

Título: Evaluación de la toxicidad del veneno del alacrán *Rhopalurus junceus* a través de un ensayo celular.

Autores:

Oscar Hernández Betancourt
Imilla Casado Hernández
Eldris Iglesia Huerta
Ariel Ramírez Labrada
Jorge del Risco Ramos
Ayni Rodríguez Pargas

Centro de Inmunología y Productos Biológicos (CENIPBI)
oscarhb@iscmc.cmv.sld.cu

Palabras claves

Rhopalurus junceus, Escozul, citotoxicidad, escorpiones, líneas celulares, in vitro.

Introducción

El cáncer constituye una de las principales causas de muerte a nivel mundial. Datos preliminares del Anuario Estadístico del Ministerio de Salud Pública (MINSAP) indican que el cáncer cobró 17 490 vidas en Cuba en el año 2002, que equivale al 23% del total de muertes registradas en ese año. (1)

En el tratamiento de esta patología se utilizan tradicionalmente los fármacos citostáticos, las radiaciones y la cirugía; pero en la actualidad han surgido una serie de tratamientos alternativos que se denominan la bioterapia del cáncer, en la que se incluyen: terapia génica, elementos promotores de inmunogenicidad, agentes mutantes y otros que aceleran el proceso de apoptosis celular. (2-5)

El empleo terapéutico de la toxina del alacrán azul (*Rhopalurus junceus*) fue descubierta al cabo de una década de trabajo por el biólogo cubano Misael Bordier, que inició el criadero de escorpiones y su investigación, en la Facultad de Ciencias Médicas de Guantánamo a finales de los 80. La toxina, una vez formulada constituye el producto natural Escozul. A la misma se le atribuyen propiedades antimicrobianas y antitumorales demostradas a través de algunos estudios preclínicos. (3) La evaluación farmacológica de extractos de organismos y su aislamiento, es un aspecto esencial del proceso de descubrimiento de la droga; precisamente los avances en el área de las técnicas *in vitro* han transformado sustancialmente esta faceta de la química de productos naturales.

En el campo del cáncer, los ensayos *in vitro* son fundamentalmente de dos tipos: ensayos moleculares altamente específicos (dirigidos a una diana u objetivo subcelular único) y ensayos celulares. Los ensayos celulares a su vez, pueden ser divididos en: ensayos citotóxicos y otros tipos de ensayos, que incluyen exámenes morfológicos. (6) En la literatura revisada, no aparece información alguna sobre estudios que utilicen el veneno crudo de alacrán (Escozul) en experimentos como los mencionados anteriormente.

A pesar de los resultados obtenidos en investigaciones preclínicas y clínicas mediante la administración de este veneno (7,8), las autoridades sanitarias cubanas no reconocen como evidencia científicamente documentada los reportes realizados hasta el momento, aunque las referencias sobre sus efectos y curas son sugerentes de una posible actividad y utilidad terapéutica. (9) Partiendo de estos argumentos, nos propusimos evaluar en un sistema celular *in vitro*, la actividad citotóxica del veneno crudo del alacrán *Rhopalurus junceus*, empleando las líneas tumorales de mieloma murino (P3-X63) y de próstata de rata (Dunning). Los métodos empleados fueron la cinética de crecimiento y el ensayo de daño metabólico. Fue importante para nuestro equipo definir la estabilidad que este

producto presenta almacenado a 4 y -20°C . Nuestros resultados brindarán un mejor entendimiento para el tratamiento de diversas patologías de tipo tumoral -empleando este producto- así como ayudarán a la mejor conservación y comercialización del mismo.

Diseño metodológico

1. Colección y preparación de la toxina

Se colectó el veneno de 50 alacranes de la especie *Rophalurus junceus* en un volumen de 20mL de agua destilada, mediante la aplicación de corriente a baja intensidad en el apéndice terminal. Con la finalidad de concentrar la muestra se realizó una precipitación salina. (NH_4SO_4 al 70%), seguidamente se resuspendió en 5mL de PBS 1X (137mM NaCl, 2,7mM KCl, 4,3mM Na_2HPO_4 , 1,47mM KH_2PO_4) y se procedió a dializar durante 48 h a 4°C en PBS 1X. Se determinó la concentración de proteínas totales a través del método de Lowry. La toxina fue filtrada utilizando membranas de 0,2 mm y posteriormente fue empleada para conformar los diferentes tratamientos. Las dosis preparadas fueron: 1, 10, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Como control positivo se utilizó el citostático estándar 5-fluoruracilo a una concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de medio. Como control negativo se empleó el medio de cultivo carente de la toxina, donde el volumen correspondiente a esta fue reemplazado por PBS1X. Parte de la toxina fue almacenada durante 30 días a 4 y -20°C para estudios de estabilidad.

2. Líneas celulares y condiciones de cultivo

- Líneas celulares

Se utilizaron las líneas de mieloma de ratón Balb/c P3-X63/AG8/653 y Dunning R3327-G de próstata de ratas Copenhague. Ambas se cultivaron en medio RPMI suplementado con 10 % suero fetal bovino (SFB) y glutamina piruvato 2mM en ausencia de antibióticos, a 37°C y atmósfera de 5 % CO_2 .

- Densidad de la siembra

Las células se sembraron entre 2 y 3×10^4 células/pozo en placas de microtitulación de 96 pozos.

3. Ensayos de citotoxicidad *in vitro*

De los diferentes ensayos *in vitro* descritos para evaluar este efecto, se seleccionó la cinética de crecimiento y la evaluación del daño metabólico descrito por Rahman y col, 2001. (6)

Cinética de crecimiento

El ensayo se efectuó durante 72 horas según lo establecido en la literatura, realizando los conteos celulares cada 24 horas con la ayuda de la Cámara de Neubauer y una dilución 1:2 de la muestra en Tripán Azul. En el caso de los conteos realizados a las células Dunning, se empleó para su desprendimiento del soporte la tripsina 0.125%, 53mM de EDTA en PBS 1X.

Se le concedió especial importancia a la observación de las características culturales propias de cada línea celular.

Las dosis seleccionadas fueron 1, 10, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

El diseño experimental incluyó un original y dos réplicas para cada tratamiento.

Ensayo de daño metabólico

Se empleó la técnica del rojo neutro, un colorante vital que se acumula en los lisosomas de las células vivas. El ensayo se llevó a cabo en triplicado como se describió anteriormente, pero las células permanecieron en contacto con los diferentes tratamientos durante 72 horas. Cada 24 horas hubo cambio de 100 μL de medio por medio fresco con las dosis correspondientes, incluyendo los controles. Los datos de la toxicidad celular del veneno, se brindan como la absorbancia a 540nm del rojo neutro captado por los lisosomas

4. Estabilidad de la toxina almacenada

Se realizó un análisis funcional de la estabilidad del producto -basado en su actividad biológica- una vez que el producto fue sometido a temperaturas diferenciales de almacenamiento: refrigeración (2 a 8°C) y congelación (-5 a -20°C), durante 30 días.

Se tomaron como criterios de actividad los referidos en los experimentos anteriores: cinética de crecimiento y daño metabólico, y se seleccionaron dosis intermedias al rango establecido: 1, 10, 20, 50, 100 µg/mL. Por cada dosis se incluyó un grupo de refrigeración y otro de congelación.

El diseño experimental incluyó un original y dos réplicas para cada tratamiento.

La línea celular empleada fue la P3X63.

5. Procesamiento estadístico

Dado que los datos responden a una distribución normal se procedió a hacer el análisis estadístico paramétrico, realizando un análisis de varianza múltiple (ANOVA) y la matriz de comparación de medias de Tukey. (11)

Se consideró como variable dependiente el número de células y la DO medida en el ensayo metabólico, y como variables independientes los diferentes tratamientos. El paquete estadístico empleado fue SYSTAT versión 5.0 del 97

Resultados y discusión

- Ensayos de citotoxicidad *in vitro*

La figura 1A muestra los resultados obtenidos en la cinética de crecimiento realizada a las células tumorales murinas P3X63. En la misma se evidencia un marcado efecto inhibitorio en el crecimiento de las células, de un 72,3 y 66,7 % con relación al grupo control empleado, a las dosis de 1 y 10 µg/mL, respectivamente.

La figura 1B muestra la cinética obtenida para las células tumorales prostáticas de rata (Dunning) tratadas con iguales dosis. Se observó que el efecto citotóxico del veneno del alacrán azul se alcanzó con la dosis de 100 µg/mL, mostrando un 45,7 % de inhibición con relación al control en esta línea celular. Por otra parte, se observó un efecto marcado del 5FU a la dosis de 5 µg/mL dependiente del tiempo de exposición con las células en ambas líneas, se corroboró con la observación realizada al microscopio. En este caso se mostraron cambios morfológicos como pérdida de refringencia, disminución del tamaño celular y bordes irregulares. Además se observaron abundantes detritos.

Este ensayo se realizó empleando veneno fresco de 5 y 10 días posterior a la extracción. A la derecha aparecen las dosis utilizadas: C- (control negativo) C+ (control positivo 5FU). D1, D10, D100, D200 se corresponden con 1, 10, 100, 200 µg/mL de la proteína respectivamente. Los resultados se expresan como las medias de las DO ± DE de ensayos realizados en triplicados.

El uso de dos líneas celulares (P3-X63 y Dunning), permitió evidenciar que existen diferencias entre las dosis con actividad citotóxica efectiva cuando se compararon ambas células. Las dosis 1 y 10 µg/mL causaron inhibición notable del crecimiento (72,3 y 66,7 % respectivamente) en los mielomas murinos (P3-X63), coincidiendo con resultados obtenidos por otros autores. 21,22 Contradictoriamente, cuando el ensayo se efectuó con las mismas dosis en células Dunning, el efecto inhibitorio del crecimiento se observó con 100 µg/mL (45,7 %). Este resultado puede deberse a las diferentes características que ambas líneas celulares presentan durante su crecimiento.

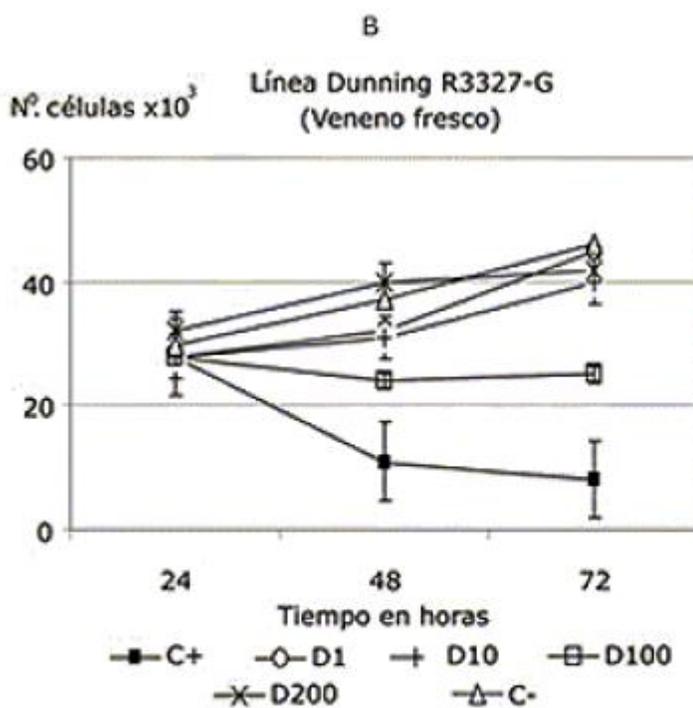
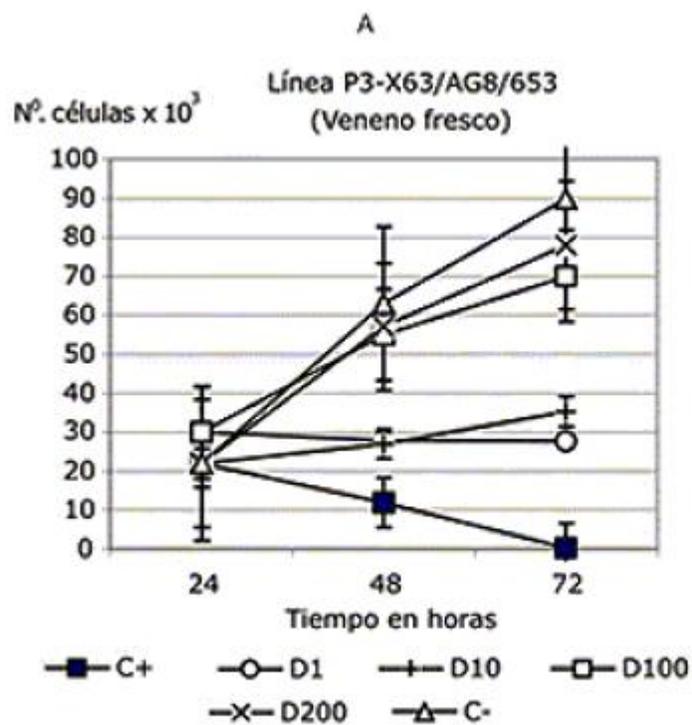


Fig. 1. Ensayo de citotoxicidad en células P3 - X63 (A) y Dunning de rata (B) empleando la cinética de crecimiento como método para identificar el efecto citotóxico presente en el veneno del alacrán *Rophalurus junceus*.

Las células Dunning son células con anclaje dependiente y a diferencia de las X63 crean una monocapa con una matriz celular que presupone la presencia del complejo proteico que garantiza la unión entre células, y entre estas y el soporte a la cual están ancladas. La unión estrecha presente en las células dependientes de anclaje puede constituir una barrera a la acción de la toxina.

Esta ha sido una de las causas que ha llevado al surgimiento de los estudios tridimensionales *in vitro*, con el empleo de los esferoides celulares, dado que la acción del fármaco sobre la célula no es igual cuando estas crecen en monocapas a cuando lo hacen en pequeños "cluster" celulares aislados. (23,24) Por otra parte, se ha observado que cuando se emplean toxinas para el tratamiento de pacientes afectados con diversos tumores, existe una menor eficiencia en el tratamiento de aquellos casos donde existen tumores sólidos que en los pacientes con tumores hematopoyéticos. (25)

Llamó poderosamente la atención el efecto no dependiente de la dosis en el tratamiento de estas células, ya que muchos autores que ensayan diferentes toxinas, han encontrado un efecto dosis dependiente. (14,15) En nuestros ensayos realizados con las células P3-X63 para las dosis de 100 y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se obtuvo un crecimiento comparable al control negativo. Esta última dosis tampoco fue efectiva en las células Dunning. Un efecto de saturación del complejo ABC presente en la membrana celular puede ser la causa de este fenómeno. Se sabe que esta superfamilia es un transportador de membrana presente desde las bacterias hasta el humano, y es altamente específica para un sustrato o grupo de sustratos relacionados estructuralmente, entre los que se encuentran péptidos y proteínas.

Pudiera también pensarse en un efecto de resistencia a la toxina a altas dosis. Este mecanismo resultaría de la sobreexpresión de MDR1 (*multidrug resistance*), una proteína de 170KDa presente en la membrana y cuya función es exportar fármacos al exterior celular causando resistencia a estos, si bien hay que señalar que es un mecanismo descrito para pequeños fármacos hidrófobos. (26) Experimentos para confirmar estas hipótesis así como los mecanismos de acción molecular del veneno del alacrán, deberán ser diseñados posteriormente.

- Estabilidad de la toxina almacenada.

- Temperatura de refrigeración

No se observó efecto citotóxico en ninguna de las cinco dosis ensayadas como se muestra en la figura 2A. Los por cientos de inhibición con respecto al control para 1, 10, 20, 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ fueron 98,6, 102,7, 109,5, 109,5 y 78,08 % respectivamente (fig. 2A). El ensayo metabólico (2B) no mostró diferencias significativas ($p= 0,215$) entre las dosis empleadas y el control negativo, para $p<0,05$.

La fig. 2B muestra la captación del rojo neutro por los lisosomas y se expresan los resultados de la densidad óptica ($X \pm DS$) medida a 540nm.

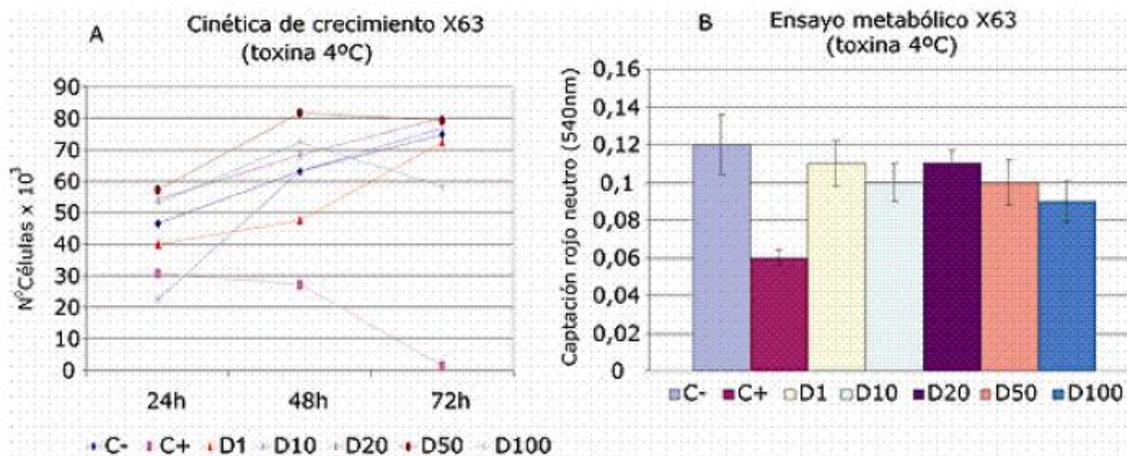


Fig. 2. Cinética de crecimiento (A) y ensayo de daño metabólico (B) realizados con la línea celular P3-X63 empleando la toxina almacenada durante 30 días a 4°C.

- Temperatura de congelación

Como se observa en la figura 3A, la curva de crecimiento no mostró efecto inhibitorio alguno causado por el veneno crudo presente en el medio de cultivo de las células P3X63. Estos resultados son corroborados por el ensayo metabólico realizado y que se observa en la figura 3B. El análisis de varianza (ANOVA) no mostró diferencias significativas ($p=0,178$) entre las dosis estudiadas para $p<0,05$.

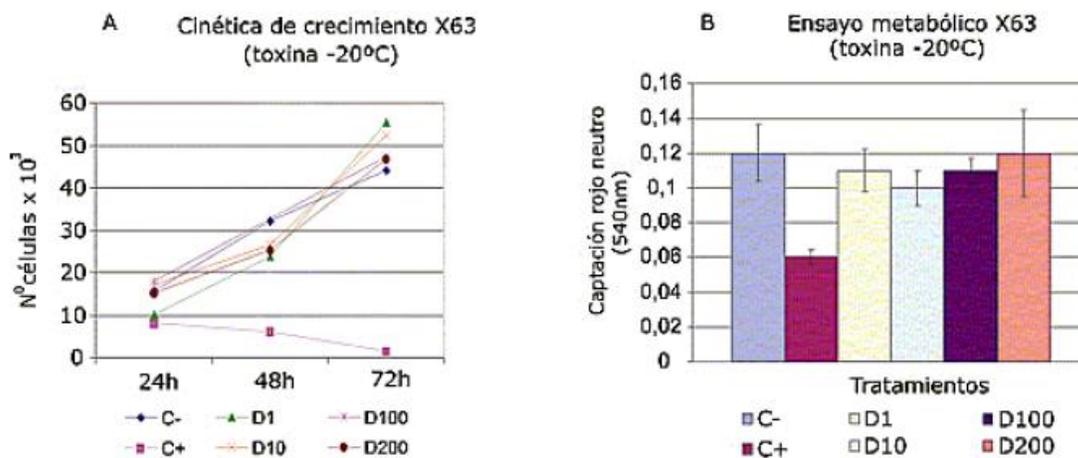


Fig. 3. Estudio de estabilidad realizado a la toxina congelada a -20°C por un período de 30 días empleando la cinética de crecimiento (A) y el ensayo metabólico (B).

El gráfico B muestra la captación del rojo neutro por los lisosomas y se expresan los resultados de la densidad óptica ($X \pm DS$) medida a 540nm. Fue interesante evaluar la estabilidad de este producto natural empleado en el tratamiento de diversas patologías, fundamentalmente en pacientes afectados por diversos tipos de cáncer. El estudio realizado mostró por primera vez que la efectividad o actividad

biológica, medida a través del efecto citotóxico, del principio activo presente en el veneno crudo, es sensible al tiempo y a la temperatura ya que este se obtuvo con el veneno fresco mantenido a 4°C hasta 15 días posterior a la extracción. Una vez que el producto se almacenó por período de un mes a 4°C ó-20°C, su efecto citotóxico desapareció. La literatura revisada no mostró ningún estudio sobre la estabilidad de toxinas naturales (animales) en un biomodelo *in vitro*, lo cual realza la importancia de este resultado si se quiere establecer con efectividad un tratamiento prolongado en estos pacientes. Los resultados *in vitro* aquí mostrados confirmaron el efecto citotóxico dependiente del tiempo del producto Escozul y sugieren la necesidad de estudiar cuidadosamente el efecto dosis-respuesta en función de la patología presentada en cada paciente, además del uso de biomodelos *in vivo* que permitan ajustar estas dosis efectivas.

Conclusiones

El producto Escozul evidenció su actividad biológica mostrando su efecto citostático en las líneas celulares estudiadas P3-X63 y Dunning, en cambio esta actividad fue dependiente del tiempo transcurrido entre la extracción del mismo y la realización del ensayo celular. Cuando se almacenó el veneno a 4°C por un periodo entre 0 y 15 días, su efecto citostático fue corroborado en los ensayos en cambio cuando este producto natural es almacenado a 4°C o congelado por periodo de 30 días su actividad biológica se pierde en las líneas tumorales estudiadas. El trabajo mostró las primeras evidencias científicas del efecto antiproliferativo del veneno del alacrán azul (ESCOZUL) en células tumorales de mamífero y evidenció la pérdida de la actividad biológica del producto en el tiempo, lo cual tiene importancia para los productores del veneno en la toma de decisiones que garantizaran la mejor comercialización del producto en función de la eficacia del tratamiento.

Bibliografía.

1. Anuario Estadístico. [en línea] 2006 [citado 2008]. Disponible en: <http://bvs.sld.cu/cgi-bin/wxis/anuario/>
2. Ruggles JA, Kelemen D, Baron A. Emerging therapies: controlling glucose homeostasis, immunotherapy, islet transplantation, gene therapy, and islet cell neogenesis and regeneration. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2004;33(1):239-52.
3. Rodríguez R, Guerra O, Baro E, Silva J, Magdelaine R. Acción antimicrobiana del veneno del escorpión *Rhopalurus junceus* (Scorpionida: buthidae). *Rev Cubana Farm.* 2004;38(2):134.
4. Gao L, Yu S, Wu Y, Shan B. Effect of spider venom on cell apoptosis and necrosis rates in MCF-7 cells. *DNA Cell Biol.* 2007;26(7):485-9.
5. Konety BR, Getzenberg RH. Novel therapies for advanced prostate cancer. *Semin Urol Oncol.* 1997;15(1):33-42.
6. Rahman A, Iqbal M, Thomsen W. Bioassay techniques for drug development. Harward Academic Publishers; 2001.
7. Pérez M, Rodríguez C, Guevara I, Romeaux R. Estudio de toxicidad aguda de las toxinas de los escorpiones *Rophalurus junceus* y *Centruroides gracilis*. *Rev Cubana Farm.* 2004;38(suplemento especial).
8. Kinast H. El veneno del alacrán en cáncer. Escozul. Cap 43. [serie en Internet] 2007 [citado 2007]. Disponible en: <http://kinastchile.cl/cc43.htm>
9. Nota Oficial del Ministerio de Salud Pública. Granma. 2004 Nov 17 [serie en Internet] [citado 2007]. Disponible en: <http://www.granma.cubasi.cu/2004/11/17/nacional/index.html>
10. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2th ed.

Nueva York: Cold Spring Harbor NY; 1989.

11. Sigarroa A. *Biometría y Diseño Experimental*. Ed. Pueblo y Educación; 1985. 12. Zeng X, Luo F, Li W. Molecular dissection of venom from Chinese scorpion *Mesobuthus martensii*: Identification and characterization of four novel disulfidebridged venom peptides. *Peptides*. 2006;27(7):1745-54.

13. Cao ZY, Mi ZM, Cheng GF, Shen WQ, Xiao X, Liu, et al. Purification and characterization of a new peptide with analgesic effect from the scorpion *Buthus martensii* Karch. *J Pept Res*. 2004;64(1):33-41.

14. Pipelzadeh MH, Dezfulian AR, Jalali MT, Mansouri AK. In vitro and in vivo studies on some toxic effects of the venom from Hemiscorpius lepturus scorpion. *Toxicon*. 2006;48(1):93-103.

15. Serafim FG, Reali M, Cruz MA, Fontana MD. Action of *Micrurus dumerilii carinicauda* coral snake venom on the mammalian neuromuscular junction. *Toxicon*. 2002;40(2):167-74.

16. Giron ME, Aguilar I, Romero L, Sanchez EE, Perez JC, Rodriguez A. A low-cost method to test cytotoxic effects of *Crotalus vegrandis* (Serpentes: Viperidae) venom on kidney cell cultures. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2005;47(3):147-52.

17. Mora R, Maldonado A, Valverde B, Gutierrez JM. Calcium plays a key role in the effects induced by a snake venom Lys49 phospholipase A2 homologue on a lymphoblastoid cell line. *Toxicon*. 2006;47(1):75-86.

18. Villalobos JC, Mora R, Lomonte B, Gutierrez JM, Angulo Y. Cytotoxicity induced in myotubes by a Lys49 phospholipase A(2) homologue from the venom of the snake *Bothrops asper*: Evidence of rapid plasma membrane damage and a dual role for extracellular calcium. *Toxicol In Vitro*. En prensa 2007.

19. Pita M, Casanella O, Rodríguez A, López T, Perea S, Castañeda O. Capacidad antiproliferativa de fracciones cromatográficas procedentes de animales marinos en líneas tumorales in vitro. *Rev Cubana Farm*. 2004;38(2):152.

20. Rundbert T, Sándvik M, Larsen K, Pizarro G, Reguera B, Castberg T, et al. Extraction of microalgal toxins by large-scale pumping of seawater in Spain and Norway, and isolation of okadaic acid and dinophysistoxin-2. *Toxicon*. 2007;50(7):960-70.

21. Crachi M, Hammer L, Hodgson W. A pharmacological examination of venom from the Papuan taipan (*Oxyuranus scutellatus canni*). *Toxicon*. 1999;37(12):1721-34.

22. Oliveira JC, de Oca HM, Duarte MM, Diniz CR, Fortes CL. Toxicity of South American snake venoms measured by an in vitro cell culture assay. *Toxicon*. 2002;40(3):321-5.

23. Doillon CJ, Gagnon E, Paradis R, Koutsilieris M. Three-dimensional culture system as a model for studying cancer cell invasion capacity and anticancer drug sensitivity. *Anticancer Res*. 2004;24(4):2169-77.

24. Zhang X, Wang W, Yu W, Xie Y, Zhang X, Zhang Y, et al. Development of an in vitro multicellular tumor spheroid model using microencapsulation and its application in anticancer drug screening and testing. *Biotechnol Prog*. 2005;21(4):1289-96.

25. Ng H, Khoo H. Cancer homing toxins. *Curr Pharm Des*. 2002;8(22):1973-85.

26. Lodish H, Berk A, Zipursky L, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. *Biología Celular y Molecular*. 4th Ed. New York: Freeman and Company eds; 2002. p. 595-7.