>
- Salem, M. L., Shoukry, N. M., Teleb, W. K., Abdel-Daim, M. M., & Abdel-Rahman, M. A. (2016). *In vitro* and *in vivo* antitumor effects of the Egyptian scorpion *Androctonus amoreuxi* venom in an Ehrlich ascites tumor model. *Springerplus*, 5, 1. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-2269-3-12>
- Abdel-Rahman, M. A., Aayed, A. S., Abdel-Mottaleb, Y., Omran, M. A. A., & Nabil, Z. I. (2015). Cardiac disorders and mode of action of the Egyptian scorpion venom *Androctonus bicolor* on isolated toad's heart. *Journal of Basic and Applied Zoology*, 72, 137–144. <https://doi.org/10.1016/j.jjobaz.2015.09.003>
- Aboumaad, B., Tiger, A., Khattabi, A., Soulaymani, R., Lahssaini, M., Benhassain, S. M., & Iba, N. (2014). Cardiac involvement and its complications about three cases of severe scorpion envenomation. *Toxicon*, 78, 78–82. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.11.016>
- Adi-Bessalem, S., Hammoudi-Triki, D., & Laraba-Djebari, F. (2008). Pathophysiological effects of *Androctonus australis hector* scorpion venom: tissue damages and inflammatory response. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 60, 373–380. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2008.03.006>
- Adi-Bessalem, S., & Laraba-Djebari, F. (2013). Lipid-derived inflammatory mediators: their role in pathogenesis of scorpion envenomation. *Toxicon*, 75, 205–223. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.08.039>
- Aibar, S., Celano, C., Chambi, M., Estrada, S., Gandur, N., Gange, P. (2009). *Manual de Enfermería Oncológica*. Buenos Aires: Instituto Nacional del Cancer, Modulo 1.
- Akef, H., Kotb, N., Abo-Elmatty, D., & Salem, S. (2017). Anti-proliferative effects of *Androctonus amoreuxi* scorpion and *Cerastes cerastes* snake venoms on human prostate cancer cells. *Journal of Cancer Prevention*, 22, 40–46. <https://doi.org/10.15430/JCP.2017.22.1.40>
- Al-Asmari, A. K., Islam, M., & Al-Zahrani, A. M. (2016). *In vitro* analysis of the anticancer properties of scorpion venom in colorectal and breast cancer cell lines. *Oncology Letters*, 11, 1256–1262. <https://doi.org/10.3892/ol.2015.4036>
- Al-Harbi, H. A., & Al-Hasawi, Z. M. (2014). Effects of *Leurus quinquestriatus* scorpion venom on histological structure of the liver and kidney. *Global Advanced Research Journal of Environmental Science and Toxicology*, 3, 49–56.
- Almaaytah, A., Tarazi, S., Mhaidat, N., Al-Balas, Q., & Mukattash, T. L. (2013). Mauriporin, a novel cationic α -helical peptide with selective cytotoxic activity against prostate cancer cell lines from the venom of the scorpion *Androctonus mauritanicus*. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 19, 281–293. <https://doi.org/10.1007/s10989-013-9350-3>
- Andersen, A. P., Moreira, J. M. A., & Pedersen, S. F. (2014). Interactions of ion transporters and channels with cancer cell metabolism and the tumour microenvironment. *Philosophical Transactions of the Royal Society, B: Biological Sciences*, 369, 20130098. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0098>
- Arpomsuwan, T., Sriwai, W., Jaresithikunchai, J., Phaonakrop, N., Sritanaudomchai, H., & Roytrakul, S. (2014). Anticancer activities of antimicrobial bmkn2 peptides against oral and colon cancer cells. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 20, 501–509. <https://doi.org/10.1007/s10989-014-9417-9>
- Barker, B. S., Young, G. T., Soubrane, C. H., Stephens, G. J., Stevens, E. B., & Patel, M. K. (2017). Ion channels. In P. M. Conn (Ed.), *Conn's translational neuroscience* (1st ed.) (pp. 11–43). London: Elsevier Academic Press.
- Barnett, G. C., West, C. M. L., Dunning, A. M., Elliott, R. M., Coles, C. E., Pharoah, P. D. P., & Burnet, N. G. (2009). Normal tissue reactions to radiotherapy: towards tailoring treatment dose by genotype. *Nature Reviews Cancer*, 9, 134–142. <https://doi.org/10.1038/nrc2587>
- Bortner, C. D., Gomez-Angelats, M., & Cidlowski, J. A. (2001). Plasma membrane depolarization without repolarization is an early molecular event in anti-Fas-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 4304–4314. <https://doi.org/10.1074/jbc.276.4304-4314>
- Brackenbury, W. J. (2016). Ion channels in cancer. In G. S. Pitt (Ed.), *Ion channels in health and disease* (pp. 131–163). UK: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802002-9.00006-6>
- Gu, Y., Liu, S.-L., Ju, W.-Z., Li, C.-Y., & Cao, P. (2012). Analgesic-antitumor peptide induces apoptosis and inhibits the proliferation of SW480 human colon cancer cells. *Oncology Letters*, 5, 483–488. <https://doi.org/10.3892/ol.2012.1049>
- Chippaux, J. P. (2012). Emerging options for the management of scorpion stings. *Drug Design, Development and Therapy*, 6, 165–173. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S24754>
- Cohen-Inbar, O., & Zaaroor, M. (2016). Glioblastoma multiforme targeted therapy: The Chlorotoxin story. *Journal of Clinical Neuroscience*, 33, 52–58. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2016.04.012>
- Contreras-Ortiz, J. M., Vázquez-Chagoyán, J., Martínez-Castañeda, J., Estrada-Franco, J., Aparicio-Burgos, J., Acosta-Dibarrat, J., & Barbabosa-Pliego, A. (2013). Resistance of cervical adenocarcinoma cells (HeLa) to venom from the scorpion *Centruroides limpidus limpidus*. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 19, 20. <https://doi.org/10.1186/1678-9199-19-20>
- D'Suze, G., Rosales, A., Salazar, V., & Sevcik, C. (2010). Apoptogenic peptides from *Tityus discrepans* scorpion venom acting against the SKBR3 breast cancer cell line. *Toxicon*, 56, 1497–1505. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.09.008>
- Denac, H., Mevissen, M., & Scholtysik, G. (2000). Structure, function and pharmacology of voltage-gated sodium channels. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 362, 453–479. <https://doi.org/10.1007/s002100000319>
- Deshane, J., Gamer, C. C., & Sontheimer, H. (2002). Chlorotoxin inhibits glioma cell invasion via matrix metalloproteinase-2. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 4135–4144. <https://doi.org/10.1074/jbc.M205662200>
- Díaz-García, A., Morier-Díaz, L., Fríón-Herrera, Y., Rodríguez-Sánchez, H., Caballero-Lorenzo, Y., Mendoza-Llanes, D., ... Fraga-Castro, J. A. (2013). *In vitro* anticancer effect of venom from Cuban scorpion *Rhopalurus junceus* against a panel of human cancer cell lines. *Journal of Venom Research*, 4, 5–12.

- Ding, J., Chua, P.-J., Bay, B.-H., & Gopalakrishnakone, P. (2014). Scorpion venoms as a potential source of novel cancer therapeutic compounds. *Experimental Biology and Medicine*, 239, 387–393. <https://doi.org/10.1177/1535370213513991>
- Du, Q., Hou, X., Ge, L., Li, R., Zhou, M., Wang, H., ... Shaw, C. (2014). Cationicity-enhanced analogues of the antimicrobial peptides, AcrAP1 and AcrAP2, from the venom of the scorpion, *Androctonus crassicauda*, display potent growth modulation effects on human cancer cell lines. *International Journal of Biological Sciences*, 10, 1097–1107. <https://doi.org/10.7150/ijbs.9859>
- Escalona, M. P., Batista, C. V., Cassulini, R. R., Rios, M. S., Coronas, F. I., & Possani, L. D. (2014). A proteomic analysis of the early secondary molecular effects caused by Cn2 scorpion toxin on neuroblastoma cells. *Journal of Proteomics*, 111, 212–223. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.04.035>
- Evans, E., & Staffurth, J. (2018). Principles of cancer treatment by radiotherapy. *Surgery*, 36, 111–116. <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2017.12.006>
- Fu, Y., Jiao, Y., Zheng, S., Liang, A., & Hu, F. (2014). Combination of lithium chloride and pEGFP-N1-BmK CT effectively decreases proliferation and migration of C6 glioma cells. *Cytotechnology*, 68, 197–202. <https://doi.org/10.1007/s10616-014-9768-2>
- Fulda, S. (2015). Targeting extrinsic apoptosis in cancer: Challenges and opportunities. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 39, 20–25. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.01.006>
- Gagnon, K. B. (2012). High-grade glioma motility reduced by genetic knockdown of KCC3. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 30, 466–476. <https://doi.org/10.1159/000339040>
- GLOBOCAN. (2018). Globocan: International Agency for Research on Cancer. Obtenido de <http://globocan.iarc.fr/> (28 de Septiembre de 2018).
- González, J. A., & Vallejo, J. R. (2013). The scorpion in Spanish folk medicine: A review of traditional remedies for stings and its use as a therapeutic resource. *Journal of Ethnopharmacology*, 146, 62–74. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.12.033>
- González-Santillán, E., & Possani, L. D. (2018). North American scorpion species of public health importance with a reappraisal of historical epidemiology. *Acta Tropica*, 187, 264–274. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.08.002>
- Gupta, S. D., Debnath, A., Saha, A., Giri, B., Tripathi, G., Vedasiromoni, J. R., ... Gomes, A. (2007). Indian black scorpion (*Heterometrus bengalensis* Koch) venom induced antiproliferative and apoptogenic activity against human leukemic cell lines U937 and K562. *Leukemia Research*, 31, 817–825. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2006.06.004>
- Gupta, S. D., Gomes, A., Debnath, A., Saha, A., & Gomes, A. (2010). Apoptosis induction in human leukemic cells by a novel protein Bengal, isolated from Indian black scorpion venom: Through mitochondrial pathway and inhibition of heat shock proteins. *Chemico-Biological Interactions*, 183, 293–303. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2009.11.006>
- Gutman, G. A., Chandry, K. G., Grissmer, S., Lazdunski, M., McKinnon, D., Pardo, L. A., ... Wang, X. (2005). International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacological Reviews*, 57, 473–508. <https://doi.org/10.1124/pr.57.4.10>
- Harguindey, S., Arranz, J. L., Wahl, M. L., Orive, G., & Reshkin, S. J. (2009). Proton transport inhibitors as potentially selective anticancer drugs. *Anticancer Research*, 29, 2127–2136.
- Hernández-Plata, E. (2012). Role of the voltage-gated sodium channels in the metastatic capacity of cancer cells. *Revista de Investigación Clínica*, 54, 567–575.
- Hietakangas, V., Poukkula, M., Heiskanen, K. M., Karvinen, J. T., Sistonen, L., & Eriksson, J. E. (2003). Erythroid differentiation sensitizes K562 leukemia cells to TRAIL-induced apoptosis by downregulation of c-FLIP. *Molecular and Cellular Biology*, 23, 1278–1291. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.4.1278-1291.2003>
- Hoffmann, E. K., & Lambert, I. H. (2014). Ion channels and transporters in the development of drug resistance in cancer cells. *Philosophical Transactions of the Royal Society, B: Biological Sciences*, 369, 20130109. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0109>
- Huang, W. W., Ko, S. W., Tsai, H. Y., Chung, J. G., Chiang, J. H., Chen, K. T., ... Yang, J. S. (2011). Cantharidin induces G2/M phase arrest and apoptosis in human colorectal cancer colo 205 cells through inhibition of CDK1 activity and caspase-dependent signaling pathways. *International Journal of Oncology*, 38, 1067–1073. <https://doi.org/10.3892/ijo.2011.922>
- Jäger, H., Dreker, T., Buck, A., Giehl, K., Gress, T., & Grissmer, S. (2004). Blockage of intermediate-Conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels inhibit human pancreatic cancer cell growth *in vitro*. *Molecular Pharmacology*, 65, 630–638. <https://doi.org/10.1124/mol.65.3.630>
- Kale, V. P., Amin, S. G., & Pandey, M. K. (2015). Targeting ion channels for cancer therapy by repurposing the approved drugs. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1848, 2747–2755. <https://doi.org/10.1016/j.bbame.2015.03.034>
- Khusro, A., Aarti, C., Barabosa-Pliego, A., Rivas-Cáceres, R. R., & Cipriano-Salazar, M. (2018). Venom as therapeutic weapon to combat dreadful diseases of 21st century: A systematic review on cancer, TB, and HIV/AIDS. *Microbial Pathogenesis*, 125, 96–107. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.09.003>
- Krauss, S., Zhang, C. Y., & Lowell, B. B. (2005). The mitochondrial uncoupling- protein homologues. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6, 248–261. <https://doi.org/10.1038/nrm1592>
- Labuschagne, C. F., Zani, F., & Vousden, K. H. (2018). Control of metabolism by p53. cancer and beyond. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1870, 32–42. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2018.06.001>
- Lai, D., Visser Grieve, S., & Yang, X. (2012). Tumour suppressor genes in chemotherapeutic drug response. *Bioscience Reports*, 32, 361–374. <https://doi.org/10.1042/BSR20110125>
- Lamraoui, A., Adi-Bessalem, S., & Laraba-Djebbari, F. (2015). Immunopathologic effects of scorpion venom on hepato-renal tissues: Involvement of lipid derived inflammatory mediators. *Experimental and Molecular Pathology*, 99, 286–296. <https://doi.org/10.1016/j.yemp.2015.07.013>
- Lang, F., & Stouraras, C. (2014). Ion channels in cancer: future perspectives and clinical potential. *Philosophical Transactions of the Royal Society, B: Biological Sciences*, 369, 20130108. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0108>
- Leanza, L., Biasutto, L., Manago, A., Gulbins, E., Zoratti, M., & Szabo, I. (2013). Intracellular ion channels and cancer. *Frontiers in Physiology*, 4, 227. <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00227>
- Leanza, L., Zoratti, M., Gulbins, E., & Szabo, I. (2014). Mitochondrial ion channels as oncological targets. *Oncogene*, 33, 5569–5581. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.578>
- Li, J. W., Hu, J., Zhang, G. R., & Wei, Z. R. (2006). Effects of anti-cancer peptide fraction III from *Buthus martensii* Karsch on apoptosis of human liver cancer cells. *Journal of Jilin University Medicine*, 32, 625–628.
- Li, Q., Xiao, K., & Wang, Z. (2015). Cytotoxic and apoptotic effects of the venom of the scorpion *Heterometrus liangi* in human KYSE-510 cells (esophageal cancer). International Conference on Mechatronics, Electronic, Industrial and Control Engineering (MEIC-15): Atlantis Press.
- Li, W., Li, Y., Zhao, Y., Yuan, J., & Mao, W. (2014). Inhibition effects of scorpion venom extracts (*Buthus matensii* karsch) on the growth of human breast cancer MCF-7 cells. *African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines*, 11, 105. <https://doi.org/10.4314/ajtcam.v11i5.17-110>

- Li, W., Xin, Y., Chen, Y., Li, X., Zhang, C., Bai, J., & Yuan, J. (2014). The anti-proliferative effects and mechanisms of low molecular weight scorpion BmK venom peptides on human hepatoma and cervical carcinoma cells in vitro. *Oncology Letters*, 8, 1581–1584. <https://doi.org/10.3892/ol.2014.2336>
- Ma, J., Hu, Y., Guo, M., Huang, Z., Li, W., & Wu, Y. (2013). hERG potassium channel blockage by scorpion toxin BmKx2 enhances erythroid differentiation of human leukemia cells K562. *PLoS One*, 8, e84903. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084903>
- Maeno, E., Takahashi, N., & Okada, Y. (2006). Dysfunction of regulatory volume increase is a key component of apoptosis. *FEBS Letters*, 580, 6513–6517. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.10.074>
- McArthur, K., & Kile, B. T. (2018). Apoptotic Caspases: Multiple or Mistaken Identities? *Trends in Cell Biology*, 28, 475–493. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.02.003>
- Murthy, K. R. K. (2000). The scorpion envenoming syndrome: a different perspective. The Physiological Basis of the Role of Insulin in Scorpion Envenoming. *Journal of Venomous Animals and Toxins*, 6, 4–51. <https://doi.org/10.1590/S0104-7930200000100002>
- Nencioni, A. L. A., Neto, E. B., de Freitas, L. A., & Dorce, V. A. C. (2018). Effects of Brazilian scorpion venoms on the central nervous system. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 24, 3. <https://doi.org/10.1186/s40409-018-0139-x>
- Nilius, B. (2007). TRP channels in disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1772, 805–812. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2007.02.002>
- Nilius, B., & Owsianik, G. (2011). The Transient Receptor Potential Family of Ion Channels. *Genome Biology*, 12, 218. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-3-218>
- Olsen, M. L., Schade, S., Lyons, S. A., Amaral, M. D., & Sontheimer, H. (2003). Expression of voltage-gated chloride channels in human glioma cells. *Journal of Neuroscience*, 23, 5572–5582. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-13-05572.2003>
- Olvera, F., Rosales, A., Olvera, A., Diaz, P., Sevcik, C., Salazar, V., ... D'Suze, G. (2016). An efficient approach to clone and express active Neopladine 2, an anticancer peptide from *Tityus discrepans* scorpion venom. *Process Biochemistry*, 51, 624–631. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.02.013>
- Ortiz, E., Gurrola, G. B., Schwartz, E. F., & Possani, L. D. (2015). Scorpion venom components as potential candidates for drug development. *Toxicon*, 93, 125–135. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.11.233>
- Paneque Peres, A. C., Nonaka, P. N., de Carvalho, P. T. C., Toyama, M. H., e Silva, C. A., de Paula Vieira, R., ... de Oliveira, L. V. (2009). Effects of *Tityus serrulatus* scorpion venom on lung mechanics and inflammation in mice. *Toxicon*, 53, 779–785. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.02.002>
- Pardo, L. A., del Camino, D., Sanchez, A., Alves, F., Bruggemann, A., Beckh, S., & Stühmer, W. (1999). Oncogenic potential of EAG K (+) channels. *EMBO Journal*, 18, 5540–5547. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.20.5540>
- Pedron, C. N., Andrade, G. P., Sato, R. H., Torres, M. D. T., Cerchiaro, G., Ribeiro, A. O., & Oliveira, V. X. Jr. (2017). Anticancer activity of VmCT1 analogs against MCF-7 cells. *Chemical Biology and Drug Design*, 91, 588–596. <https://doi.org/10.1111/cbdd.13123>
- Peruzzo, R., Biasutto, L., Szabò, I., & Leanza, L. (2016). Impact of intracellular ion channels on cancer development and progression. *European Biophysics Journal*, 45, 685–707. <https://doi.org/10.1007/s00249-016-1143-0>
- Petricevich, V. L., & Peña, C. F. (2002). The dynamics of cytokine and nitric oxide secretion in mice injected with *Tityus serrulatus* scorpion venom. *Mediators of Inflammation*, 11, 173–180. <https://doi.org/10.1080/09622935020138811>
- Quintero-Hernandez, V., Jimenez-Vargas, J. M., Gurrola, G. B., Valdivia, H. H., & Possani, L. D. (2013). Scorpion venom components that affect ion-channels function. *Toxicon*, 76, 328–342. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.07.012>
- Reddy, P. H. (2013). Is the mitochondrial outer membrane protein VDAC1 therapeutic target for Alzheimer's disease? *Biochimica et Biophysica Acta*, 1832, 67–75. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.09.003>
- Sánchez Torres, L. E., & Diosdado Vargas, F. (2003). Apoptosis: The phenomenon and its determination. Departamento de Inmunología. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 41.
- Severino, D. N., Pereira, R. L., Knysak, I., Candido, D. M., & Kwasniewski, F. H. (2009). Edematogenic activity of scorpion venoms from the *Buthidae* family and the role of platelet activating factor and nitric oxide in paw edema induced by *Tityus* venoms. *Inflammation*, 32, 57–64. <https://doi.org/10.1007/s10753-008-9102-2>
- Simard, M. J., & Watt, D. D. (1990). Venoms and toxins. In G. A. Polis (Ed.), *The biology of scorpions* (p. 414). Stanford: Stanford University Press.
- Smith, G. A. M., Tsui, H.-W., Newell, E. W., Jiang, X., Zhu, X.-P., Tsui, F. W. L., & Schlichter, L. C. (2002). Functional up-regulation of HERG K⁺ channels in neoplastic hematopoietic Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 18528–18534. <https://doi.org/10.1074/jbc.M200592200>
- Song, Y., Gong, K., Yan, H., Hong, W., Wang, L., Wu, Y., ... Cao, Z. (2014). Sj7170, a unique dual-function peptide with a specific α -chymotrypsin inhibitory activity and a potent tumor-activating effect from scorpion venom. *Journal of Biological Chemistry*, 289, 11667–11680. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.540419>
- Song, X., Zhang, G., Sun, A., Guo, J., Tian, Z., Wang, H., & Liu, Y. (2012). Scorpion venom component III inhibits cell proliferation by modulating NF- κ B activation in human leukemia cells. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 4, 146–150. <https://doi.org/10.3892/etm.2012.548>
- Soroceanu, L., Manning, T. J., & Sontheimer, H. (1999). Modulation of glioma cell migration and invasion using Cl⁻ and K⁺ ion channel blockers. *Journal of Neuroscience*, 19, 5942–5954. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-14-05942.1999>
- Stockmann, R., & Ythier, E. (2010). *Scorpions of the World*. N.A.P. Editions, Verrieres-le-Buisson.
- Stroka, K. M., Jiang, H., Chen, S.-H., Tong, Z., Wirtz, D., Sun, S. X., & Konstantopoulos, K. (2014). Water Permeation drives tumor cell migration in confined microenvironments. *Cell*, 157, 611–623. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.052>
- Suppiramaniam, V., Bloemer, J., Reed, M., & Bhattacharya, S. (2018). Ion channels. *Comprehensive Toxicology*, 6, 202–241. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.02194-2>
- Tang, S., Wang, X., Shen, Q., Yang, X., Yu, C., Cai, C., ... Zou, F. (2015). Mitochondrial Ca²⁺ uniporter is critical for store-operated Ca²⁺ entry dependent breast cancer cell migration. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 458, 186–193. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.01.092>
- Teixeira, A. L., Fontoura, B. F., Freire-Maia, L., Machado, C. R., Camargo, E. R., & Teixeira, M. M. (2001). Evidence for a direct action of *Tityus serrulatus* scorpion venom on the cardiac muscle. *Toxicon*, 39, 703–709. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(00\)00200-2](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(00)00200-2)
- Tie, L., Lu, N., Pan, X. Y., Pan, Y., An, Y., Gao, J. W., ... Li, X. J. (2012). Hypoxia-induced up-regulation of aquaporin-1 protein in prostate cancer cells in a p38-dependent manner. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 29, 269–280. <https://doi.org/10.1159/000337608>
- Tong-ngam, P., Roytrakul, S., & Sritanandomchai, H. (2015). BmKn-2 scorpion venom peptide for killing oral cancer cells by apoptosis. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 16, 2807–2811. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2015.16.7.2807>
- Turner, K. L., & Sontheimer, H. (2014). Cl⁻ and K⁺ channels and their role in primary brain tumour biology. *Philosophical Transactions of the Royal Society, B: Biological Sciences*, 369, 20130095. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0095>
- Wang, H., Gu, W., Xiao, N., Ye, L., & Xu, Q. (2014). Chlorotoxin-conjugated graphene oxide for targeted delivery of an anticancer drug.

- International Journal of Nanomedicine*, 9, 1433–1442. <https://doi.org/10.2147/IJN.S58783>
- Wang, Z., Fu, W. H., Lu, X. Y., & Cai, G. X. (2011). Effects of *Buthus martensii* karsch venom on cell proliferation and cytotoxicity in HeLa cells. *Advanced Materials Research*, 345, 393–398. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.345.393>
- Guo, X., Ma, C., Du, Q., Wei, R., Wang, L., Zhou, M., ... Shaw, C. (2013). Two peptides, TsAP-1 and TsAP-2, from the venom of the Brazilian yellow scorpion, *Tityus serrulatus*: Evaluation of their antimicrobial and anticancer activities. *Biochimie*, 95, 1784–1794. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.06.003>
- Wilcox, J. A., Ramakrishna, R., & Magge, R. (2018). Immunotherapy in glioblastoma. *World Neurosurgery*, 116, 518–528. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2018.04.020>
- Xu, T., Fan, Z., Li, W., Dietel, B., Wu, Y., & Beckmann, M. W. (2016). Identification of two novel Chlorotoxin derivatives CA4 and CTX-23 with chemotherapeutic and anti-angiogenic potential. *Scientific Reports*, 6, 19799. <https://doi.org/10.1038/srep19799>
- Zargan, J., Sajad, M., Umar, S., Naime, M., Ali, S., & Khan, H. A. (2011). Scorpion (*Androctonus crassicauda*) venom limits growth of transformed cells (SH-SY5Y and MCF-7) by cytotoxicity and cell cycle arrest. *Experimental and Molecular Pathology*, 91, 447–454. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2011.04.008>
- Zhang, L., & Barritt, G. J. (2004). Evidence that TRPM8 is an androgen dependent Ca^{2+} channel required for the survival of prostate cancer cells. *Cancer Research*, 64, 8365–8373. <https://doi.org/10.1158/0008-5472>
- Zhao, J., Qiao, W., Zhang, Y., & Shao, X. (2010). Preparation and *in vitro* evaluation of ^{131}I -BmK CT as a glioma-targeted agent. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 25, 353–359. <https://doi.org/10.1089/cbr.2009.0704>

How to cite this article: Desales-Salazar E, Khusro A, Cipriano-Salazar M, Barbabosa-Pliego A, Rivas-Caceres RR. Scorpion venoms and associated toxins as anticancer agents: update on their application and mechanism of action. *J Appl Toxicol*. 2020;1–15. <https://doi.org/10.1002/jat.3976>