



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS
Y RECURSOS NATURALES**

**RESISTENCIA DE CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA DE
CERVIX HUMANO (HeLa) AL VENENO DEL ALACRÁN
MEXICANO *Centruroides limpidus limpidus***

TESIS

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

PRESENTA:

BIOL. JOSÉ MARÍA ELOY CONTRERAS ORTIZ

El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México, 17 Mayo de 2013



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS
Y RECURSOS NATURALES**

**RESISTENCIA DE CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA DE
CERVIX HUMANO (HELA) AL VENENO DEL ALACRÁN
MEXICANO *Centruroides limpidus limpidus***

TESIS

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

PRESENTA:

BIOL. JOSÉ MARÍA ELOY CONTRERAS ORTIZ

DIRECTOR:

DR. ALBERTO BARBABOSA PLIEGO

DIRECTORES ADJUNTOS:

**DR. JUAN CARLOS VÁZQUEZ CHAGOYÁN
DR. JOSÉ SIMÓN MARTÍNEZ CASTAÑEDA**

El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México, 17 de Mayo de 2013

AGRADECIMIENTOS

A la UAEM y la Secretaría de Investigación

Por brindar un espacio académico, donde se desarrollarán habilidades y adquirieron conocimientos y donde se logró alcanzar las metas propuestas para la culminación del proyecto descrito en este documento.

A CONACYT

Por la beca proporcionada durante el periodo de estudios de maestría

A los compañeros de trabajo CIESA-UAEM

Por su apoyo brindado durante la maestría.

A mis Asesores:

PhD: Juan Carlos Vázquez Chagoyán

Dr. José Simón Martínez Castañeda

Por el apoyo brindado en todos los aspectos para la realización del proyecto y por sus consejos que fueron tan importantes.

A mi tutor Académico:

Dr. Alberto Barbabosa Pliego

Por la guía, consejo y apoyo en cada etapa del proceso del posgrado en general y que llevo a la conclusión del mismo. **GRACIAS: Dr. Tito.**

Contenido

ÍNDICE DE TABLAS, FIGURAS Y GRÁFICAS.....	- 1 -
1. ABSTRACT.....	- 2 -
2. RESUMEN.....	- 3 -
3. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	- 4 -
3.1. ALACRÁN	- 5 -
___ 3.1.1. Características generales del veneno del genero <i>Centruroides</i>	- 5 -
___ 3.1.2. Importancia de las toxinas que interactúan con los canales iónicos.....	- 5 -
___ 3.1.3 <i>Centruroides limpidus limpidus</i>	- 6 -
___ 3.2. CANCER.....	- 6 -
___ 3.2.1. Causa del cáncer.....	- 7 -
___ 3.2.2. Principales categorías de genes afectados en cáncer.....	- 8 -
___ 3.2.3. Cáncer cérvicouterino	- 8 -
___ 3.3. APOPTOSIS	- 9 -
___ 3.3.1. Apoptosis en terapia del cáncer.....	- 10 -
___ 3.3.2. Apoptosis y canales iónicos	- 11 -
4. ANTECEDENTES.....	- 13 -
5. JUSTIFICACIÓN	- 16 -
6. HIPÓTESIS.....	- 17 -
7. OBJETIVO GENERAL	- 18 -
8. MATERIAL Y MÉTODOS	- 19 -
9. RESULTADOS.....	- 22 -
10. ARTICULO ENVIADO	- 22 -
11. DISCUSIÓN GENERAL.....	- 39 -
12. CONCLUSIONES	- 42 -
13. REFERENCIAS	- 43 -
14. ANEXOS.....	- 48 -

ÍNDICE DE TABLAS, FIGURAS Y GRÁFICAS.

Tabla 1. “% de Viabilidad de Macrófagos post-tratamiento con veneno crudo de CII”.....	50
Tabla 2. “% de Viabilidad de células HeLa post-tratamiento con veneno crudo de CII”.....	50
Tabla 3. “Tiempo de muerte de ratones inculdados con veneno crudo de CII”.....	50
Tabla 4. Cuantificación de proteína Bradford.....	50
Tabla 5: “Algunos protooncogenes y genes supresores de tumores”.....	51
Figura 1. “Funciones biológicas en el desarrollo multietapa de un tumor”.....	7
Figura 2. “Esquema sobre participación de canales iónicos en apoptosis”.....	12
Figura 3. “Esquema del mecanismo de muerte inducido con veneno de alacrán”.....	14
Figura 4. “Grafica del metabolismo de MTS en células HeLa post-tratamiento, con veneno crudo de CII diluido en PBS y PBS solo”.....	48
Figura 5. “Grafica de actividad del veneno crudo de CII en ratones Balb/C “.....	48
Figura 6. “Ausencia de efecto post-tratamiento con veneno crudo de CII en células HeLa”.....	48
Figura 7. “Grafica de metabolismo de MTS en células HeLa post-tratamiento, con veneno crudo de CII”.....	49
Figura 8. “Grafica de metabolismo de MTS por macrófagos post-tratamiento, con veneno crudo de CII”.....	49
Figura 9. “Células HeLa tratadas con veneno de CII y apoptosis”.....	49
Figura 10. “Sitio de colecta del alacrán CII”.....	52
Figura 11. “ <i>Centruroides limpidus limpidus</i> ”.....	52
Figura 12. “Plancha electrificada para extracción del veneno y veneno obtenido”.....	52

1. ABSTRACT

Centruroides limpidus limpidus (CII) venom is a mixture of pharmacologically active principles. Among them, the most important are proteins of toxic character that interact selectively and specifically with different cellular targets such as ion channels. Recently, anti-cancer properties from the venom from other scorpion species were described. Scorpion venom was reported to induce cell death, inhibit proliferation and trigger the apoptotic pathway in different cancer cell lines. In this regard studies reported here evaluated the CII crude venom characteristics as possible cytotoxic agent and inducer of apoptosis on cells from human cervical adenocarcinoma (HeLa).

Recently, it has been reported the potential of some scorpion venoms as anticancer agent at inhibit the growth and induce cell death of various cancer cell lines and exert their action by three different mechanism: 1) Blocking specific ion channels, 2) by inhibition of cancer cell invasion after specific binding sites (different ion channels) on the plasma membrane and 3) by activating intracellular pathways of apoptosis.

In this paper, we evaluate the potential of the crude venom of the CII species as possible cytotoxic agent, inducer of apoptosis an inhibitor of proliferation on cells from human cervical adenocarcinoma (HeLa),

Our results have shown a high survival rate of HeLa cells when exposed to CII venom. This was observed when the cells were evaluated with viability assay and EB-AO (Bromide Ethidium/Acridine Orange) assay demonstrating absence the apoptotic effect of the venom on these cells. No evidence of chromatin condensation or DNA fragmentation was found. However, CII venom induced cell death in macrophages in a dose dependent response.

HeLa cell cultures displayed none detrimental effect after being exposed to crude CII venom. The outcome could possibly be explained by the absence of specific HeLa cells membrane targets to the molecules present in the venom of *Centruroides limpidus limpidus*. It is possible that the presence of alterations or mutations in genes that control apoptosis may be responsible for the resistance of the HeLa cells when they are exposed at crude venom *Centruroides limpidus limpidus*'s.

Thus the venom can be considered not to be a candidate for treatment of human uterine cervix papilloma cancer. So that prospective studies will be needed to determine whether, if in any other cancer cell lines the CII venom has the equivalent bioactivity similar to the one found in the venom of other scorpion species.

2. RESUMEN

El veneno crudo del alacrán mexicano *Centruroides limpidus limpidus* (CII), se compone de una mezcla de moléculas de distintos pesos moleculares, muchos de ellos bio-activos farmacológicamente.

Recientemente, se ha reportado el potencial del veneno de alacrán de otras especies como agente anti-cancerígeno al ejercer su acción por 3 diversos mecanismos: bloqueo de canales iónicos específicos, inhibición de la invasión de células cancerosas tras la unión de sitios específicos (diferente de canales iónicos) sobre la membrana plasmática y activando rutas intracelulares inductoras de apoptosis y con ello inducir muerte celular e inhibir la proliferación en distintas líneas celulares cancerosas.

En el presente trabajo, evaluamos el potencial del veneno crudo de la especie CII como posible agente citotóxico e inductor de apoptosis sobre células provenientes de adenocarcinoma de cérvix humano (Hela), nuestros resultados han evidenciado resistencia al veneno crudo con porcentajes altos de sobrevivencia de las células HeLa y no afectando su viabilidad, tras el tratamiento con veneno crudo de CII, sin embargo aplicando el mismo tratamiento sobre macrófagos, usados como células control, evidenciamos muerte celular de manera dosis dependiente con porcentajes cercanos al 34 % en células tratadas con la dosis más alta (400 µg/100 µl de medio). Además empleando la técnica Bromuro de Etidio/Naranja de Acridina (EB-AO) para demostrar el efecto apoptótico en Hela, no observamos condensación de cromatina ni fragmentación del material genético propios de la apoptosis, tal como su contraparte el control positivo, en el que empleando ciclofosfamida observamos inducción de muerte celular por apoptosis cercana al 90 %.

Nosotros demostramos que las células HeLa, no muestran ningún efecto perjudicial, después de exponerlas al veneno crudo de CII, lo cual puede ser explicado posiblemente por la ausencia de blancos específicos para las moléculas presentes en el veneno de CII en la membrana de las células cancerosas. Es posible que la presencia de alteraciones o mutaciones de los genes que controlan la apoptosis puede ser responsable de la resistencia de la célula al veneno crudo. Los hallazgos encontrados permiten asumir que el veneno crudo de CII no puede ser considerado como un candidato para el tratamiento alternativo del cáncer de cérvix, pero no se descarta como candidato para el tratamiento de otro tipo de tumor, por lo que es necesario realizar estudios prospectivos en distintas líneas celulares cancerosas, para determinar la presencia o ausencia del su posible efecto tras el tratamiento con veneno crudo de alacrán de la especie *Centruroides limpidus limpidus*.

3. INTRODUCCIÓN GENERAL

El veneno de animales ponzoñosos ha estado bajo investigación, recientemente porque los compuestos bio-activos de sus venenos muestran una amplia variedad de blancos farmacológicos, que generalmente están orientados al desarrollo de moléculas para el diagnóstico, tratamiento y cura de algunas enfermedades.

Por ejemplo, se ha empleado veneno de serpiente para la obtención de textarina (*Pseudonaja textilis*) y ecarina (*Echis carinatus*) dos toxinas usadas para tratar problemas cardiovasculares, de la misma manera se han obtenido activadores de la protrombina que se utiliza en el diagnóstico de lupus eritematoso sistémico (Kini, 2006). De la saliva de la sanguijuela *Hirudo medicinalis*, se obtiene hirudina, un inhibidor de trombina; del veneno de *Bothrops atrox* y *B. moojeni* se obtiene la batroxobina, que es el principio activo de la Defibrasa® utilizado para tratar la trombosis. El Captopril®, el anti-hipertensivo más utilizado, se deriva del veneno del *B. jararacá* y el ancrod, el principio fibrinolítico del Viprinex® que se utiliza para la isquemia lúmbica cerebral y periférica, proviene del veneno del *Agkistrodon rhodostoma* (Heinen & Gorini da Veiga, 2011).

Particularmente, en lo que respecta a los alacranes y sus venenos, se tienen reportes de que han sido empleados en la medicina tradicional de pueblos étnicos de India, China, África y Cuba desde hace mucho siglos (Gomes *et al.*, 2010), para tratar distintos padecimientos como: dolor, epilepsia (Wang & Ji, 2005), tétanos, nódulos subcutáneos, convulsiones (Gupta *et al.*, 2007) y cáncer (Omran, 2003; Heinen & Gorini da Veiga, 2011).

Generalmente a los alacranes de importancia médica, solo se les conoce por los efectos negativos que presentan tras el contacto accidental con el humano (alacranismo) (Veiga *et al.*, 2009), pudiendo incluir desde un ligero cuadro sintomático de intoxicación hasta complicaciones más severas como la muerte (Granja *et al.*, 1999). Esto es debido a que sus venenos están conformados por una diversidad molecular fisiológicamente activa (Heinen & gorini da veiga, 2011), entre los que se encuentran proteínas con diferentes pesos moleculares, (Martin-Eauclaire *et al.*, 1995; Sofer, 1995), que interactúan de manera selectiva y específica con sitios blanco en la membrana de células excitables y no excitables (Possani *et al.*, 1999). Incluso se ha reportado que ejercen acción sobre células cancerosas (Jäger *et al.*, 2004). El veneno del alacrán puede inhibir el crecimiento de varias líneas celulares cancerosas, al ejercer su acción por 3 diferentes mecanismos (D'Suze *et al.*, 2010): Bloqueo de canales iónicos específicos (Jäger *et al.*, 2004), inhibición de la capacidad de invasión de células cancerosas tras la unión a sitios específicos (diferentes de los canales iónicos) sobre la membrana plasmática (Deshane *et al.*, 2003) y activando rutas intracelulares inductoras de apoptosis (Gupta *et al.*, 2010). Con base en lo anterior, la terapia anti-cáncer es una de las principales áreas donde se estudia el potencial de péptidos procedente de estos animales.

Las terapias convencionales actuales para combatir el cáncer son la cirugía, la quimioterapia y la radioterapia. A pesar de que con estos tratamientos han salvado muchas vidas tienen problemas de eficiencia (Gomes *et al.*, 2010), además de que producen efectos colaterales no deseados, daño a tejido sano alrededor del tumor (Dyer, 1999). Adicionalmente se ha observado desarrollo de resistencia por parte de las células

cancerosas a estas terapias (Benjamin *et al.*, 1998). De ahí que surge la necesidad de búsqueda de tratamientos alternativos para el cáncer a partir de productos que ofrece la naturaleza. Entre éstos, a los investigadores ha llamado la atención el uso de moléculas biológicas presentes en el veneno de alacrán.

3.1. ALACRÁN

El alacrán es un artrópodo de la clase Arácnida del orden Scorpionidae, que surgió hace aproximadamente 500 millones de años. Característicamente presentan en la parte terminal del metasoma un telson, que se prolonga en un aguijón, con 2 glándulas productoras de veneno que aloja en su interior (Muños, 1994).

Estos organismos tienen una distribución mundial, se conocen alrededor de 1500 especies de alacranes, de entre los cuales, los más venenosos se encuentran en la India, África del Norte, Asia Menor, Trinidad y Tobago, Brasil, México y Suroeste de los Estados Unidos (Escobar *et al.*, 2002).

Taxonómicamente el Orden Scorpionida incluye a 6 familias: Scorpionidae, Diplocentridae, Chactidae, Vejovidae, Bothriurida y Buthidae los escorpiones peligrosos pertenecen a la última familia mencionada con aproximadamente 500 especies, del cual los géneros *Androctonus*, *Leiurus*, *Buthus*, *Buthotus*, y *Heterometrus* están localizados en el viejo mundo, mientras que el género *Parabuthus* lo es para África del sur, *Tytius* para Trinidad y Tobago, Brasil, Venezuela, Colombia y Argentina. Nuestro género de interés, *Centruroides*, con cerca de 30 especies esta distribuidos en la parte sur de los Estados Unidos de América, México y América Central (Possani *et al.*, 1999; Possani, 2005).

3.1.1. Características generales del veneno del genero *Centruroides*

De manera general, el veneno que producen estos organismos está constituido por mezclas de enzimas y proteínas, resultado de más de 400 millones de años de supervivencia y evolución de cada una de las especies que los producen (Tay *et al.*, 2004). Particularmente se compone de proteínas de diferentes pesos moleculares, aminoácidos libres, sales inorgánicas, nucleótidos, aminos biogénicas, lípidos, (Muñoz, 1994; Corona *et al.*, 2005), hialuronidasas, mucopolisacáridos, fosfolipasas, inhibidores de proteínas, proteínas de bajo peso molecular como la serotonina e histamina y proteínas de carácter tóxico. Estos últimos tienen interacción específica con los canales de iones y son los responsables de la sintomatología del alacranismo, sin embargo recientemente se ha reportado que son capaces de reconocer receptores de membrana de células cancerosas a los que pueden unirse específica y selectivamente (Heinen & gorini da veiga, 2011).

3.1.2. Importancia de las toxinas que interactúan con los canales iónicos.

El grupo más importante dentro de la mezcla tan compleja del veneno del alacrán es el de las toxinas, que específicamente interactúan con los canales iónicos de Na^+ , K^+ , Cl^- y Ca^{2+} de las membranas celulares, principalmente del sistema nervioso central y músculo-

esquelético en los mamíferos, insectos e incluso crustáceos y cuya afinidad varía dependiendo del tejido afectado (axones del SNC, sinaptosomas cerebrales, músculo esquelético, células endoteliales aórticas y células T linfocíticas) (Martín *et al.*, 1994).

Esta interacción de las toxinas con los canales iónicos es causante de los síntomas observados en la picadura, como son: irritabilidad, dolor en el cuerpo, sensación de cuerpo extraño en la garganta, escurrimiento nasal o lagrimeo, cambios en la frecuencia del latido cardiaco, dificultad para respirar, ataxia, náuseas, vómitos, diarrea y en los casos muy graves, convulsiones, edema pulmonar, paro cardiaco y respiratorio (Petrecevich *et al.*, 2005).

3.1.3 *Centruroides limpidus limpidus*

Es una subespecie de alacrán mexicano, el segundo en importancia médica a nivel nacional (Muños, 1994), morfológicamente presenta un tubérculo subacuelar poco desarrollado o reducido que si es visible, no es grande, ni cónico, ni está orientado hacia la punta del aguijón, como su contraparte la subespecie *Centruroides limpidus tecomanus*, que es muy similar (Ponce *et al.*, 2004) posee 4 líneas oscuras en el dorso del cefalotórax a diferencia de otras especies que no son rayadas, presenta un esternón triangular característico. En cuanto a la composición de su veneno, éste ya ha sido previamente descrito (Guzmán, 1984; Possani, 2005).

3.2. CANCER

En los organismos multicelulares los procesos biológicos dependen del funcionamiento de un mecanismo coordinado de las células componentes, que les permite organizarse en tejidos, órganos y sistemas, ajustados perfectamente a un equilibrio homeostático que dirija y coordine los eventos fisiológicos de cada célula, para así asegurar un balance en su crecimiento, proliferación controlada y diferenciación. Cuando estos mecanismos de coordinación se pierden o descontrolan, es lo que genera una célula maligna que puede convertirse en un cáncer (Torroela *et al.*, 1998; Alberts *et al.*, 2002).

El cáncer es genérico y designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del cuerpo, la característica primordial es la multiplicación rápida de células anormales por mutación o alteración de genes que controlan la reparación del ADN, el ciclo celular y la muerte celular programada, que puede llevar a la progresión y desarrollo de una neoplasia maligna que puede extenderse más allá de los límites normales, invadir partes adyacentes del cuerpo y propagarse a otros órganos por el proceso metastásico (OMS, 2011).

La célula cancerosa se caracteriza por presentar tasas de mutación de anormalidades cromosómicas y de inestabilidad genómica la cual es una característica de casi todos los cánceres humanos, generalmente se manifiesta en grandes defectos como translocaciones, aneuploidías y deleciones cromosómicas, aunado a esto, la incapacidad de la célula para reparar el ADN dañado y la pérdida de integridad genómica conduce a mutaciones o expresión de manera aberrante de genes específicos que controlan diversos aspectos de la proliferación celular y muerte celular programada. Por ejemplo, la inestabilidad de

microsatélites (MSI, también conocida como MIN), es una forma de inestabilidad genómica que se caracteriza por la expansión o contracción de la cantidad de oligonucleótidos repetidos presentes en la secuencia de los microsatélites y otro más que se caracterizan por altas frecuencias en mutaciones en pares de bases (Klug, 2006).

Dentro de las características que adquiere una células al transformarse en maligna están: la inmortalidad, proliferación descontrolada, independencia a anclaje, vías anaerobias para la generación de fuentes de energía y pérdida de inhibición por contacto, esta última es la que le permite crecer en capas y formar una neoplasia o tumor: que es una masa anormal de tejido de origen clonal producida por el crecimiento y proliferación descontrolada de una sola célula (Alberts *et al.*, 2002; McGavin y Zachary, 2007)

Para que tales características anteriormente mencionadas se presenten en una célula cancerosa, se ha reportado que el proceso de cambio comprende 10 funciones biológicas adquiridas en el desarrollo multietapa de un tumor (Hannan y Weinberg, 2011) (Figura 1), pero para lograr esto, las células tienen que estar expuestas a agentes exógenos o ambientales, a los que se asocian del 80 a 90 % de los canceres padecidos conocidos y el 10 % restante son de tipo hereditario (Torroela *et al.*, 1998).

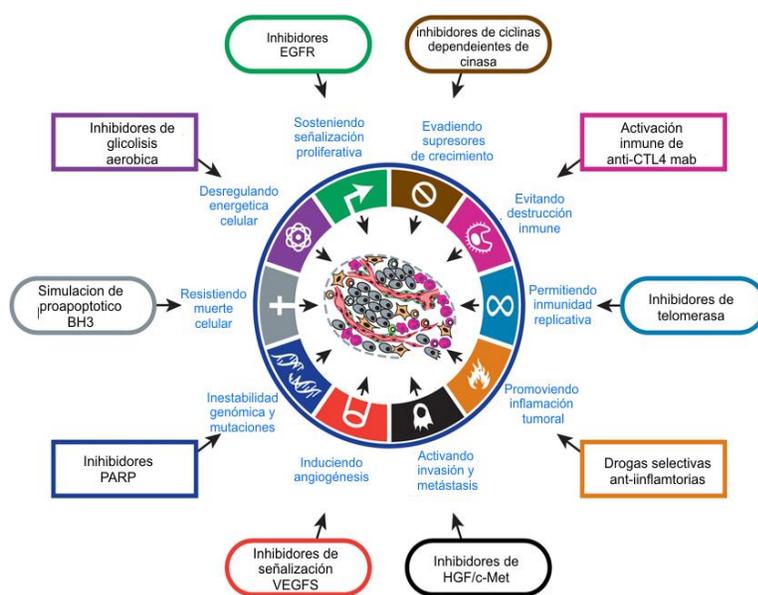


Figura 1: Funciones biológicas adquiridas en el desarrollo multietapa de un tumor y sus posibles blancos terapéuticos. Modificado de: Hannan y Weinber, 2011.

3.2.1. Causa del cáncer

Como se mencionó anteriormente, la transformación de una célula normal en tumoral es un proceso multietapa y suele consistir en la progresión de una lesión precancerosa a un tumor maligno, estas alteraciones son el resultado de la interacción entre los factores genéticos del paciente y tres categorías de agentes externos:

- Carcinógenos físicos, como las radiaciones ultravioleta e ionizantes.
- Carcinógenos químicos, como asbestos, componentes del humo de tabaco, aflatoxinas, arsénico y el alcohol.
- Carcinógenos biológicos, como las infecciones causadas por determinados virus, bacterias o parásitos.

Aunado a lo anterior la inactividad física y el envejecimiento son otros factores fundamentales en la aparición del cáncer, la incidencia de esta enfermedad aumenta considerablemente con la edad, muy probablemente porque se van acumulando factores de riesgo de determinados tipos de cáncer, la acumulación general de factores de riesgo se combina con la tendencia que tienen los mecanismos de reparación celular a perder eficacia con la edad (OMS, 2011).

3.2.2. Principales categorías de genes afectados en cáncer

En las células cancerosas hay dos categorías generales de genes mutados o que se expresan incorrectamente: los protooncogenes y los genes supresores de tumores (Tabla 5), los primeros son genes cuyos productos promueven el crecimiento, la transducción de señales estimulan la división celular y regulan el ciclo celular. Cuando un Protooncogén esta mutado o se expresa incorrectamente y contribuye al desarrollo de un cáncer pasa a denominarse oncogén porque sufren una alteración en la ganancia de función y confieren un fenotipo canceroso dominante. Por su parte los genes supresores de tumores (GST) son aquellos cuyos productos regulan en condiciones normales los puntos de control del ciclo celular e inician el proceso de apoptosis, en las células normales, las proteínas codificadas por los genes supresores de tumores detienen la progresión del ciclo celular en respuesta a un daño en el ADN o a señales de supresión del crecimiento provenientes del medio extracelular, cuando los GST están mutados o inactivos, las células no pueden responder normalmente a los puntos de control del ciclo celular o son incapaces de ejecutar la apoptosis (Klug, 2006).

3.2.3. Cáncer cérvicouterino

El cáncer de cérvix humano es una de las enfermedades que más afecta a las mujeres a nivel mundial, ya que cobra cerca de 300,000 muertes al año (OMS, 2011) y la perspectiva que se tiene no es alentadora pues se espera un número muy elevado de casos en unos cuantos decenios. México no escapa a esta problemática pues este tipo de cáncer representa la tercer causa de mortalidad en la población en general, ocupando el 16.6 % de muertes por causa de cáncer (Linaldi *et al.*, 2010).

El cáncer cérvicouterino es una secuela no resuelta y persistente de ciertos genotipos del virus del Papiloma Humano (VPH), los cuales son pequeños virus de DNA de doble cadena, sin envoltura, cuyo genoma está constituido por aproximadamente 7200-8000 pb, dividido en tres regiones: una región temprana E (Early), la cual codifica para las proteínas virales (E1, E2, E4, E5, E6 y E7), necesarias para la replicación del DNA viral, la regulación de la transcripción y la transformación e inmortalización celular, una región tardía L (Late), que codifica para proteínas estructurales (L1 y L2) y una región reguladora conocida como región larga de control LCR (Long Control Region), que contiene la

secuencia de DNA que permiten el control de la replicación y de la expresión del genoma viral (McMurray *et al.*, 2001)

El mecanismo de acción de los HPV de alto riesgo en el desarrollo de la neoplasia cervical, se explica principalmente por la acción de dos de sus oncoproteínas virales E6 y E7, estas tienen la capacidad de inmortalizar y transformar queratinocitos, confiriéndoles un alto grado de inestabilidad cromosómica. La expresión continua de estos genes, es requisito indispensable para mantener el crecimiento neoplásico de las células del cérvix. Estudios del mecanismo molecular del proceso de transformación, han revelado un complejo patrón de interacciones de estas proteínas virales con reguladores celulares, envueltos en procesos biológicos como: la apoptosis, la proliferación y diferenciación celular (Doeberitz, 2002). Se considera que el proceso de integración del genoma del VPH al genoma de la célula hospedera es el evento fundamental en la progresión a cáncer (Jayshree *et al.*, 2009)

El cáncer de cérvix ocurre en dos formas predominantes: carcinoma escamoso y adenocarcinoma, el tipo histológico más comúnmente encontrado en las mujeres es el carcinoma escamoso (80% de los casos) y está más frecuentemente asociado al VPH 16, el adenocarcinoma es el segundo tipo histológico más común y aunque el VPH tipo 16 también es el más frecuente, la proporción de los genotipos 18 y 45 aumenta significativamente en este tipo de tumores (Reimers *et al.*, 2009).

Actualmente se ha desarrollado la primera generación de vacunas profilácticas contra VPH, que incluye a la vacuna bivalente (contra VPH 16 y 18) y la tetravalente (contra VPH 16, 18, 6 y 11). Estas vacunas han mostrado una reducción significativa en el desarrollo de lesiones del cérvix, vagina, vulva y región ano-genital (Medeiros *et al.*, 2009). Sin embargo, dado que su efecto se manifestará a largo plazo, es posible el brote de nuevos tipos oncogénicos de VPH de poca repercusión actual, por lo que es necesario fomentar los programas de detección oportuna, así como en la investigación dirigida a mejorar el diagnóstico, pronóstico y tratamientos eficaces (Lizano *et al.*, 2009).

3.3. APOPTOSIS

El evento de muerte celular por apoptosis es uno de los blancos primordiales en la estrategia en la terapia y tratamiento del cáncer (Fulda & Debatin, 2006). La palabra apoptosis, proviene del griego (*apo'pto'sis*), que significa: “Caida de las hojas de los árboles”, llamado a menudo muerte celular ó suicidio celular, es un proceso biológico donde células individuales son eliminadas de distintos tejidos en organismos multicelulares en respuesta a una señal específica sin afectar células vecinas o inducir una respuesta inflamatoria (Bortner & Cidlowski, 2004), característicamente la célula apoptótica se encoge por la pérdida de iones-agua y se separa de las demás, hay activación de cistein-proteasas denominadas caspasas, hay una fuerte condensación de la cromatina la cual se agrega en la periferia de la membrana nuclear y forman áreas bien demarcadas de varios tamaños y formas separadas entre ellas, el ADN se fragmenta en tamaños de 200 a 300 pb (Gorczyca *et al.*, 1993), los organelos intracelulares son altamente empacados y hay invaginaciones del citoplasma que se transforman en cuerpos apoptóticos, que engloban a los organelos. Pese a lo anterior la integridad de la membrana se conserva y son expuestos aleatoriamente en la cara externa de la mitocondria moléculas de fosfatidilserina y lisofosfatidilserina que actúan como químico-atrayentes (Danial & Korsmeyer, 2004;

Leyton & Quest, 2004), los cuerpos apoptóticos entonces finalmente son fagocitados por las células vecinas o por fagocitos. Características que en contraparte a la necrosis, es una forma pasiva de muerte celular, resulta a menudo de un daño celular, provocando hinchazón de la célula y organelos, que finalmente ceden por la turgencia de la célula y hay rotura de la membrana plasmática, liberación de enzimas lisosomales al espacio extracelular y por consecuencia inflamación (Shirokova, 2007).

El proceso de apoptosis puede ocurrir por dos mecanismos: el de receptor de muerte (DR) o extrínseco y por el mecanismo mitocondrial llamado también intrínseco. La vía de receptor de muerte o extrínseco primero involucra la unión u oligomerización de los receptores de muerte en la superficie celular que disparan el proceso, entre ellos destacan moléculas receptoras como CD95, Trail o Factor de Necrosis Tumoral (TNF), glucocorticoides, distintas formas de estrés como la supresión de factores de crecimiento, irradiación, luz ultravioleta, fármacos citotóxicos, peróxido de hidrógeno, tratamiento con ceramidas, infecciones por bacterias o virus y algunas toxinas (Gulbins *et al.*, 2000), que por lo general activan a la caspasa 8 y a Bid y desencadena la ruta mitocondrial o directamente activa a la caspasa 3, que culmina con el proceso de muerte (Shi , 2004).

Por su parte, el segundo proceso es disparado por diferentes respuestas al estrés intracelular como: lesión en el DNA, cambios en las concentraciones de calcio intracelular y estrés endoplasmático, estas dos vías se conjugan y complementan para llevar una vía final, a través del proceso de apoptosis, la liberación mitocondrial del citocromo C es un evento que desencadena la cascada de muerte al unirse con Apaf1-procaspasa 9 los cuales clivan y activan finalmente a la caspasa 9, que en turno, proteolíticamente activa a la caspasas 3, 6 y 7 y encienden infinidad de sustratos incluyendo polypolimerasa (ADP-ribosa) y permite el disparo de la muerte celular que sucumben en las características anteriormente mencionadas (Schinoni *et al.*, 2006).

3.3.1. Apoptosis en terapia del cáncer

Ahora está muy bien establecido que muchos agentes citotóxico actúan primariamente por disparo de apoptosis en células cancerosas, e implica que la respuesta celular aparezca después de la interacción de la droga con su blanco, el mecanismo para inducir apoptosis puede diferir por estímulo individual, sin embargo el daño al ADN o a otra molécula de señalización clave parece ser un evento inicial común, cuya lesión incitada es entonces propagada por la célula en estrés, por tanto el efecto citotóxico de terapias actuales es mediado por apoptosis, defectos en rutas de señalización de apoptosis pueden reducir o abrogar respuesta al tratamiento y resultar en resistencia a multidrogas (Fulda y Debatin, 2006).

Por tanto la medición de la apoptosis de líneas celulares cancerosas en cultivo es un componente esencial en la evaluación de la citotoxicidad de agentes químicos ó de moléculas toxicas proveniente de animales ponzoñosos. Es importante elucidar el mecanismo por el cual un componente induce una respuesta apoptótica y en su caso cuantificarla y medirla. Así, el desarrollo y descubrimiento de nuevas moléculas o drogas dirigidas a blancos celulares específicos dependerá de métodos de *screening* que incluyan medición de respuestas de distintos tipos celulares funcionales incluyendo apoptosis

(Myrtle, 2002), esto incluyendo también el estudio del veneno crudo de alacranes ponzoñosos de importancia médica.

3.3.2. Apoptosis y canales iónicos

Está fundamentado que los canales iónicos de la membrana plasmática contribuyen virtualmente a todos los procesos celulares básicos, incluyendo el fenotipo maligno de las células cancerosas (Prevarskaya *et al.*, 2010). Hay en la naturaleza una enorme diversidad de canales iónicos y su presencia es ubiqa en todo tipo de células y no están limitados a células excitables como inicialmente se supuso. Si bien a nivel molecular todos los diversos tipos de canales realizan una misma función, que es el permitir el paso de iones, en el contexto de la fisiología celular, los canales iónicos están involucrados, en la división celular, reconocimiento celular, proliferación, equilibrio electroquímico y el desarrollo mismo del organismo (Suppiramaniam *et al.*, 2010; Meir, 2004; Jiménez & Merchant, 2003).

Los canales iónicos son proteínas integradas en la membrana celular los cuales están expuestas en ambas caras de la misma, estas proteínas permiten el paso específico de iones de Na^+ , K^+ , Cl^- y Ca^{2+} a través de la membrana bajo su gradiente electroquímico, usualmente en respuesta a un estímulo apropiado. Los canales iónicos son conocidos por controlar procesos celulares como: cambios en la concentración iónica, cambios en el potencial de membrana, cambios en el balance osmótico de la célula, mediadores de respuestas de la célula a un amplio rango de estímulos fisicoquímicos intra y extracelulares (Prevarskaya *et al.*, 2010). Aunado a lo anterior, los canales iónicos han sido implicados en el proceso de muerte celular por apoptosis como reguladores de contenido iónico local y global (Figura 2). Por ejemplo, está reportado que los canales iónicos de Ca^{2+} , contribuyen al incremento de Ca^{2+} intracelular permitiendo la activación de la maquinaria apoptótica dependiente de Ca^{2+} . El flujo de este ión entre la mitocondria y el citosol resulta en la iniciación de apoptosis o protección de apoptosis de células estimuladas. La penetración del Ca^{2+} a moléculas largas como el citocromo C facilita su translocación de la mitocondria al citosol, lo que enciende la maquinaria apoptótica que permite el eflujo de iones K^+ y Cl^- , la pérdida de actividad osmótica es paralelo a la pérdida de agua, obligada razón por la cual la célula se contrae (Meir, 2004).

La activación de canales Cl^- ha sido reportado al inducir muerte por estimulación de receptores CD95 y $\text{TNF}\alpha$ por distintos fármacos, la activación de canales Cl^- juegan un papel importante en la maquinaria apoptótica, pues tienden a permitir la salida de iones Cl^- , provocando despolarización de la membrana celular permitiendo la salida de iones Na^+ los cuales dependen de la activación de canales K^+ , (Lang *et al.*, 2007), así mismo varios canales Cl^- permiten que HCO^{3-} salga y por tanto se presente acidificación citosólica, una típica característica de las células apoptóticas. Dado que la DNAasa tipo II tiene su pH óptimo en el rango ácido, esto favorece que se presente fragmentación del ADN en segmentos cortos (Shrode *et al.*, 1997). Se ha demostrado también que la acidificación intracelular puede facilitar la activación de las caspasas, porque, aunque el pH óptimo de muchas caspasa es aproximadamente 7.0, ha sido reportado que un bajo pH citosólico mejora la activación de caspasas mediada por c/dATP, indicando con esto que el ensamble del apoptosoma puede estar controlado por el pH intracelular (Matsuyama *et al.*, 2000).

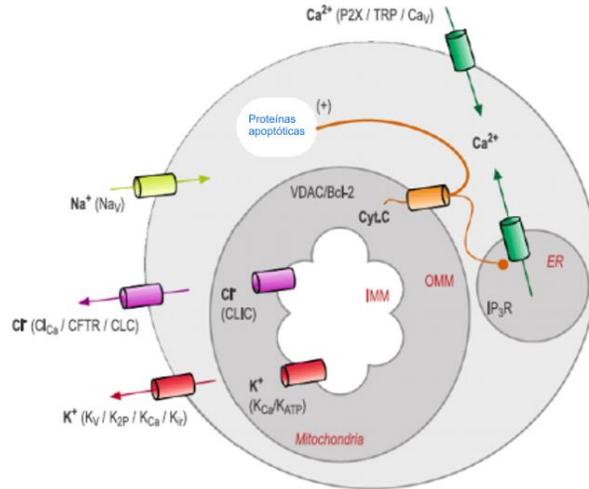


Figura 2. Esquema representativo, que ilustra la participación de los distintos tipos de canales iónicos en la apoptosis. Modificado de Meir, 2004. Puede observarse que distintos tipos de canales Ca^{2+} , participan cuando un estímulo externo causado por la interacción de alguna droga ó toxina interactúa con su blanco en la membrana celular, enciende la ruta extrínseca de la apoptosis y permitiendo el influjo de este ión, esta acción provoca un aumento considerable de Ca^{2+} intracelular que en efecto despolariza la mitocondria y permite la salida de proteínas pro-apoptóticas como el *citocromo C* (Cyt. C), inmediatamente, hay una modulación de los distintos tipos de canales Cl^- y K^+ , que permiten el eflujo de iones correspondiente. Al salir de la célula iones Cl^- se crea un ambiente ácido que culmina con la fragmentación del ADN, de la misma manera hay eflujo de iones K, la razón de este proceso es que algunas enzimas de apoptosis, dependen su actividad debido a una baja cantidad de este ion. Dichos mecanismo, culminan con la muerte de la célula.

4. ANTECEDENTES

A los animales productores de veneno, usualmente se les conoce por los efectos negativos que pueden causar después de tener un contacto accidental con los humanos, ya que sus venenos están conformados de una diversidad molecular fisiológicamente activa, pudiendo con esto provocar desde un ligero cuadro sintomático de intoxicación hasta complicaciones más severas como: la muerte, a pesar de que los efectos del envenenamiento pueden conducir a una reputación negativa, (Heinen y Gorini da Veiga, 2011), son observados, como fuente rica de principios farmacológicamente activos ya que muchas de sus toxinas han sido objeto de investigación orientado al desarrollo de nuevas moléculas para el diagnóstico, tratamiento y cura de algunos tipos de enfermedades (Veiga *et al.*, 2009).

Con base en lo anterior la terapia anti-cáncer es una de las principales áreas donde se estudia el potencial de péptidos procedente de animales productores de veneno, observando principalmente que estos péptidos pueden unirse específicamente a la membrana de células cancerosas afectando su migración y proliferación, por ejemplo, toxinas presentes en el veneno de varios alacranes son específicos para canales iónicos de Ca^{2+} , K^+ , Na^+ y Cl^- y afectan a las células cancerosas interactuando con su respectivo canal iónico, al que se unen de manera específica (Jäger *et al.*, 2004), controlando ciertas conductas celulares en la cascada metastásica (Laniado *et al.*, 2001) y que son fundamentales para la actividad celular (Goudet *et al.*, 2002).

A partir de estudios *in vitro* empleando veneno crudo de distintas especies de alacrán, se ha demostrado un efecto citotóxico, antiproliferativo y apoptogénico, por ejemplo en lo reportado sobre las líneas celulares MCF-7 (cáncer de mama) y SH-SY5Y (neuroblastoma humana) donde se demostró que el veneno incrementa la producción de óxido nítrico (ON) y residuos intermediarios de nitrógeno (RIN), los cuales se relacionan con despolarización de la mitocondria y activación de la caspasa-3 que está presente en la apoptosis, ambos con veneno de alacrán de la especie *Odontobuthus dorie* (Zargan *et al.*, 2011 a, 2011b) (Figura 3). En otro estudio con veneno de alacrán de la especie *Rophalurus junceus*, se evidenció un notable efecto citotóxico de manera no dosis dependiente sobre la línea celular P3-X63 (mieloma de ratón) (Betancourt *et al.*, 2009). Con respecto al veneno de la especie *Heterometrus bengalensis*, se demostró que tiene elementos antiproliferativos e inductores de apoptosis caracterizados por condensación de la cromatina y fragmentación del ADN sobre las líneas celulares de linfoma monocítico humano U937 y leucémica eritromieloblastica humana K562, (Das Gupta *et al.*, 2007). Así también, el veneno de la especie *Buthus martensi*, indujo muerte celular por apoptosis inhibiendo el crecimiento de células de glioma U251-MG probablemente por inhibición y modulación de varios canales iónicos de estas células (Wang & Ji, 2005).

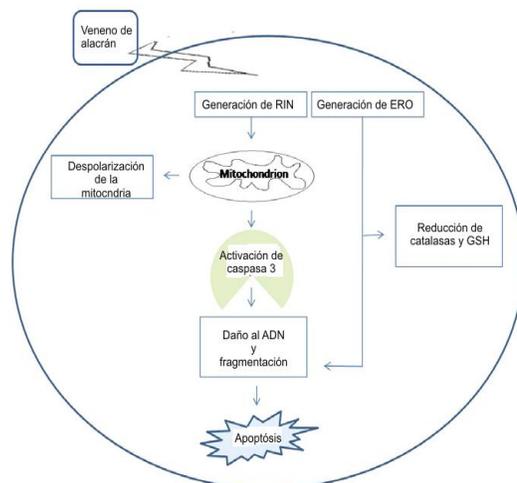


Figura 3. Esquema del mecanismo de muerte inducido por el veneno crudo de alacrán de la especie *Odontobuthus doriae* por elevación en la producción de RIN y ERO que causan liberación de factores proapoptóticos por despolarización de la mitocondria y encendiendo la ruta intrínseca de la apoptosis. Modificado de Zargan *et al.*, 2011.

Uno de los ejemplos más notables es el principio activo de la clorotóxina, un péptido proveniente del veneno del alacrán *Leiurus quinquestriatus* que inhibe la afluencia de iones Cl^- en la úmicamente en la membrana de células del glioma, al que se une específicamente y que ha mostrado poca o ninguna actividad frente a células normales (Soroceanu *et al.*, 1999). A nivel molecular se observó que este péptido se une a la matriz de la metaloproteína II (Veiseh *et al.*, 2007), que es una proteína involucrada en migración e invasión celular y que es sobre-expresado en células del glioma (Deshane *et al.*, 2003).

En otro estudio realizado con la misma toxina, se observó que esta se une a la membrana a través de fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato, localizada en los lamelipódios de las células cancerosas, que son orgánulos involucrados en la transducción de señales, invasión celular, adhesión y motilidad, y que es vital para la ruta PI3K-Akt implicado en múltiples tipos de cáncer humano, esta unión afecta profundamente muchas de las funciones celulares, incluyendo eventos subsecuentes de transducción de señales, cambios en el ciclo celular, síntesis de ADN, proteínas y de la motilidad celular (Carol *et al.*, 2005).

Recientemente está siendo producido un péptido sintético análogo a la clorotóxina TM601, que está diseñado para acarrear radioactividad a las células de glioma, cuyos estudios pre-clínicos en fase 1 en humanos muestra ser seguro al atacar únicamente a gliomas malignos, la fase 2 está siendo probada (Mamelak *et al.*, 2006), de la misma manera un análogo a la clorotóxina la *rBmK-CTa* proveniente del veneno del alacrán *Buthus martensii* Karsch, se observó que también inhibe el crecimiento de células del glioma por bloqueo de canales iónicos de Cl^- (Fu *et al.*, 2007), en otro estudio con veneno crudo de la misma especie se evidenció una inducción de apoptosis *in vitro* en línea celular del glioma U251-MG y causando disminución del crecimiento tumoral en estudios *in vivo* (Wang y Ji, 2005).

Por otra parte una proteína llamada *bengalina* aislada del veneno del escorpión *Heterometrus bengalensis* Koch, mostró inducir apoptosis a través de la ruta mitocondrial contra línea celular U937 de linfoma histiocítico humano y de línea celular K562 de leucemia mieloide crónica humana, las células tratadas mostraron arresto del ciclo celular en fase G1, fragmentación del ADN, disminución de la actividad de la telomerasa, y daños nucleares (Gupta *et al.*, 2010).

Empleando el veneno del escorpión *Rhopalurus junceus* un alacrán cubano, se determinó la citotoxicidad de su veneno y sus fracciones proteicas, en los cultivos de líneas celulares tumorales Hela, (carcinoma de cérvix humano); Hep-2, (carcinoma epidermóide de laringe humano); NCI -H292, (carcinoma de pulmón) y en la línea diploide MRC -5, (fibroblastos humano de pulmón), el efecto de las fracciones obtenidas y del veneno, sobre las líneas celulares, mostró apoptosis como mecanismo de muerte celular, indicando que fracciones con masas moleculares inferiores a 4 kDa inhibieron significativamente el crecimiento de las células tumorales con respecto a la línea celular diploide siendo las responsables de la significativa y diferencial toxicidad del veneno del escorpión, sobre las células tumorales (Díaz *et al.*, 2010), Como se evidencio anteriormente el proceso apoptótico, como efecto tras la inducción de veneno de alacrán es característico, es sabido que la apoptosis es el proceso por el cual células dañadas o senescentes son eliminadas de los organismos multicelulares (Omran, 2003).

5. JUSTIFICACIÓN

A la fecha varios grupos de investigación han demostrado que el veneno de algunas especies de alacrán pertenecientes a la familia Buthidae de distintos lugares del mundo son un potencial como agente anticancerígeno porque sus venenos son capaces de inducir muerte celular en varios tumores y líneas celulares cancerosas.

En nuestro país existe la subespecie de alacrán *Centruroides limpidus limpidus* una subespecie de importancia medica perteneciente a la familia Buthidae que no existe en otras partes del mundo y por tanto el potencial anteriormente descrito no se ha estudiado y no se ha dilucidado si el veneno crudo de esta subespecie muestra el efecto característico mostrado con otras especies de alacrán.

Para estudiar ese potencial, es necesario probar un modelo biológico y así iniciar el desarrollo de una posible terapia alternativa. Uno de los modelos biológicos es la línea celular HeLa. Esta línea celular se caracteriza por provenir de un adenocarcinoma de cérvix humano, que particularmente muestra inmortalidad y proliferación descontrolada y que puede cultivarse *in vitro*. Por tanto es un modelo adecuado e interesante que nos permitirá dilucidar si el veneno crudo del alacrán *Centruroides limpidus limpidus* tiene un efecto sobre esta línea celular.

Esta necesidad es importante ya que actualmente no existe una terapia efectiva para el tratamiento del cáncer cérvicouterino por lo que la búsqueda de métodos alternativos para el tratamiento del mismo, nos muestra como potencial el empleo del veneno de alacrán de la especie *C. l. limpidus*, debido a las propiedades citotóxica, antiproliferativa y apoptogénica reportadas, que muestra el veneno de alacrán en otras especies.

6. HIPÓTESIS

El veneno de alacrán *Centruroides limpidus limpidus*, produce un efecto citotóxico apoptótico y antiproliferativo sobre células de la línea HeLa.

7. OBJETIVO GENERAL

- Evaluar el potencial del veneno crudo del alacrán *Centruroides limpidus limpidus* como agente anti-cancerígeno en células de la línea HeLa (derivadas de un paciente con adenocarcinoma de cérvix).

7.1 Objetivos particulares

- Evaluar el efecto citotóxico y antiproliferativo a través de un ensayo de viabilidad inducida por el veneno crudo de *C. l. limpidus* en células Hela.
- Evaluar el efecto apoptótico del veneno crudo de *C. l. limpidus* sobre la línea celular Hela.
- Demostrar el potencial del veneno como agente anti-cancerígeno con los estudios anteriores.

8. MATERIAL Y MÉTODOS

11.1. Colecta del alacrán *Centruroides limpidus limpidus*

Centruroides limpidus limpidus, se colectó en el municipio de Pilcaya, Guerrero, de entre la corteza de los árboles, hojarasca y bajo piedras (Figura 10) y fueron transportados al bioterio de las instalaciones del Centro Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA), de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Autónoma del Estado de México, donde fueron identificados fenotípicamente (Díaz, 1966) y permanecieron bajo cuidado en contenedores de acrílico (Figura 11) con una cama de aserrín de 3 cm de grosor y mantenidos a una temperatura de 28 °C y humedad relativa del 30 %, fueron alimentados con agua y larvas de tenebrios cada 8 días, los cuales eran reproducidos en nuestro bioterio.

11.2. Extracción del veneno

El veneno de estos organismos se obtuvo por estimulación eléctrica del telson (10-20 volts) a partir de una plancha electrificada diseñada por nuestro equipo con dos electrodos conectados a una fuente de poder (Figura 12), entonces se colocaba el alacrán y se estimulaba. El veneno obtenido (aproximadamente 2-4 µl) fue colectado con una micropipeta y se diluía en agua doble destilada, posteriormente, la suspensión se centrifugaba a 14,000 x g por 10 minutos a 4° C para eliminar impurezas y únicamente se colectaba el sobrenadante en un vial nuevo (Possani *et al.*, 1994) determinado lo anterior se procedió a cuantificar la concentración del veneno a una densidad óptica (DO) de 595 nm en un espectrofotómetro Epoch: 1209284, utilizando para ello la técnica de Bradford (Cat.: B6916 BioRad), el cual a partir de un ensayo en placa de 96 pozos se colocaban cantidades de PBS y reactivo de Bradford (Tabla 4), para generar una curva patrón y de ahí obtener medición para nuestra muestra desconocida, aplicando la ecuación de la recta pendiente podíamos obtener nuestra concentración de veneno en µg/µl, el veneno era empleado inmediatamente para nuestro experimento

11.3. Ensayo Bioactividad del veneno

Para determinar cuánto tiempo el veneno era activo después del proceso post-ordeña, se evaluaron ratones de 18 gr de la cepa Balb/C de 4 semanas aproximadamente (n=9), al inocular intramuscularmente 160 µg de veneno crudo de alacrán de la especie *Cll*. Con respecto al grupo control negativo se les administró únicamente el volumen correspondiente a agua inyectable. (Los animales que se emplearon, se mantuvieron bajo cuidado siguiendo la normatividad mexicana (NOM-062-ZOO-1999) e internacional (National Academic of Science, 2005) y el protocolo fue aprobado por el comité de bioética de la FMVZ de la UAEM, se registraron los datos de sintomatología después de la inoculación del veneno.

11.4. Cultivos de células

Se cultivaron a confluencia células HeLa (Cat.: CCL-2 ATCC) en botellas T25 (Cat.: 83.1810.300 Sarsted) con DMEM (Cat.: 12100046 de Gibco) a 37 ° C, 5 % CO₂, 10% SFB (suero Fetal Bovino) (Cat.: S11550 de Atlanta Biológica) y penicilina-estreptomicina 1% (Cat.: 15140-122 o 15240-062 de Gibco). A los cultivos celulares se les realizó pasajes cada tercer día por tripsinización de acuerdo a protocolos publicados (Mitry & Huges, 2004; Freshney, 2005). En breve: a la monocapa se le retiró el medio y se lavó con PBS

(Cat.: 21600-010 de Gibco BRL), en seguida se incubó con 1 ml de tripsina al 0,25% (Cat.: 25200-056 de GibcoBRL) y se incubó durante 3 minutos, se suspendieron las células por pipeteo y se centrifugaron a 300 x g durante 5 minutos, el sobrenadante se desechó y el botón con las células se volvió a suspender en DMEM 10 % SFB y se procedió a contar las células en suspensión utilizando un hemocitómetro y determinar de igual manera la viabilidad celular con azul Tripán (McGahan *et al.*, 1995). Para ello se tomaron 50 µl de la suspensión celular y se colocaron en un vial estéril junto con 50 µl de azul Tripán se homogeneizó la mezcla y se cargaron 10 µl de esta en un hematocitometro entonces bajo el microscopio de campo claro se contaban todas las células vivas (blancas) y se restaban las muertas (azules) de los 16 recuadros de cada uno de los cuatro cuadros al extremo de la cámara, se obtenía el promedio de células vivas y se realizaba la siguiente operación para obtener el número de células por mililitro.

No cel/ml = promedio células (2) (10000) (ml de suspensión).

11.5. Ensayo de citotoxicidad y viabilidad (MTS)

Se sembraron 10^4 células/pozo en placa de 96 pozos (83.1835 Sarsted) con DMEM-10 % SFB durante 24 horas, una vez adheridas las células, el medio usado se retiró y se colocaron 100 µl de MLSFB (Medio libre de suero fetal bovino) con diferentes concentraciones de veneno de alacrán 50, 100, 200 y 400 µg/ 100 µl de medio a cada pozo con 3 repeticiones y sus respectivos controles negativos y positivos, este último referido al antineoplásico ciclofosfamida (Genoxal® Baxter Oncology GmbH) y se incubó por 24 horas bajo las condiciones anteriormente descritas. Pasado este tiempo, para cuantificar las células viables después del tratamiento con el veneno crudo de alacrán el medio con veneno usado se reemplazaba con 100 µl de medio fresco y se colocaban 20 µl del reactivo [3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il) -5 - (3-carboxymethoxyfenil) - 2 - (4-sulfofenil)-2H-tetrazolio, (MTS) incluido en el kit CellTiter 96 @ Aqueous One Solution (Cat.: G3580 Promega), que determina por colorimetría, el número de células viables a partir de la reacción del MTS metabolizado por las células vivas, la reacción fue medida en un espectrofotómetro (Epoch, 1209284) a 490 nm, donde las lecturas más altas de densitometría indican mayor viabilidad celular.

11.6. Cultivo de macrófagos

Para determinar si el efecto del veneno era el mismo en una célula fisiológicamente normal se emplearon macrófagos de ratones BALB/C adultos, a los que se les inoculó 1ml de tioglicolato sódico (1 mg/ml) por vía intraperitoneal y 4 días después se sacrificaron y sus células se cosecharon por lavado peritoneal (Petricevich y Lebrun, 2005). La cavidad peritoneal fue inyectada con 5 ml de RPMI-1640 frío y masajeadó levemente, el líquido inyectado se aspiró y las células se recogieron y lavaron con PBS tres veces por centrifugación a 300 x g durante 3 min. Posteriormente las células se sembraron en placas de 96 pozos a una concentración de 10^6 células/pozo con RPMI-1640 suplementado con 10% de SFB. Después de incubación a 37 °C durante 2 h en 5% h de CO₂, la placa se lavó dos veces con medio RPMI-1640 para eliminar las células no adherentes y las células adherentes fueron referidas como macrófagos (Petricevich *et al.*, 2007), las cuales fueron expuestas a 50, 100 y 400 µg / 100 µl de veneno crudo en medio RPMI-1640 10% SFB,

pasadas 24 horas, se procedió a determinar su viabilidad con ayuda del kit mencionado anteriormente.

11.8 Ensayo apoptosis

Para determinar si es por apoptosis el que las células mueren, se utilizó el método de tinción EB-AO (McGahon *et al.*, 1995) adaptado para placa de 96 pozos (Ribble *et al.*, 2005). Para ello, se sembraron 10^4 células/pozo en placa de 96 con DMEM 10 % a 37 °C, 5% CO₂ por 24 horas, pasado este tiempo se retiró el medio usado y se reemplazó con 100 µl de MLSFB fresco con las distintas concentraciones de veneno empleadas y se incubó por 24 horas más, bajo las mismas condiciones, pasado el tiempo, se centrifugó la placa a 129 x g 5 minutos y a cada pozo se le agregaron 8 µl de tinción EB-AO y se observó bajo microscopio (40X) para cuantificar y visualizar las características morfológicas propias de apoptosis, como lo son la condensación de la cromatina, pérdida de adhesión de la membrana celular a la superficie de la placa de cultivo, se documentó con ayuda de un microscopio de fluorescencia invertido marca *Leica* modelo *DMIL* y una cámara fotográfica *Nikon coolpix S2500*, se contó un mínimo de 100 células en cada dosis del ensayo con sus respectivos repeticiones.

9. RESULTADOS

10. ARTICULO ENVIADO

8396443689731060 Resistance of cervix adenocarcinoma cells (HeLa) to venom of scorpion
Centruroides limpidus limpidus

↑ ↓ ×



JVATiTD Editorial (editorial@jvat.org) [Agregar a contactos](#) 06:09 p.m. |

Para: Dr Alberto Barbabosa-Pliego

CC: José María E Contreras-Ortiz, Juan C Vázquez-Chagoyán, José S Martínez-Castañeda, José G Estrada-Franco, José E Aparicio-Burgos, Jorge Acosta-Dibarrat, Alberto Bar

Article title: Resistance of cervix adenocarcinoma cells (HeLa) to venom of scorpion *Centruroides limpidus limpidus*

MS ID : 8396443689731060

Authors : José María E Contreras-Ortiz, Juan C Vázquez-Chagoyán, José S Martínez-Castañeda, José G Estrada-Franco, José E Aparicio-Burgos, Jorge Acosta-Dibarrat and Alberto Barbabosa-Pliego

Journal : Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases

Dear Dr Barbabosa-Pliego

Thank you for submitting your article. This acknowledgement and any queries below are for the submitting author. This e-mail has also been copied to each author on the paper. Please bear in mind that all queries regarding the paper should be made through the submitting author.

A pdf file has been generated from your submitted manuscript and figures. We would be most grateful if you could check this file and let us know if any aspect is missing or incorrect. Any additional files you uploaded will also be sent in their original format for review.

http://www.jvat.org/imedia/8396443689731060_article.pdf (1027K)

For your records, please find below link(s) to the correspondence you uploaded with this submission. Please note there may be a short delay in creating this file.

http://www.jvat.org/imedia/1268260529973107_comment.pdf

We will assign peer reviewers as soon as possible, and will aim to contact you with an initial decision on the manuscript within 6 weeks.

In the meantime, if you have any queries about the manuscript you may contact us on editorial@jvat.org. We would also welcome feedback about the online submission process, which can be sent to info@biomedcentral.com.

Best wishes,

The JVATiTD Editorial Team

e-mail: editorial@jvat.org

Web: <http://www.jvat.org/>

Contreras-Ortiz José María Eloy¹; Vázquez-Chagoyán Juan Carlos¹; Martínez-Castañeda José Simón¹; Estrada-Franco José Guillermo¹; Aparicio-Burgos José Esteban¹; Acosta-Dibarrat Jorge¹; Barbabosa-Pliego Alberto^{1*}

¹Centro de Investigación y Estudios Avanzados en salud animal (CIESA), Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ), Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM), Km. 14.5 Autopista Toluca-Atlacomulco, San Cayetano de Morelos, CP. 50200 Toluca, México.

* Corresponding author

Email addresses:

COJME: chema_coco12@yahoo.com.mx

VCJC: jcvic@yahoo.com

MCJS: josesimonmc@hotmail.com

EFJG: joseestradaf@hotmail.com

ABJE: joshekawa@hotmail.com

ADJ: jpacosta00@hotmail.com

BPA: abarbabosa@yahoo.com.mx*

Abstract

Background

Centruroides limpidus limpidus (CII) venom is a mixture of pharmacologically active principles. Among them, the most important are proteins of toxic character that interact selectively and specifically with different cellular targets such as ion channels. Recently, anti-cancer properties from the venom from other scorpion species were described. Scorpion venom was reported to induce cell death, inhibit proliferation and trigger the apoptotic pathway in different cancer cell lines. In this regard studies reported here evaluated the CII crude venom characteristics as possible cytotoxic agent and inducer of apoptosis on cells from human cervical adenocarcinoma (HeLa).

Results

Our results have shown a high survival rate of HeLa cells when exposed to CII venom. This was observed when the cells were evaluated with viability assay and

EB-AO (Bromide Ethidium/Acridine Orange) assay demonstrating absence the apoptotic effect of the venom on these cells. No evidence of chromatin condensation or DNA fragmentation was found. However, CII venom induced cell death in macrophages in a dose dependent response.

Conclusions

HeLa cell cultures displayed none detrimental effect after being exposed to crude CII venom. The outcome could possibly be explained by the absence of specific HeLa cells membrane targets to the molecules present in the venom of *Centruroides limpidus limpidus*. Thus the venom can be considered not to be a candidate for treatment of human uterine cervix papilloma cancer. So that prospective studies will be needed to determine whether, if in any other cancer cell lines the CII venom has the equivalent bioactivity similar to the one found in the venom of other scorpion species.

Keywords:

Scorpion venom, cytotoxicity, apoptosis, HeLa, anti-cancer, *Centruroides limpidus limpidus*

Background

The scorpions and their venom have been used for centuries as medical treatment in traditional medicine in India, China, Africa and Cuba [1], for various ailments such as pain, epilepsy [2], tetanus, subcutaneous nodules, seizures [3], and cancer [4, 5]. These properties may be awarded because their venoms are rich source of pharmacologically active substances, composed of amino acids, inorganic salts, nucleotides, biogenic amines, lipids, enzymes and proteins of toxic character [6, 7].

Despite huge efforts to find the cure for cancer, conventional methods such as surgery, chemotherapy and radiotherapy options [1] have still not reached an adequate level of protection and resolution of the disease. These have been observed because of the undesirable side effects and damage to healthy tissue surrounding the tumours that are commonly seen in treated patients [8]. Furthermore, it has been shown that tumour cells can develop resistance to these therapies [9]. In this context and mainly derived from previous observations made by the scientific community for the uses of folk medicine in identifying, bioactive molecules present in scorpions venom alternative approaches have been proposed with the hope of finding more effective treatments for cancer.

Recently, it has been reported that some scorpion venoms inhibit the growth of various cancer cell lines, exerting their action specifically by 3 different mechanisms [10] and as follows: 1) Blocking specific ion channels [11], 2) by inhibition of cancer cell invasion after specific binding sites (different ion channels) on the plasma membrane [12] and 3) by activating intracellular pathways of apoptosis [13].

Cytotoxic, antiproliferative and apoptogenic effects have been demonstrated *in vitro*, using crude venom of different scorpion species. For example, in the MCF-7 (Breast cancer) and SH-SY5Y (human neuroblastoma) cell lines treated with *Odontobuthus dorie* venom showed an increment in the production of nitric oxide (NO) and reactive nitrogen intermediates (RNI) which are related to mitochondrial depolarization and activation of caspase-3, present in apoptosis [14,15]. Thus cell death *in vitro* was accelerated. In another study, where *Rophalurus junceus* venom was tested, a remarkable cytotoxic effect on a non-dose dependent manner in the cell line P3-X63 (Mieloma of mice) was observed [16]. In comparison the venom of the *Heterometrus bengalensis* showing anti-proliferative and apoptosis inducing properties was characterized by chromatin condensation and DNA fragmentation on U937 and K562 human leukemia cell lines [3].

Additionally *Buthus martensi* venom was reported to induce cell death by apoptosis, inhibiting the growth of U251-MG glioma cells probably by inhibition and modulation of several ionic channels [17].

In Mexico there are large numbers of scorpion species, and the anticancer therapeutic potential of their venom of most of them, has not been studied in detail. Given the evolutionary relationship among scorpion species, whose venoms have demonstrated activity against cancer derived cell lines, we hypothesized that *Centruroides limpidus limpidus* (Cll) venom could have some therapeutic effect against some cancer cells. Here we tested apoptotic and/or cytotoxic properties of Cll crude venom on human cervical adenocarcinoma (HeLa) cells, as a first step to test the efficacy of this venom against cancer cells.

Results

Bio-activity of the venom

Rodents were inoculated with 160 µg of crude venom which induced the following reactions: Constant movement, excitability, rapid breathing, and overall contraction and discomfort in the snout. It is important to note that the time elapsed from inoculation to death increased as the time from collection to inoculation increased (Figure 1), inferring that venom degradation and loss of bioactivity may occur if it is not kept under optimal storing conditions.

Cell morphology

HeLa cells were monitored for 24 hours after exposure to 50, 100, 200 and 400 µg of crude venom/100 µl of medium. At no dose the cells showed any morphological changes, and the cell monolayer remained attached to the bottom of the cell culture plaque. There was no evidence of membrane rupture or release of cytosolic contents to the culture medium and no morphology changes were apparent when comparing HeLa vs. control cells (Figure 2: A and B).

Cell viability (MTS)

Cll crude venom at doses ranging from 50-400 µg /100 µl of medium, had no effect on the viability of HeLa cells in culture, showing near to 100 % viability, however cells treated with cyclophosphamide displayed

mortality close to 80% (Figure 3). Meanwhile, the same treatment in macrophages, induced cell death in a dose dependent manner (Figure 4).

Apoptotic and necrotic effects

To have closer observations of the likely toxic effects we decided to see if there were any apoptotic cells. We found that after 24 h exposure to the CII venom given at the doses described previously, no apoptotic characteristic signs, such as nuclear condensation and DNA fragmentation (Figure 5: A) or necrosis (because intact nuclei were observed) were found. Meanwhile HeLa cells treated with cyclophosphamide (positive control) showed the characteristic condensation of chromatin, monolayer loss, cell detaching from the plaque surface and the cell shrinkage characteristic of apoptosis (Figure 5: B).

Discussion

As reported by several authors, the exposure of several cancer cell lines to scorpion venom is characterized by a marked change in cell morphology, loss of cell monolayer, cell contraction and death by either apoptosis or necrosis [14, 15, 16, 17]. Our results show that after treatment with crude CII venom none of the distinctive toxic effects of venom were observed in HeLa cells. In first instance, we suspected that the bioactivity of the venom was reduced because we were using the venom after some hours of collection. Therefore, we decided to test bioactivity of the venom at different moments after collection and found that the lack of toxicity in HeLa cells was not a problem of the bioactivity of the venom by itself. We were able to demonstrate toxic effects in macrophage cultures, who displayed toxic behavior in a dose dependent manner, and in Balb/C mice, who showed the characteristic scorpionism symptoms [18]. Venom remained bioactive even after several days post collection, however bioactivity was reduced with time after collection (Figure 1).

MTS metabolism assay confirmed the lack of effect of the venom on HeLa cell viability (Figure 3). Our results differ from previous reports about the effects of crude venom of different scorpion species on several cancer cell lines, where it was found that cell viability is affected in a dose-dependent manner [14, 15, 4]. Here we found that CII venom induced toxicity on macrophages of Balb/C mice who reacted, in a similar manner as described for the *Tityus serrulatus* scorpion venom in the same cell type. But unlike that report, where 5% of cell death was estimated at a dose of 50 µg/ml [19], in our study a 9.3% cell mortality was

reached at the same venom concentration, and 33% of cell death at a dose of 400 µg/100µl of medium (Figure 4).

Interestingly, in a study where *Macrotele raven* spider venom was used, it was reported that it induces cell death by apoptosis and cytotoxicity in a dose and time dependent manner on HeLa cells [20]. However, their findings could have been misinterpreted because in their protocol the venom was diluted in PBS, and based in our results (unpublished data) cells incubated in PBS for 24 hrs will suffer osmotic shock [21] and die either due to necrosis (more frequently) or apoptosis. We compared the effects of culturing HeLa cells in Venom-PBS and PBS-only and observed no differences between treatments, therefore we surmise that cell death was due to PBS and not venom, but when the venom was diluted in double distilled water as in other protocols [10], we could not observe the toxic effects of venom in HeLa cells.

The most frequently reported cell death induced by crude or fractionated scorpion venom is apoptosis. It has been reported involvement of membrane receptors such as Fas-L activating the extrinsic pathway of apoptosis, also involving the initiator caspases as 8 and 9 and of executing caspase 3[10]. Also, it has been reported that the venom elevated NO and RIN production, causing depolarization of the mitochondria and release of pro-apoptotic factors and activating the intrinsic pathway of apoptosis [14, 15]. In our results, we did not observe cell death by apoptosis or by lysis, however, as noted in our positive control, the apoptosis is induced with the antineoplastic cyclophosphamide (Figure 3). Notable changes can be observed as cell shrinkage and loss of contact with other cells and staining BE-AO reveal chromatin condensation, which are characteristic of apoptosis [22,23] (Figure 4).The lack of effect of venom on HeLa cells could be explained for the absence of membrane specific targets, that is, for example the lack of some ion channel proteins., that could be absent in some cancer cells, since they have the potential to regulate gene expression of this ion channel according to the needs [24]. Much has been reported concerning the resistance of cancer cells to new drugs and treatments, the reasons are many, but the most important involve overexpression of genes encoding proteins that block mechanisms that turn on the apoptotic death pathway. In this context for example, it has been reported that in HeLa cells, there is an overexpression of Bcl-2 and XIAP molecules which confer resistance against apoptosis [25]. It has been shown that down-regulation of XIAP sensitizes the cancer cell to apoptosis induced by anti-cancer drugs [26], Another aspect to consider is that E6 protein that is typical of

human papilloma virus degrades to P53 [27], and cannot activate the transcription of BAX. In normal cells BAX protein forms heterodimers with Bcl-2 protein and the cell is viable, when P53 stimulate the transcription of the BAX gene. Then the levels of BAX protein are increased to form BAX homodimers that activate the cellular changes that guide to apoptosis. In the cancerous cells, where P53 is not functionally, the level of BAX protein are not increased as a result of cellular damage and the cell would not trigger the pathway of apoptosis [28]. It has also been shown that the use of ion channel blockers of K^+ and Ca^{2+} may inhibit the process that triggers the pathways for cell death by apoptosis in some cell types [29]. Thus, it could be possible that CII venom has ion channel blockers that prevent activation of the signaling pathway of the apoptotic cascade. Therefore, there is no cell death, since it has been reported that the loss of K^+ ions causes depolarization of the membrane and force the entry of Ca^{2+} ions that participates in activating the caspases that execute apoptosis [30].

It is likely that for these reasons there are no reports of induction of apoptosis of scorpion venom on this cell type. However, our results show that CII venom has a toxic effect on macrophages, and it could be possible that it has some activity on cancer cells other than HeLa. Therefore, the use of CII venom should be studied in more detail to assess its potential value as an anticancer agent.

Conclusions

Centruroides limpidus limpidus venom shows no effect on HeLa cell culture, possibly for absence of specific targets in membrane molecules present in the venom of the scorpion. So that this venom is not a candidate for treatment of cervical uterine cancer and prospective studies are needed in other cancer cell lines to asses if any there are anticancer properties in the CII venom.

Methods

Venom source

Centruroides limpidus limpidus, were collected in the municipality of Pilcaya, Guerrero, Mexico and transported to the animal house facility of the Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA), from the Facultad de Medicina Veterinaria of the Universidad Autónoma del Estado de México. There specimens were phenotypically classified [31], taken care of and fed *ad libitum*.

Venom collection and preparation

The venom of these organisms was obtained by electrical stimulation of the scorpion's telson (10 - 20 volts) and diluted in double distilled water, and then the suspension was centrifuged at 14.000 x g for 10 minutes at 4 ° C [32]. Concentration was determined at 595 nm using the technique of Bradford (BioRad Cat: B6916) and stored at -80 ° C until use [10].

Venom bioactivity test

To determine for how long the venom was active after collection, its bioactivity was evaluated in Balb/C mice (18 g, 4 weeks old, n=9). Animals were inoculated intramuscularly, 160 µg of crude venom, in a total volume of 100 µl. A control group received only 100 µl of sterile, double distilled water. The animals used, were kept under animal welfare conditions, according to Mexican (NOM-062-ZOO-1999) and international (National Academic of Science, 2005) standards and the protocol was approved by the bioethics committee of the UAEM-FMVZ.

Cell culture

HeLa cells (ATCC: CCL-2) were grown to confluence in T25 bottles (Cat: 83.1810.300 Sarsted) with DMEM (Cat: 12100046 Gibco Laboratories) at 37 ° C, 5% CO₂, 10% FBS (Fetal Bovine Serum) (Cat.: Atlanta Biological S11550) and 1% penicillin-streptomycin (Cat.: 15140-122 or 15240-062 from Gibco Laboratories). Cell culture passages were performed every other day by trypsinization according to published protocols [36, 37]. In brief: the medium was removed and the confluent monolayer cells washed with PBS (Cat. :21600-010, Gibco BRL), then cells were incubated with 1 ml of 0.25% trypsin (Cat. :25200-056 from GibcoBRL) and incubated for 3 minutes, and after that cells were suspended by pipetting and centrifuged at 300 x g for 5 minutes. The supernatant was discarded and the cells were resuspended in DMEM 10% FBS. Cells were counted with a hemocytometer and cell viability was determined with Trypan blue stain [22].

Cytotoxicity and viability assay (MTS)

Cells (10⁴) were cultured in 96 well plates, maintained in DMEM medium supplemented with 10% FBS for 24 hours, then medium was removed and replaced for 100 µl of MFS (FBS free DMEM). Four different doses

of venom (50, 100, 200 and 400 µg/100 µl per well), were tested. Cyclophosphamide (Genoxal ® Baxter Oncology GmbH 400 µg/100 µl of medium) was used as positive control. Three replicates per treatment were conducted. After incubation, viable number of cells was estimated through a commercial (CellTiter 96 ® Aqueous One Solution kit, Promega Cat: G3580) MTS ([3 - (4, 5-dimethylthiazol-2-yl) -5 - (3-carboxymethoxyphenyl) - 2 -(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) colorimetric assay according to supplier's instructions. Colorimetric reaction was evaluated with a spectrophotometer (Epoch, 1209284) at 490 nm, where higher densitometry readings indicating larger cell viability.

Culture of macrophages

To determine whether the effect of the venom would affect viability of physiologically normal cells, we tested venom toxicity in Balb/C adult mice macrophages. Animals were inoculated with 1 ml of sodium thioglycolate intraperitoneally, 4 days later the mice were killed and cells were harvested by peritoneal lavage [18]. In brief: the peritoneal cavity was injected with 5 ml of cold RPMI-1640 and lightly massaged, injected fluid was aspirated and the cells were harvested and washed three times with PBS by centrifugation at 300 x g for 3 minutes. Subsequently cells were seeded in 96 well plates at a concentration of 1×10^6 cells/well in RPMI-1640 supplemented with 10% FBS. After incubation at 37 ° C for 2 h in 5% CO₂, the plate was washed twice with RPMI-1640 to remove non-adherent cells and macrophages (adherent cells) [35]. Macrophages were exposed to 0, 50, 100 and 400 µg/100 µl of crude venom in RPMI-1640 MFS. After 24 hours incubation period, cell viability was determined as previously described.

Apoptosis

To determine whether dying cells had undergone apoptosis, we used the EB-AO (Ethidium Bromide-Acridine Orange) staining method [22], adapted for 96-well plate [23]. In brief, 10^4 cells/well were seeded in a 96 flat bottom well plate (Cat: 83.1835, Sarsted), in FBS supplemented (10%) DMEM and incubated in controlled conditions (37 ° C and 5% CO₂). After 24 hours incubation period, medium was replaced with 100 µl of fresh MFS containing the different doses of venom previously described and incubated further for 24 hours under the same environmental conditions. Then, the plate was centrifuged at 129 x g for 5 min and 8 µl of EB-AO were added to each well. Cells were observed under a microscope (40X magnification) searching for the typical morphological changes induced by apoptosis, such as chromatin condensation, and apoptotic vesicles.

The experiment was documented with epifluorescence in a Leica DMIL microscope and a Nikon Coolpix S2500 digital camera.

References

1. Gomes A, Bhattacharjee P, Mishra R, Biswas AK, Dasgupta SC, Giri B: **Anticancer potential of animal venom and toxin.** *Indian J Exp Biol* 2010, **48**:93-103.
2. Wang WX, Ji YH: **Scorpion venom induces glioma cell apoptosis in vitro and inhibits glioma tumor growth in vivo.** *J Neurooncol* 2005, **73**:1-7.
3. Gupta DS, Debnath AS, Giri B, Tripathi G, Rajan J, Gomes A: **Indian black scorpion (Heterometrus bengalensis Koch) venom induced antiproliferative and apoptogenic activity against human leukemic cell lines U937 and K562.** *Leukemia Research* 2007, **31**:817-825.
4. Omran MA: **Cytotoxic and apoptotic effects of scorpion *Leiurus quinquestriatus* venom on 293T and C2C12 eukaryotic cell lines.** *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis* 2003, **9**:2.
5. Heinen TE, Gorini da Veiga AB: **Arthropod venoms and cancer.** *Toxicon* 2011, **57**:497-511.
6. Eauclaire-Martin MF, Couraud F: **Scorpion neurotoxins: effects and mechanisms.** In: Chang, L.W., Dyer, R.S. (Eds.), *Handbook of Neurotoxicology.* Marcell and Dekker, New York, pp. 683-716.
7. Sofer S: **Scorpion envenomation.** *Intensive Care Med* 2005, **21**:626-628.
8. Dyer N: **Venom: Miracle medicine.** Science world; 1999.
9. Benjamin CW, Hiebsch RR, Jones DA: **Caspase activation in MCF7 cell responding to etoposide treat.** *Mol Pharmacol* 1998, **53**:446-450.
10. D'Suze G, Rosales A, Salazar V, Sevcik C: **Apoptogenic peptides from *Tityus discrepans* scorpion venom acting against the SKBR3 breast cancer cell line.** *Toxicon* 2010, **56**:1497-1505.
11. Jäger H, Dreker T, Buck A, Giehl K, Gress T, Grissmer S: **Blockage of intermediate-conductance Ca₂p-activated K_p channels inhibit human pancreatic cancer cell growth in vitro.** *Mol Pharmacol* 2004, **65**:630-638.
12. Deshane J, Garner CC, Sontheimer H: **Chlorotoxin inhibits glioma cell invasion via matrix metalloproteinase-2.** *J Biol Chem* 2003, **278**:4135-4144.

13. Gupta SD, Gomes A, Debnath A, Saha A, Gomes A: **Apoptosis induction in human leukemic cells by a novel protein Bengalin, isolated from Indian black scorpion venom: through mitochondrial pathway and inhibition of heat shock proteins.** *Chem Biol Interact* 2010, **183**:293–303.
14. Zargan J, Umar S, Sajad M, Naime M, Ali S, Khan H: **Scorpion venom (*Odontobuthus doriae*) induces apoptosis by depolarization of mitochondria and reduces S-phase population in human breast cancer cells (MCF-7).** *Toxicology in Vitro* 2011, **25**:1748–1756.
15. Zargan J, Umar S, Sajad M, Naime M, Ali S, Khan H: **Scorpion (*Odontobuthus doriae*) venom induces apoptosis and inhibits DNA synthesis in human neuroblastoma cells.** *Mol Cell Biochem* 2011, **348**:173–181.
16. Betancourt HO, Hernández IC, Huerta EI, Ramírez LA, Del-Risco RJ, Rodríguez PA: **Evaluación de la toxicidad in vitro del veneno del alacrán *Rophalurus junceus* a través de un ensayo celular.** *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas* 2009, **28**:1-11.
17. Wang WX, Ji YH: **Scorpion venom induces glioma cell apoptosis in vitro and inhibits glioma tumor growth in vivo.** *J Neurooncol* 2005, **73**:1–7.
18. Petricevich VL, Lebrun I: **Immunomodulation effects of the *Tityus serrulatus* venom on murine macrophage functions in vitro.** *Mediat Inflamm* 2005, **24**:39–49.
19. Petricevich VL, Reynaud E, Cruz AH, Possani LD: **Macrophage activation, phagocytosis and intracellular calcium oscillations induced by scorpion toxins from *Tityus serrulatus*.** *Clinical and Experimental Immunology* 2008, **154**:415–423.
20. Gao L, Shan B, Cheng J, Liu J, Son D, Zhu B: **Effect of spider *Macrothele raven* venom on cell proliferation and cytotoxicity in Hela cell.** *Act Pharm Sinc* 2005, **26**(3):369-376.
21. Ben-Sasson S, Shaviv R, Bentwich Z, Slavin S, Doljanski F: **Osmotic behavior of normal and leukemic lymphocytes.** *Blood* 1975, **46**:891-899.
22. McGahon JA, Seamus MJ, Reid BP, Artin M, Yufang S: **The End of the (Cell) Line: Methods for the Study of Apoptosis in Vitro.** *Meth in cell biol* 1995, **46**:170-173.
23. Ribble D, Nathaniel BG, Norris DA, Yiqun GS: **A simple technique for quantifying apoptosis in 96-well plates.** *BMC Biotechnology* 2005 **5**:1-7.

24. Prevarskaya N, Skryma R, Shuba Y: **Ion channels and the hallmarks of Cáncer.** *Trends in Molecular Medicine* 2010, **16**:107-121.
25. Holinger EP, Chittenden T, Lutz RJ: **Bak BH3 peptides antagonize Bcl-xL function and induce apoptosis through cytochrome c-independent activation of caspasas.** *J Biol Chem* 1999, **274**(19):13298-13304.
26. Datta R, Oki E, Biedermann V, Ren J, Kufe D: **XIAP Regulates DNA damage-induced apoptosis downstream of caspase-9 cleavage.** *J Biol Chem* 2000, **275**:31733-31738.
27. Dosne PC: **Las células Hela como prototipo del cultivo celular inmortalizado.** *Medicina* 2006, **66**:487-488.
28. Klug SW, Cummings RM, Spencer AC: **Regulación del ciclo celular y cancer.** In Genetic Concept. 8th Edition. Edited by Perarson education. Madrid: Prentice Hall; 2006:502-522.
29. Lang PA, Kaiser S, Myssina S, Wieder T, Huber SM: **Role of Ca²⁺-activated K channels in human erythrocyte apoptosis.** *Am J Physiol Cell Physiol* 2003, **285**:1553-1560.
30. Lang F, Stephan MH, Ildiko S, Erich G: **Plasma membrane ion channels in suicidal cell death.** *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2007, **462**:189-194.
31. Diaz NA: **Alacranes de la República Mexicana: clave para identificar especies de centrurus (scorpionida:buthidae).** *Rev Inter Sal Publ Mex* 1966, **26**(2):109:123.
32. Martin BM, Ramirez AN, Gurrola GB, Nobile M, Prestipino G, Possani LD: **Novel K⁺-channel-blocking toxins from the venom of the scorpion *Centruroides limpidus limpidus* Karsch.** *Biochem J* 1994, **304**:51-56.
33. NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999: **Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.** *Diario Oficial de la Federacion* 1999.
34. National Academic of Science: **Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.** Eighth Edition, National Academic Press, Washintong DC; 2011.
35. Petricevich VL, Hernandez CA, Coronas FV, Possani LD: **Toxin gamma from *Tityus serrulatus* scorpion venom plays an essential role in immunomodulation of macrophages.** *Toxicon* 2007, **50**:666-675.

36. Mitry RR, Hughes RD: Human cell culture protocols. Methods in molecular Biology, Second edition, Human Press, Springer; 2004.
37. Freshney R I: Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, Fifth Edition, John Wiley & Sons, Inc; 2005.

Figure 1 - Bioactivity of collected Cll venom

Venom bio-activity at different days post-collection was determined in Balb/C mice 4 weeks old, no statistically differences ($P > 0.05$) among treatments was found, even though a lower bio-activity tendency was observed in venom 8 days post-collection; $X = 6.00$.

Figure 2 - Morphology of HeLa cells treated with Cll crude venom.

Morphology of HeLa cells after 24 h incubation with MFS, only one dose is shown since no differences were observed among different doses. 2A. venom dose 400 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$, 2B. Untreated control cells.

Figure 3 - MTS Metabolism in HeLa cell.

MTS metabolism in HeLa cells after treatment with different doses of venom 50-400 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ of medium, positive Control (CFF, cyclophosphamide 400 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$) and CST (negative control). Optical density (OD) was read at 490 nm, the data were plotted according to the mean and SD. Showing significant difference between the mean of the treatments with respect to the positive control but not for the negative control. $P < 0.05$, $X = 11.57$.

Figure 4 - MTS Metabolism by macrophages

MTS metabolism by macrophages and viability percentage showing significant difference between treatment means $P < 0.05$, $X = 6.00$.

Figure 5 - Apoptosis in HeLa cell.

Images showing HeLa cells after treatment with scorpion venom, A): Cells treated with scorpion venom to 400 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$, B): Ctrl + showing apoptotic cells treated with cyclophosphamide (400 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$).

Bioactivity of venom collected in mice Balb/C

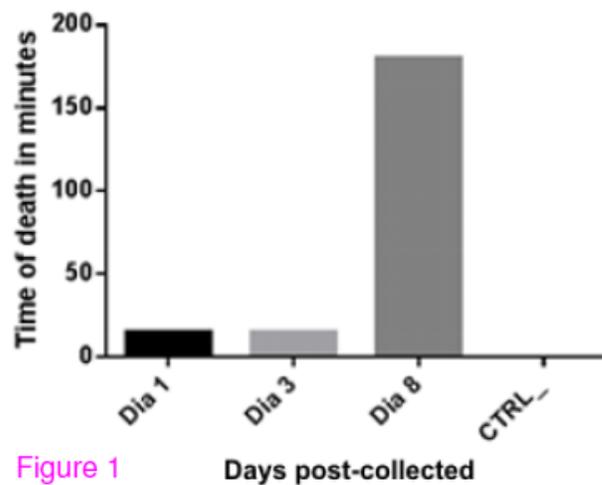


Figure 1

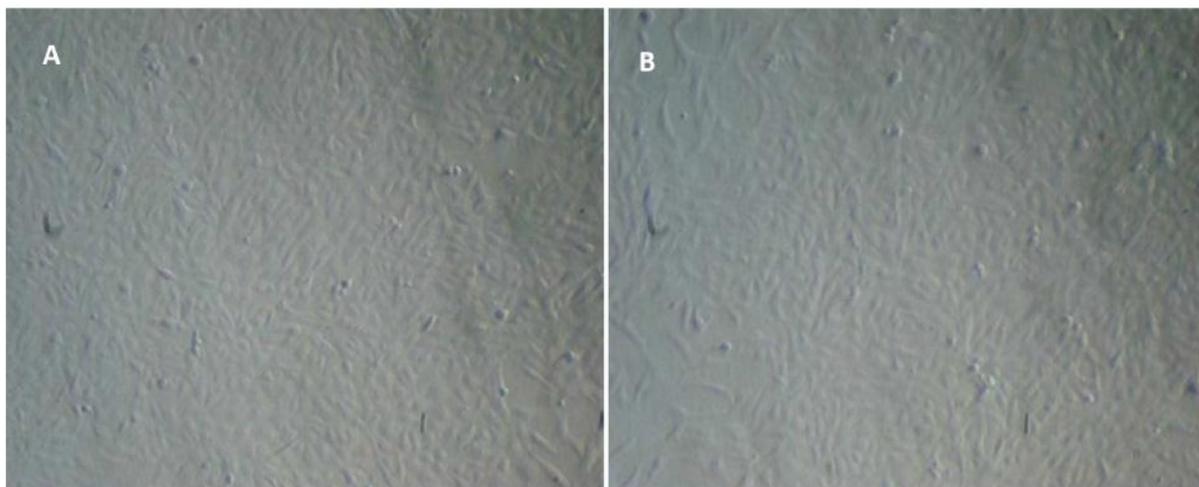


Figure 2

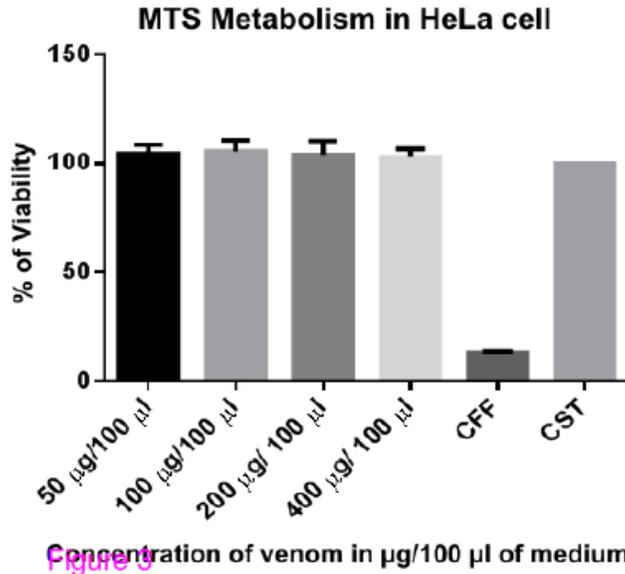


Figure 3

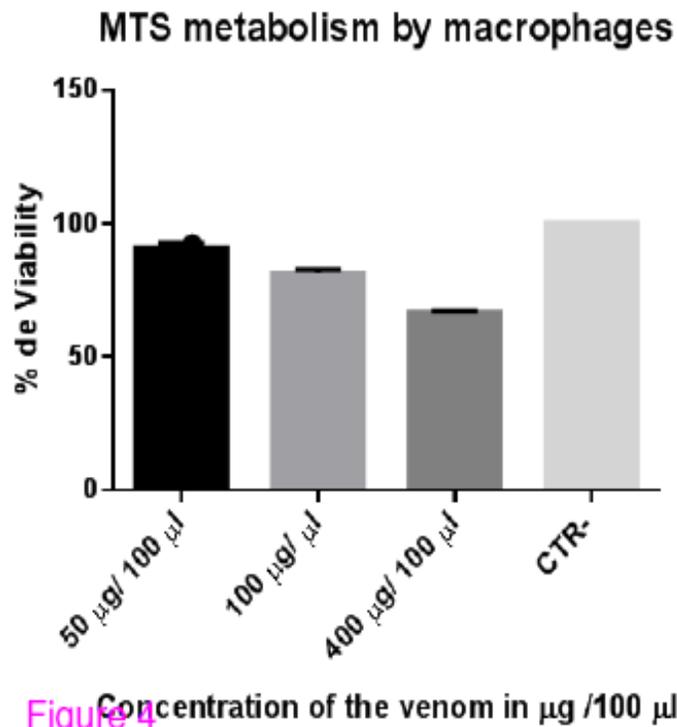


Figure 4

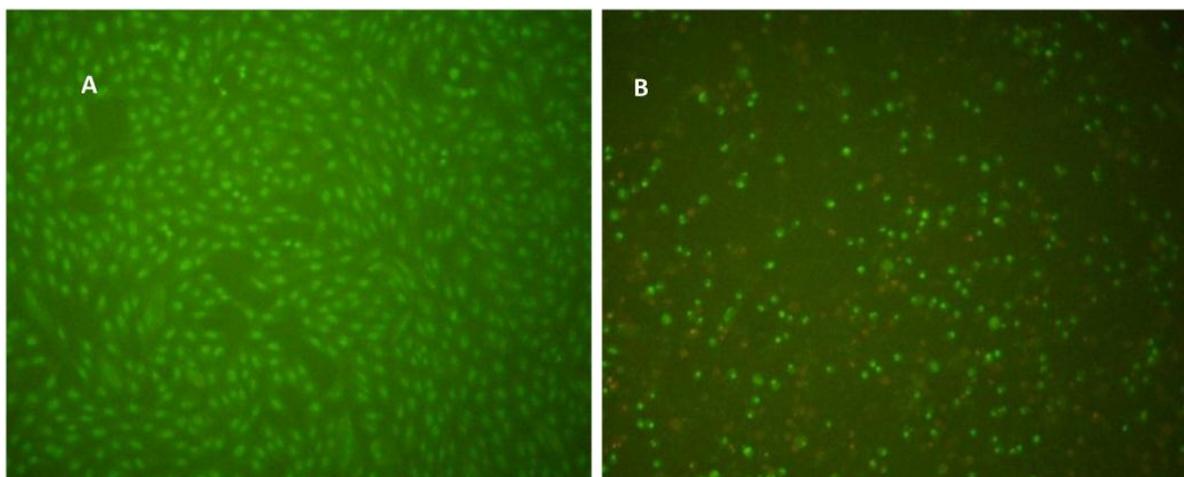


Figure 5

11. DISCUSIÓN GENERAL

Según lo reportado por varios autores, la exposición con veneno de alacrán sobre varias líneas celulares cancerosas se caracteriza por un claro cambio en la morfología celular al perderse la monocapa, contraerse la célula, y en su caso lisis por el efecto necrótico (Zargan *et al.*, 2011a, b; Betancourt *et al.*, 2007; Wang y Ji, 2005), nuestros resultados no muestran el efecto característico (Figura 6), tras el tratamiento con veneno crudo del CII. Dada la falta de actividad del veneno sobre las células, se pensó que una posible causa podría deberse a que el veneno perdiera su actividad biológica relativamente rápido después de ser colectado. Por lo tanto se evaluó la toxicidad del veneno en ratones Balb/C para determinar si el veneno era activo después de la ordeña y días consecutivos. Como nos muestra la gráfica: el veneno obtenido es estable los primeros 3 días y después va disminuyendo su actividad paulatinamente (Figura 5), pues al inocular a ratones de 4 semanas el lapso entre el momento de la inoculación y la muerte del animal no cambia los primeros tres días pero se incrementa de manera proporcional al tiempo post-ordeña (Tabla 3) y los síntomas registrados de alacranismo coinciden con lo reportado (Petricevich *et al.*, 2005).

Por su parte, el ensayo de metabolismo del MTS revela que no se indujo muerte celular de las células Hela (Figura 7), (Tabla 1) en tratamiento y no corresponde con lo reportado con veneno crudo o de otras especies (Omran, 2003; Zargan *et al.*, 2011a, 2011b), en donde se ha descrito que la viabilidad se ve afectada de manera dosis dependiente. Por otra parte nuestras células control en este caso macrófagos obtenidos de ratones de la cepa Balb/C mostraron muerte celular tras incubar con veneno crudo de alacrán de la especie CII (Tabla 2), tal como se ha reportado con el veneno del alacrán *Tityus serrulatus* en el cual se indujo muerte de estas células en un 5 % por lisis al incubar con 50 µg/ ml (Petricevich *et al.*, 2008), en nuestro estudio, nosotros mostramos porcentajes de muerte celular del 9.3 % a esa concentración y 33 % a 400 µg/ 100 ml (Figura 8). Por tanto, podemos indicar que el veneno crudo de la especie en estudio, podría tener algún efecto en otras líneas celulares cancerosas distintas a las Hela, tal como se observó en nuestro control donde empleamos células normales como los macrófagos los cuales resultaron afectados.

Interesantemente en un estudio donde emplean veneno de araña de la especie *Macrotele raven* mostraron que induce muerte celular por apoptosis y muestra citotoxicidad de manera dosis y tiempo dependiente sobre células HeLa (Gao *et al.*, 2005). Sin embargo, sus hallazgos pudieran ser malinterpretados debido a que diluyeron el veneno en PBS, a lo que ciertamente en base a resultados nuestros (Figura 4) y a lo reportado por Ben-Sasson *et al.*, en 1975, el incubar células con PBS por 24 horas provoca lisis celular debido a un shock osmótico. Nosotros observamos que diluyendo el veneno en PBS, se obtiene los resultados que ellos presentan en su reporte concordando con ellos que el mayor porcentaje de muerte se debe a necrosis y en segundo término a la apoptosis. Nosotros al evaluar el efecto del veneno en PBS-veneno y PBS solo observamos los mismos resultados por lo que adjudicamos muerte celular debido al PBS y no al veneno, por otra diluyendo el veneno en agua doble destilada como en otros protocolos (D'Suze *et al.*, 2010), no apreciamos el efecto de muerte celular.

El tipo de muerte más reportado al incubar células cancerosas con veneno crudo o fraccionado de alacrán es la apoptosis. Por ejemplo se ha descrito, la participación de

receptores de membrana como fas-L el cual activa la rutas extrínsecas de la apoptosis, y además la activación de las distintas caspasas ejecutoras e iniciadoras de la ruta apoptótica como la 9, la 8 y la 3, (D'Suze *et al.*, 2010). También ha sido reportado que el veneno eleva la producción de Óxido Nítrico (ON) y Reactivos Intermediarios de Nitrógeno (RIN) causantes de la despolarización de la membrana mitocondrial y liberación de factores pro-apoptóticos que activan la ruta intrínseca de la apoptosis (Zargan *et al.*, 2011a; 2011b). En el presente estudio no observamos muerte celular en células HeLa ni por lisis ni por apoptosis. Sin embargo, como notamos en nuestro control positivo, la apoptosis se induce con el antineoplásico ciclofosfamida (Ctrl +) (Figura 9) donde se pueden observar notorios cambios celulares como contracción celular y pérdida de contacto con otras células, y a la tinción con BE-AO revelan condensación de la cromatina, que son característicos de la apoptosis (McGahon *et al.*, 1995, Rible *et al.*, 2005).

La posible razón de la ausencia de efecto del veneno sobre células Hela post-tratamiento, es la ausencia de blancos específicos en la membrana celular debido a la pérdida de proteínas que componen los canales iónicos, lo cual pudiera deberse al fenotipo maligno en la línea celular bajo estudio, pues se ha reportado que la célula cancerosa tiene el potencial de regular la expresión génica de canales iónicos de acuerdo a las necesidades propias de la misma (Prevarskaya *et al.*, 2010).

Mucho se ha reportado respecto a la resistencia de células cancerosas a nuevos fármacos y tratamientos. Las razones son muchas, sin embargo las más importantes involucran la sobreexpresión de genes codificadores de proteínas bloqueadores de mecanismos que puedan encender la ruta de muerte. Por ejemplo se ha reportado que en células HeLa, hay una sobreexpresión de la molécula Bcl-2 y XIAP que confieren resistencia a apoptosis (Holinger *et al.*, 1999). Se ha demostrado que si se induce una baja regulación de XIAP es posible sensibilizar a la célula cancerosa a entrar a apoptosis por fármacos contra el cáncer (Datta *et al.*, 2006). Otro aspecto a considerar es que la proteína E6 que es una proteína propia del virus del papiloma humano tiene la capacidad de degradar al guardián del genoma P53 e inhibe su actividad (Dosne, 2006), ha sido demostrado que esta característica impide que la transcripción del pro-apoptótico BAX se active y por tanto en células cancerosas, donde P53 no es funcional, el nivel de proteína BAX no se incrementa como resultado de daño celular y la célula no puede disparar la ruta de la apoptosis. En células normales la proteína BAX forma heterodímeros con Bcl-2 y la célula es viable, cuando p53 estimula la transcripción del gen BAX por algún daño celular, los niveles de esta proteína se incrementan y se forman homodímeros BAX, esto permitirán que factores pro-apoptóticos como Citocromo-c sea liberado e inicie la muerte celular por apoptosis (Klug, 2006).

Por otra parte, también se ha demostrado en varios tipos celulares que el uso de bloqueadores de canales iónicos de K^+ y Ca^{2+} puede inhibir el proceso que dispara las vías de muerte celular por apoptosis (Lang *et al.*, 2003), por lo que cabe la posibilidad de que el veneno de la especie *Centruroides limpidus limpidus* bajo estudio presente bloqueadores de canales iónicos, que impiden la activación de las rutas de señalización de la cascada apoptótica, ya que se ha reportado que el bloqueo del eflujo de iones K^+ provocaría una despolarización de la membrana y forzaría la entrada de iones Ca^{2+} que activarían caspasas ejecutoras de la apoptosis (Lang *et al.*, 2007)

Es posible que por estas mismas razones no existan reportes acerca de toxicidad de veneno de ningún otro alacrán sobre este tipo de células. Sin embargo, nuestros resultados demuestran que el veneno del *Cll* si tiene efecto al inducir muerte celular sobre macrófagos, por lo cual cabe la posibilidad de que éste veneno tenga actividad sobre células cancerígenas diferentes a las HeLa por lo que el veneno de *Cll* debe ser estudiado con mayor detenimiento para evaluar su posible valor como agente anticancerígeno.

12. CONCLUSIONES

Las células Hela no muestran efecto tras el tratamiento con el veneno crudo de la especie *Centruroides limpidus limpidus*, posiblemente por ausencia de blancos específicos en las células Hela a las moléculas del veneno de alacrán *Cll*, por lo que el veneno de esta especie no es candidato para el tratamiento del cáncer cérvicouterino y es necesario realizar estudios prospectivos en otras líneas celulares cancerosas distintas para observar el comportamiento tras el tratamiento con veneno de *Cll*.

A pesar de que algunos protocolos establecen diluir el veneno en PBS nosotros sugerimos no hacerlo en este tipo de investigaciones pues el incubar con PBS al menos en las células HeLa se observa ser el responsable de inducir muerte celular y probablemente este mismo efecto sea evidenciado en otras líneas celulares.

13. REFERENCIAS

1. Kini RM: **Anticoagulant proteins from snake venoms: structure, function and mechanism.** *Biochem J* 2006, **397**:377–387.
2. Heinen TE, Gorini da Veiga AB: **Arthropod venoms and cancer.** *Toxicon* 2011, **57**:497–511.
3. Gomes A, Bhattacharjee P, Mishra R, Biswas AK, Dasgupta SC, Giri B: **Anticancer potencial of animal venom and toxin.** *Indian J Exp Biol* 2010, **48**:93–103.
4. Wang WX, Ji YH: **Scorpion venom induces glioma cell apoptosis in vitro and inhibits glioma tumor growth in vivo.** *J Neurooncol* 2005, **73**:1–7.
5. Gupta DS, Debnath AS, Giri B, Tripathi G, Rajan J, Gomes A: **Indian black scorpion (*Heterometrus bengalensis* Koch) venom induced antiproliferative and apoptogenic activity against human leukemic cell lines U937 and K562.** *Leukemia Research* 2007, **31**:817–825.
6. Omran MA: **Cytotoxic and apoptotic effects of scorpion *Leiurus quinquestriatus* venom on 293T and C2C12 eukaryotic cell lines.** *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis* 2003, **9**:2.
7. Veiga, A.B.G., Berger, M., Guimarães, J.A., 2009. *Lonomia obliqua* venom: Pharmacotoxicological effects and biotechnological perspectives. In: De Lima, M.E., Pimenta, A.M.C., Martin-Eauclaire, M.F., Zingali, R.B., Rochat, H. (Eds.), *Animal Toxins: State of the Art: Perspectives in Health and Biotechnology*. UFMG, Belo Horizonte, pp. 372–390.
8. Granja VM, Martínez ZR, Chico AP: **Alacranismo.** *Alergia, Asma e imunología Pediátricas* 1999, **8**(4): 109-112.
9. Martin-Eauclaire MF, Couraud F: **Scorpion neurotoxins: effects and mechanisms.** In: Chang, L.W., Dyer, R.S. (Eds.), *Handbook of Neurotoxicology*. Marcell and Dekker, New York, pp. 683–716.
10. Sofer S: **Scorpion envenomation.** *Intensive Care Med* 2005, **21**:626-628.
11. Possani LD, Becerril B, Delepierre M, Tytgat J: **Scorpion toxins specific for Na⁺ channels.** *Eur J Biochem* 1999, **264**:287-300.
12. Jäger H, Dreker T, Buck A, Giehl K, Gress T, Grissmer S: **Blockage of intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels inhibit human pancreatic cancer cell growth in vitro.** *Mol Pharmacol* 2004, **65**:630–638.
13. Deshane J, Garner CC, Sontheimer H: **Chlorotoxin inhibits glioma cell invasion via matrix metalloproteinase-2.** *J Biol Chem* 2003, **278**:4135–4144.
14. Dyer N: **Venom: Miracle medicine.** Science world; 1999.
15. Gupta SD, Gomes A, Debnath A, Saha A, Gomes A: **Apoptosis induction in human leukemic cells by a novel protein Bengalin, isolated from Indian black scorpion venom: through mitochondrial pathway and inhibition of heat shock proteins.** *Chem Biol Interact* 2010, **183**:293–303.
16. D'Suze G, Rosales A, Salazar V, Sevcik C: **Apoptogenic peptides from Tityus discrepans scorpion venom acting against the SKBR3 breast cancer cell line.** *Toxicon* 2010, **56**:1497–1505.
17. Benjamin CW, Hiebsch RR, Jones DA: **Caspase activation in MCF7 cell responding to etoposide treat.** *Mol Pharmacol* 1998, **53**:446-450.

18. Muños GC: **Determinación del efecto de la toxina II de Centruroides noxius hoffman, sobre la proliferación in vitro de linfocitos murinos.** Tesis de licenciatura. UAEM, CB15; 1994.
19. Escobar E, Rivera C, Tincopa L, Rivera D: **Partial Purification of Toxins HI1, HI2 AND HI3 From Hadruides lunatus KOCH, 1867 Scorpion Venom (SCORPIONIDA: VEJOVIDAE).** *Rev peru biol* 2002, **9**(1):3–10
20. Possani LD: El alacran y su piquete. Primera Edición, Dirección General de Divulgación de la Ciencia, UNAM México; 2005.
21. Tay ZJ, Díaz SJ., Sánchez V, Castillo AL, Ruiz D, Calderón RL: **Picaduras por alacranes y arañas ponzoñosas de México.** *Rev Fac Med* 2004, **47**(1).
22. Coronas FI, Balderas C, Pardo-López L, Possani LD, Gurrola GB: **Amino Acid Sequence Determination and Chemical Synthesis of CIIERG1(gamma KTx1.5), a K Channel Blocker Peptide Isolated from the Scorpion Centruroides limpidus limpidus.** *J Braz Chem Soc* 2005, **16**(3):404-411.
23. Martin BM, Ramirez AN, Gurrola GB, Nobile M, Prestipino G, Possani LD: **Novel K⁺-channel-blocking toxins from the venom of the scorpion Centruroides limpidus limpidus Karsch.** *Biochem J* 1994, **304**:51-56.
24. Petricevich VL, Lebrun I: **Immunomodulation effects of the Tityus serrulatus venom on murine macrophage functions in vitro.** *Mediat Inflamm* 2005, **24**:39-49.
25. Ponce SJ, Francke FO: **Una nueva especie del género Centruroides Marx (1890), (Scorpiones, Buthidae) de la depresión del balsas México.** *Acta Zoológica Mexicana* 2004, **20**(2): 221-232.
26. Guzmán SH: **Purificación y caracterización bioquímica de toxinas del alacrán Centruroides limpidus limpidus.** Tesis de licenciatura, UNAM, México; 1984.
27. Torroela KM, Villa TS: **Bases genéticas del cáncer.** Primera Edición. Instituto Nacional de Cancerología, FCE, México; 1998
28. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson DJ: **Biología Molecular de la Célula.** Tercera Edición. Ediciones Omega; 2002.
29. OMS: Cancer. [<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/index.html>.]
30. Klug SW, Cummings RM, Spencer AC: **Regulación del ciclo celular y cancer.** In Genetic Concept. 8th Edition. Edited by Perarson education. Madrid: Prentice Hall; 2006:502-522.
31. McGavin MD, Zachary JF: **Pathology basic of veterinary disease.** Fourth Edition. Mozby Elseiver. Pp: 253-298; 2007.
32. Hanahan D, Weinberg AR: **Hallmarks of Cancer: The Next Generation.** *Cell* 2011, **144**.
33. OMS: Mejor detección, tratamiento y vacunas asequibles para prevenir muertes por cancer cervicouterino. [http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=142%3A%20Abetter-screening%20-treatment%20-and-affordable-vaccines-can-prevent-doubling-of-cervical-cancer-deaths-&catid=1872%3A%20hds0201b-cancer-content&lang=es].
34. Linaldi-Yépez F, Hernández-Cruz L, Apresa-García T: **Indicadores de calidad en la detección oportuna de cáncer.** *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* 2010, **48**(3):243-252.

35. McMurray HR, Nguyen D, Westbrook TF, McAnce DJ: **Biology of human papillomaviruses.** *Int J Exp Pathol* 2001, **82**:15-3.
36. Doeberitz VK: **New markers for cervical dysplasia to visualise the genomic chaos created by aberrant oncogenic papillomavirus infections.** *Eur J Cancer* 2002, **38**:2229-2242.
37. Jayshree RS, Sreenivas A, Tessa M, Krishna S: **Cell intrinsic & extrinsic factors in cervical carcinogenesis.** *J Med Res* 2009, **13**:286-295.
38. Reimers L, Anderson W, Rosenberg P, Henson D, Castle P: **Etiologic Heterogeneity for Cervical Carcinoma by Histopathologic Type, using comparative age period-cohort models.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009, **18**(3):792-799.
39. Medeiros LR, Dornelles D, da Rosa MI, Bozzetti MC, Ruviaro R: **Efficacy of Human Papillomavirus Vaccines: A Systematic Quantitative Review.** *Int J Gynecol Cancer* 2009, **19**:1166-1176.
40. Lizano Marcela A, Carrillo-García A, Contreras-Paredes A: **Infección por virus del Papiloma Humano: Epidemiología, Historia Natural y Carcinogénesis.** *Cancerología* 2009, **4**:205-216.
41. Fulda S, Debatin KM: **Modulation of apoptosis signaling for cancer therapy.** *Arch Immunol Ther Exp* 2006, **54**:173-175
42. Bortner CD, Cidlowski JA: **The role of apoptotic volume decrease and ionic homeostasis in the activation and repression of apoptosis.** *Pflugers Arch* 2004; **448**:313-318.
43. Gorczyca W, Bruno S, Darzynkiewicz Z: **DNA strand breaks occurring during apoptosis: Their early in situ detection by the terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays and prevention by serine protease inhibitors.** *Int J Oncol* 1993, **1**:639-648.
44. Danial N, Kormeyer S: **Cell Death: Critical control points.** *Cell* 2004, **116**(2):205-219.
45. Leyton L, Quest F: **Supramolecular complex formation in cell signaling and disease: an update on a recurrent theme in cell life and death.** *Biol Res* 2004, **37**(1):29-43.
46. Shirokova AV: **Apoptosis. Signaling Pathways and Cell Ion and Water Balance.** *Cell and Tissue Biology* 2007, **1**(3): 215-224.
47. Gulbins E, Jekle A: **Physiology of apoptosis.** *Am J Physiol Renal* 2000, **279**(4):605-615.
48. Shi Y: **Caspase activation, inhibition, and reactivation: A mechanistic view.** *Protein Science* 2004, **13**:1979-1987.
49. Schinoni MI, Paraná R: **Apoptosis y progresión de fibrosis hepática en enfermedades del hígado.** *Acta Gastroenterol Latinoam* 2006; **36**:211-217.
50. Myrtle AD: **Apoptosis: Methods in Pharmacology and Toxicology: Approaches to Measurement and Quantification.** Edited by: M. A. Davis © Humana Press Inc., Totowa, NJ.
51. Prevarskaya N, Skryma R, Shuba Y: **Ion channels and the hallmarks of Cáncer.** *Trends in Molecular Medicine* 2010, **16**(3).
52. Suppiramaniam V, Abdel-Rahman EA, Buabeid MA, Parameshwaran: **Ion Channels,** In Nervous System and Behavioral Toxicology. Edited by McQueen CA. Oxford; 2010:129-171. [Comprehensive Toxicology, Vol 13.]

53. Jimenez LF, Merchant H: *Biología Celular y Molecular*. Primera Edición. Pearson Education; 2003.
54. Meir A: **Involvement of Ion Channels in Apoptosis**. *Modulator* 2004, **18**:1-7.
55. Lang F, Stephan MH, Ildiko S, Erich G: **Plasma membrane ion channels in suicidal cell death**. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2007, **462**:189–194
56. Shrode LD, Tapper H, Grinstein S: **Role of Intracellular pH in proliferation, Transformation, and Apoptosis**. *J Bioenerg Biomembr* 1997, **29**:393–399.
57. Matsuyama S, Reed JC: **Mitochondria-Dependent Apoptosis and Cellular pH Regulation**. *Cell Death Differ* 2000, **7**:1155–1165.
58. Zargan J, Umar S, Sajad M, Naime M, Ali S, Khan H: **Scorpion venom (Odontobuthus doriae) induces apoptosis by depolarization of mitochondria and reduces S-phase population in human breast cancer cells (MCF-7)**. *Toxicology in Vitro* 2011, **25**:1748–1756.
59. Zargan J, Umar S, Sajad M, Naime M, Ali S, Khan H: **Scorpion (Odontobuthus doriae) venom induces apoptosis and inhibits DNA synthesis in human neuroblastoma cells**. *Mol Cell Biochem* 2011, **348**:173–181.
60. Betancourt HO, Hernández IC, Huerta EI, Ramírez LA, Del-Risco RJ, Rodríguez PA; **Evaluación de la toxicidad in vitro del veneno del alacrán Ropalurus junceus a través de un ensayo celular**. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas* 2009, **28**:1-11.
61. Soroceanu L, Manning TJ, Sontheimer H: **Modulation of glioma cell migration and invasion using Cl⁻ and K⁺ ion channel blockers**. *J Neurosci* 1999, **19**:5942–5954.
62. Veiseh M, Gabikian P, Bahrami SB, Veiseh O, Zhang M, Hackman RC, Ravanpay AC, Stroud MR, Kusuma Y, Hansen SJ, Kwok D, Munoz NM, Sze RW, Grady WM, Greenberg NM, Ellenbogen RG, Olson JM: **Tumor paint: a chlorotoxin: Cy5.5 bioconjugate for intraoperative visualization of cancer foci**. *Cancer Res*. 2007, **67**:6882–6888.
63. Carol, G. A.; Gonda, M. A.; Alvarez, V. L. (2005): **Chlorotoxin, a small peptide derived from scorpion venom, targets cancer cells via a phosphatidylinositol phosphate**. *Proc Amer Assoc Cancer Res* 2005, **46**.
64. Mamelak AN, Rosenfeld S, Bucholz R, Raubitschek A, Nabors LB, Fiveash JB, Shen S, Khazaeli MB, Colcher D, Liu A, Osman M, Guthrie B, Schade-Bijur S, Hablitz DM, Alvarez VL, Gonda MA: **Phase I single-dose study of intracavitary-administered iodine-131-TM-601 in adults with recurrent high-grade glioma**. *J Clin Oncol* 2006, **24**:3644–3650.
65. Fu YJ, Yin LT, Liang AH, Zhang CF, Wang W, Chai BF, Yang JY, Fan XJ: **Therapeutic potential of chlorotoxin-like neurotoxin from the Chinese scorpion for human gliomas**. *Neurosci Lett* 2007, **412**:62–67.
66. Díaz GA, Morier DL, Rodríguez SH: **Citotoxicidad del veneno del escorpión cubano Ropalurus junceus y sus fracciones sobre líneas celulares tumorales humanas**. *Revista Intitucional de Producciones Biofarmaceuticas y Quimicas, LABIOFAM*, 2010 **1**:13-20
67. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999: **Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio**. *Diario Oficial de la Federación* 1999.

68. *National Academic of Science: Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Eighth Edition, National Academic Press, Washintong DC; 2011.*
69. Petricevich VL, Lebrun I: **Immunomodulation effects of the Tityus serrulatus venom on murine macrophage functions in vitro.** *Mediat Inflamm* 2005, **24**:39-49.
70. Petricevich VL, Hernandez CA, Coronas FV, Possani LD: **Toxin gamma from Tityus serrulatus scorpion venom plays an essential role in immunomodulation of macrophages.** *Toxicon* 2007, **50**:666-675.
71. McGahon JA, Seamus MJ, Reid BP, Artin M, Yufang S: **The End of the (Cell) Line: Methods for the Study of Apoptosis in Vitro.** *Meth in cell biol* 1995, **46**:170-173.
72. Ribble D, Nathaniel BG, Norris DA, Yiqun GS: **A simple technique for quantifying apoptosis in 96-well plates.** *BMC Biotechnology* 2005 **5**:1-7.
73. Diaz NA: **Alacranes de la Republica Mexicana: clave para identificar especies de centrurus (scorpionida:buthidae).** *Rev Inter Sal Publ Mex* 1966, **26**(2):109:123.
74. Mitry RR, Hughes RD: **Human cell culture protocols.** *Methods in molecular Biology*, Second edition, Human Press, Springer; 2004.
75. Freshney R I: **Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique**, Fifth Edition, John Wiley & Sons, Inc; 2005.

14. ANEXOS

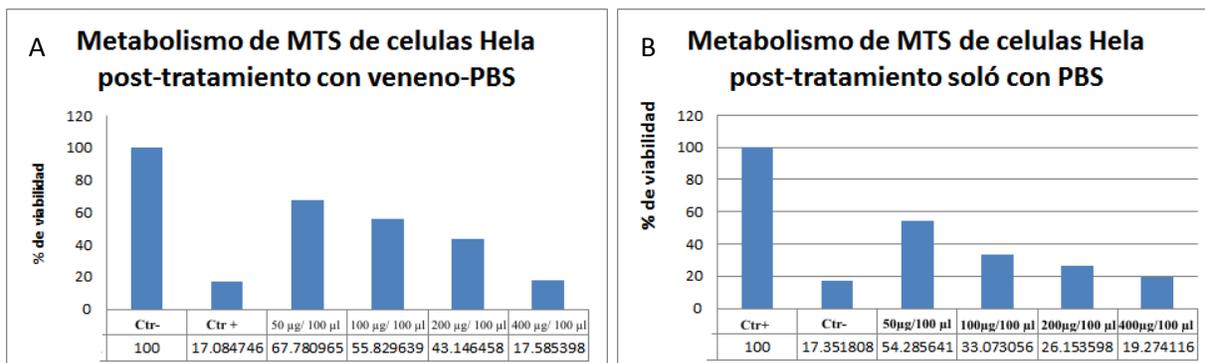


Figura 4: **A).** Metabolismo de MTS en células HeLa post-tratamiento con diferentes dosis de veneno crudo de alacrán correspondientes a 50-400µg/100 µl diluido en PBS 1X, Ctrl +: Ciclofosfamida (400 µg/100 µl) y Ctrl- : células sin tratamiento, registrado a una densidad óptica de 490 nm. **B).** Metabolismo de MTS en células HeLa tratadas solo con PBS 1X correspondiente a los volúmenes equivalentes empleados en el experimento anterior, Ctrl +: Ciclofosfamida (400 µg/100 µl) y Ctrl- : células sin tratamiento, registrado a una densidad óptica de 490 nm

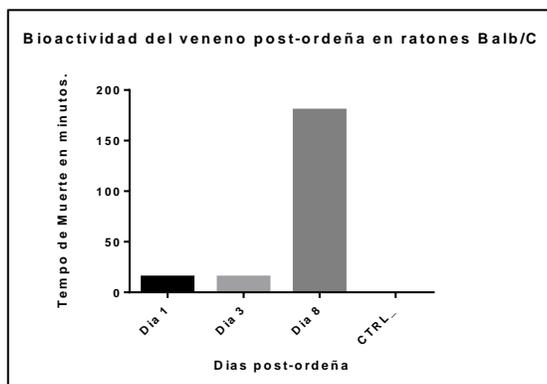


Figura 5: Actividad del veneno en ratones Balb/C de 4 semanas de acuerdo al tiempo post-ordeña y su tiempo de muerte. No se encontraron diferencias estadísticas entre las medias, $P < 0.05$, $X = 6.00$.

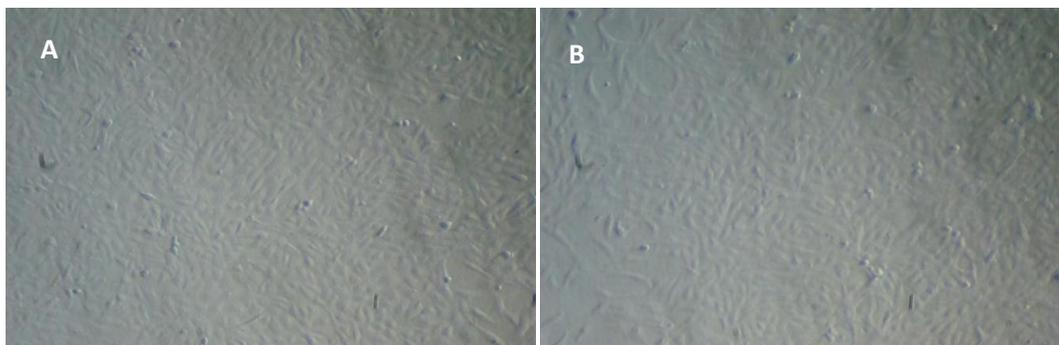


Fig. 6: A)Células HeLa después de 24 h de incubación con MFS y dosis de veneno de 400 µg/ 100 µl, 2B. Células control sin tratamiento

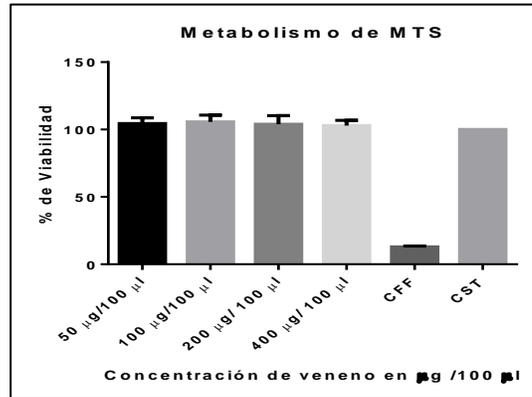


Fig. 7. Metabolismo de MTS en células HeLa post-tratamiento con diferentes dosis de veneno crudo de alacrán correspondientes a 50-400µg/100 µl, CFF (400 µg/100 µl) y CST, registrado a una densidad óptica de 490 nm, los datos son graficados en base a la Media y SD. Mostrando diferencia significativa entre la media de los tratamientos con respecto al control positivo pero no respecto a el control negativo. $P < 0.05$, $X = 11.57$

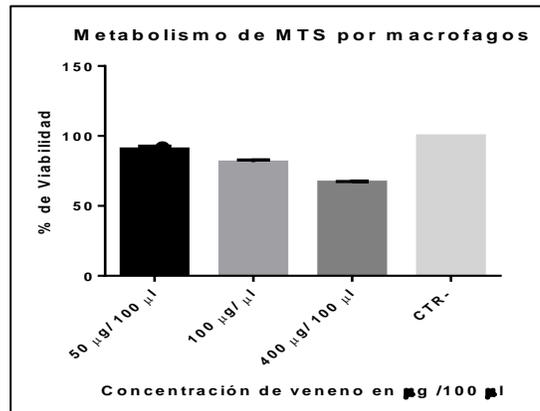


Fig. 8. Metabolismo de MTS por macrófagos mostrando porcentaje de viabilidad y diferencia significativa entre las medias de los tratamientos $P < 0.05$, $X = 6.00$.

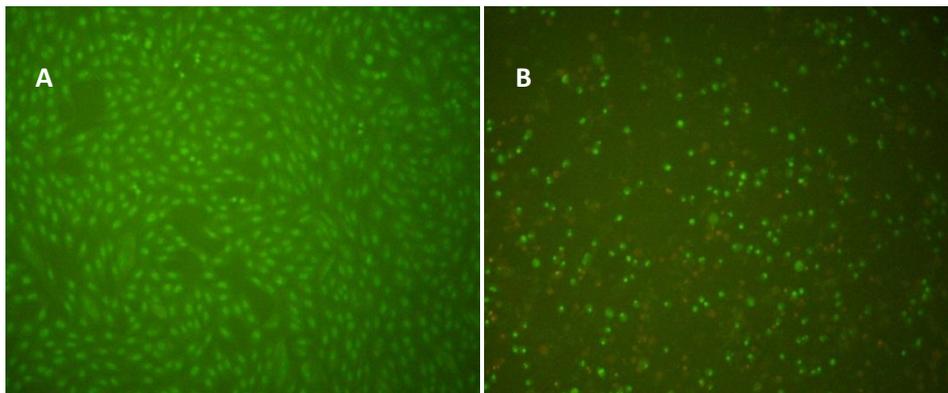


Figura 9: Células HeLa post-tratamiento con veneno de alacrán, A): Células tratadas con veneno de alacrán a 400 µg/100 µl veneno, B): CST mostrando células apoptóticas tratadas con ciclofosfamida (400 µg/100 µl).

Tabla 1. % de Viabilidad en células Hela post-tratamiento con veneno de CII

Dosis de Veneno en µg/100µl	50	100	200	400	CTR +	CTR -
Repetición						
A	100	98.2817903	100	97.8056071	12.7577466	100
B	98.999765	99.977146	99.999876	100	13.6215771	100
C	100	100	100	99.43534	14.248113	100
Promedio	99.66658833	99.41964543	99.99995867	99.0803157	13.5424789	100

CTR +: ciclofosfamida; CTR -: células sin tratamiento; ABC: repeticiones del experimento; 50, 100, 200, 400: dosis de veneno empleados

Tabla 2. % de Viabilidad de Macrófagos post-tratamiento con veneno de CII

Dosis de Veneno en µg/100µl	50	100	400	CTR-
Repetición				
A	89.1764706	82.3529412	67.2941176	100
B	92.0745921	80.1864802	66.6666667	100
C	90.6255313	81.2697107	66.9803922	100
Promedio	90.6255313	81.2697107	66.9803922	100

CTR -: células sin tratamiento; ABC: repeticiones del experimento; 50, 100, 400: dosis de veneno empleados

Tabla 3. Tiempo de muerte de ratones inculados con veneno crudo de CII

Ratón	Cepa	Sustancia inoculada	Dosis µg	Tiempo de Muerte en minutos	Días post-ordeña del veneno
5	Balb/C	veneno	227	15	1
6	Balb/C	veneno	227	15	1
7	Balb/C	Agua Inyectable	0	0	0
1	Balb/C	veneno	636.9	8	3
2	Balb/C	veneno	160	15	3
3	Balb/C	veneno	150	180	8
4	Balb/C	Agua inyectable	0	0	0

Tabla 4. Cuantificación de proteína Bradford

Muestra	BSA µl	PBS 1X µl	Bradford µl
	0	50	250
	1	49	250
	2	48	250
	4	46	250
	6	44	250
Desconocido	8	42	250

Desconocido: Veneno; BSA: Albumina de suero bovino; PBS: Buffer fosfato salino; Bradford: Reactivo de Bradford

Tabla 5: Algunos proto-oncogenes y genes supresores de tumores. Tomado de Klug, 2008.

Protooncogén	Función normal	Alteración en cáncer	Cánceres asociados
<i>Ha-ras</i>	-Molécula de transducción de señales, se une a GTP/GDP	-Mutaciones puntuales	-Colorectal, vejiga y muchos tipos
<i>c-erbB</i>	-Receptores transmembrana de factores de crecimiento	-Amplificación génica, mutaciones puntuales	-Glioblastomas, mama, cervical
<i>c-myc</i>	-Factores de transcripción, regula el ciclo célula la diferenciación y la apoptosis	-Translocación, amplificación, mutaciones puntuales	-Linfomas, leucemias, pulmón, muchos tipos
<i>c-fos</i>	-Factor de transcripción, responde a los factores de crecimiento	-Sobreexpresión	-Osteosarcomas, muchos tipos
<i>c-kit</i>	-Tirosina quinasa, transducción de señales	-Mutación	-Sarcomas
<i>c-raf</i>	-Seria-treonina quinasa citoplasmática, transducción de señales	-Reorganizaciones cromosómicas	-Estomago
<i>RARα</i>	-Factor de transcripción dependiente de hormonas, diferenciación	-Translocaciones cromosómicas del gen PML, producto de fusión	-Leucemia promielocítica aguda
<i>MDM2</i>	-Se une e inactiva a P53, anula los puntos de control	-Amplificación génica, sobreexpresión	-Osteosarcomas, liposarcomas
<i>Ciclinas</i>	-Se une a CDK, regulan el ciclo celular	- Amplificación génica, sobreexpresión	-Pulmón, esófago, muchos tipos
<i>CDK2, 4</i>	-Quinasas dependientes de Ciclinas, regulan las fases del ciclo celular	-Sobreexpresión, mutación	-Vejiga, mama, muchos tipos
Supresores de tumores	Función normal	Alteración en cáncer	Cánceres asociados
<i>p53</i>	-Puntos de control del ciclo celular, apoptosis	-Mutación, inactivación por productos oncogénicos víricos	-Cerebro, pulmón, Colorectal, mama, muchos tipos
<i>rb1</i>	-Puntos de control del ciclo celular se une a EF2	- Mutación, delección, inactivación por productos oncogénicos víricos	-Retinoblastoma, osteosarcoma, muchos tipos
<i>APC</i>	-Interacción célula-célula	-Mutación	-Colorectal, cerebro, tiroides
<i>Bcl2</i>	-Regulación de la apoptosis	-La sobreexpresión bloquea la apoptosis	-Linfomas, Leucemias
<i>XPA-XPG</i>	-Reparación por escisión de nucleótidos	-Mutación	-Xeroderma pigmentosum, piel
<i>BRCA2</i>	-Reparación del DNA	-Mutaciones puntuales	-mama, Ovario, próstata



Figura 10: Sitio de colecta del alacrán CII, en el municipio de Pilcaya, Guerrero. La búsqueda se realizaba, entre la corteza de troncos, bajo hojarasca y piedras.



Figura 11: *Centruroides limpidus limpidus*, colocado en cajas de acrílico transparente, con una cama de aserrín.

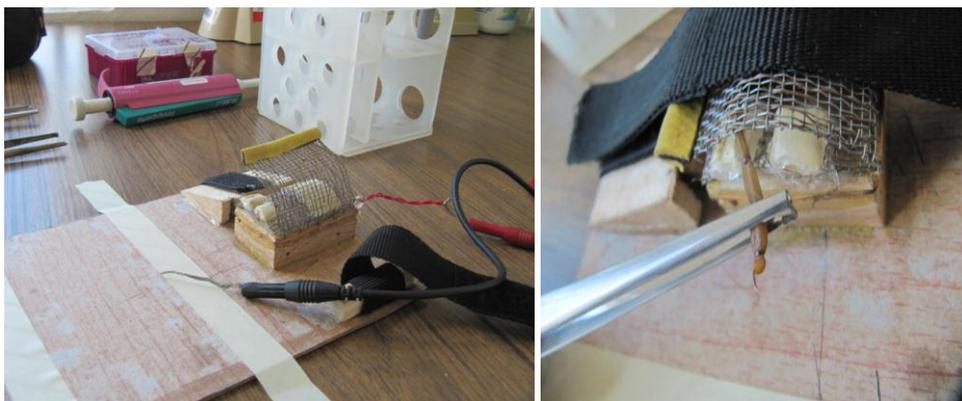


Figura 12: plancha electricada, mostrándose 2 electrodos, donde se realizó la extracción del veneno por estimulación del telson y veneno obtenido.

