



EFFECTO *IN VITRO* DE LA COMBINACIÓN DEL VENENO DE ESCORPIÓN *HETEROCTENUS JUNCEUS* CON CITOSTÁTICOS CONVENCIONALES EN CÉLULAS TUMORALES DE PULMÓN

IN VITRO EFFECT OF THE COMBINATION OF *HETEROCTENUS JUNCEUS* SCORPION VENOM WITH CONVENTIONAL CYTOSTATICS ON LUNG TUMOR CELLS

Arianna Yglesias-Rivera^{1*} <https://orcid.org/0000-0002-1069-4259>

María Cristina Godínez López² <https://orcid.org/0009-0005-3950-1202>

Lianet Monzote Fidalgo² <https://orcid.org/0000-0002-1958-809X>

Carmen Soto Febles³ <https://orcid.org/0000-0002-8767-8740>

Yudith Rodríguez Coipel¹ <https://orcid.org/0000-0003-1878-8396>

¹Laboratorios de Producciones Químicas y Biofarmacéuticos (LABIOFAM), Departamento de Investigaciones, La Habana-Cuba,

²Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" (IPK), Centro de Investigación, Diagnóstico y Referencia (CIDR), La Habana-Cuba,

³Universidad de La Habana, Facultad de Biología, La Habana-Cuba,

Autor para correspondencia*: ariannayglesias@gmail.com

Resumen

Introducción: El veneno del escorpión endémico de Cuba, *Heteroctenus junceus*, disminuye la viabilidad de las células tumorales de origen epitelial y no tiene efecto citotóxico sobre células no tumorales. Sin embargo, se desconoce el tipo de muerte celular inducido por la combinación de este veneno con quimioterapia en las células tumorales de pulmón. **Objetivo:** Determinar la potencialidad del veneno del escorpión *Heteroctenus junceus* de incrementar el efecto citotóxico de la quimioterapia convencional sobre un carcinoma de pulmón. **Métodos:** La línea tumoral de pulmón humana A549, se trató con el veneno y cisplatino/ciclofosfamida/5-fluoruracilo, como monoterapia o en combinación. La viabilidad celular se determinó por el ensayo de MTT, transcurrido 72 horas de incubación y el porcentaje de células apoptóticas se determinó mediante citometría de flujo con el marcaje de AnexinaV/PI después de 24h de combinación con $\frac{1}{2}$ CI_{50} y la CI_{50} . El índice de



combinación y de reducción de la dosis, se determinó mediante el programa Calcosyn 2.1. **Resultados:** La combinación del veneno con cisplatino/ciclofosfamida/5-fluoruracilo redujo significativamente la viabilidad de A549, en comparación con los tratamientos individuales. El tipo de interacción farmacológica es sinérgica en la combinación con 5-20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del cisplatino, 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ciclofosfamida y con 6,25-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de 5-fluoruracilo. Además, el tratamiento combinado incrementó el porcentaje de células en apoptosis en comparación con la monoterapia. **Conclusión:** El veneno de escorpión *Heteroctenus junceus* incrementa la eficacia terapéutica de la quimioterapia convencional, en dependencia del tipo y la concentración evaluada sobre células tumorales de pulmón.

Palabras claves: veneno de escorpión *Heteroctenus junceus*, quimioterapia, sinergismo, apoptosis

Abstract

Introduction: The venom of the Cuban endemic scorpion, *Heteroctenus junceus*, decreases the viability of tumour cells of epithelial origin and has no cytotoxic effect on non-tumour cells. However, the type of cell death induced by the combination of this poison with chemotherapy in lung tumour cells is unknown. **Aim:** To determine the potential of *Heteroctenus junceus* scorpion venom to increase the cytotoxic effect of conventional chemotherapy on lung carcinoma. **Methods:** The human lung tumour line A549 was treated with the venom and cisplatin/cyclophosphamide/5-fluorouracil as monotherapy or in combination. Cell viability was determined by MTT assay after 72 hours of incubation and the percentage of apoptotic cells was determined by flow cytometry with AnnexinV/PI labelling after 24h of combination with $\frac{1}{2}$ CI_{50} and CI_{50} . **Results:** The combination of venom with cisplatin/cyclophosphamide/5-fluorouracil significantly reduced the viability of A549, compared to individual treatments. The type of drug interaction is synergistic in the combination with 5-20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ cisplatin, 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ cyclophosphamide and 6.25-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 5-fluorouracil. In addition, the combined treatment increased the percentage of cells undergoing apoptosis compared to monotherapy. **Conclusion:** *Heteroctenus junceus* scorpion venom increases the therapeutic efficacy of conventional chemotherapy, depending on the type and concentration tested on lung tumour cells.

Keywords: *Heteroctenus junceus* scorpion venom, chemotherapy, synergism, apoptosis

INTRODUCCIÓN



El cáncer es una de las enfermedades de mayor impacto tanto en países desarrollados como subdesarrollados y se encuentra entre las primeras causas de muerte a nivel mundial (Siegel y cols., 2023). En el año 2022, el tumor maligno de pulmón fue el más diagnosticado, se informaron 2,5 millones de nuevos casos; así como constituyó la primera causa de muerte con un estimado de 1,8 millones de fallecidos (Bray y cols., 2024). El tratamiento convencional contra el cáncer incluye tres métodos básicos: la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia (García-Fernández y cols., 2021). Todas las alternativas terapéuticas disponibles contra el cáncer presentan limitaciones debido a la progresiva resistencia que adquieren las células tumorales y a la toxicidad que causa sobre las células no tumorales (Pezzani y cols., 2019).

Las investigaciones encaminadas a encontrar formas de tratamientos que contribuyan tanto a la prevención como a la eliminación del cáncer ocupan un área muy amplia en el campo de la investigación (Pan y cols., 2019). Los venenos de escorpión se utilizan ampliamente en la medicina tradicional por sus potencialidades antitumorales (Mikaelian y cols., 2020; Rajput y cols., 2021). El veneno del escorpión *Heteroctenus junceus* (*H. junceus*) Herbst 1800, antes denominado como *Rhopalurus junceus* (Esposito y cols., 2017), es una especie endémica de Cuba que pertenece a la familia Buthidae y se ha utilizado en la medicina natural y tradicional durante muchos años debido a sus potencialidades antiinflamatorias, analgésicas y antitumorales (Díaz-García y cols., 2013; Casamayor-Laime y cols., 2020).

El veneno del escorpión *H. junceus* ejerce un efecto citotóxico selectivo contra tumores de origen epitelial, sin afectar las células no tumorales (Díaz-García y cols., 2013). Estudio previo relacionado con el efecto antineoplásico del veneno, se sugirió la posible inducción de apoptosis en la línea celular de cáncer cérvico-uterino HeLa (Díaz-García y cols., 2013), y de cáncer de mama metastásico MDA-MB-231 (Díaz-García y cols., 2017), debido a que el tratamiento con veneno incrementó la expresión de genes proapoptóticos. Por otra parte, una de las estrategias novedosas para contrarrestar la aparición de resistencia a la quimioterapia convencional ha sido la combinación de fármacos (Zhang y cols., 2020; Vladu y cols., 2022). En este sentido, el objetivo del presente estudio es conocer la capacidad del veneno de escorpión *H. junceus* de potenciar el efecto de antitumorales convencionales en una línea tumoral de pulmón.

MATERIALES Y MÉTODOS



El presente trabajo es un estudio experimental no clínico, el cual se llevó a cabo en los laboratorios de Cultivo Celular y el Bioterio, ubicados en el Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri” (IPK), en el período de enero de 2019 a marzo de 2020.

Obtención del veneno de escorpión *Heteroctenus junceus*

El veneno se obtuvo mediante extracción por estimulación eléctrica de 20 voltios en el período de luz, según lo descrito por Alajmi y colaboradores (Alajmi y cols., 2020), en el telson del animal con un electroestimulador y se diluyó en agua destilada, de acuerdo con lo descrito en la norma cubana sobre el manejo del escorpión *H. junceus* (NC 1104/ 2015). Posteriormente, el veneno, se centrifugó a 1650 g durante 15 min en una centrífuga refrigerada (Eppendorf, Navarra, España). Finalmente, el sobrenadante se filtró por una membrana de 0,2 μm (Sartorius, Berlín, Alemania) y se almacenó a -20°C hasta su utilización.

Cultivo y mantenimiento de la línea celular

La línea celular empleada en el estudio fue la A549 (carcinoma humano de pulmón de células no pequeñas, ATCC CCL 185TM). Se cultivó en un frasco de cultivo en medio mínimo esencial (DMEM, siglas del inglés Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium) suplementados con 10 % de suero fetal bovino (SFB; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), penicilina/estreptomicina (100 UI/mL/100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Eurobio, París, Francia), glutamina (2 mM), piruvato de sodio (1 mM), N-[2-hidroxietil]piperazina-N-[ácido-2-etanosulfónico] (HEPES Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) (18 mM), NaHCO_3 (26 mM, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) y β -mercaptoetanol (5×10^{-4} mM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Las células crecieron en incubadora (Fisher Scientific, Meridian Road, Rockford, EUA) con atmósfera humidificada al 5% CO_2 y 37°C , con cambios de medio según las instrucciones dadas por la ATCC. Para todos los experimentos la concentración celular se calculó por conteo en cámara de Neubauer, de las células viables marcadas con el colorante vital Azul de Tripán (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), visualizadas en un microscopio óptico (Olympus, Tokio, Japón), empleando una magnificación de 100x.

Medición de la expresión de fosfatidilserina en las células A549 tratadas con el veneno del escorpión *Heteroctenus junceus*

La evaluación *in vitro* de la capacidad del veneno de escorpión de inducir la exposición de fosfatidilserina sobre células de la línea tumoral A549 se realizó mediante la detección del doble marcaje de un estuche comercial (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) con Anexina V conjugada al



fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC, siglas del inglés fluorescein isothiocyanate) yoduro de propidio (PI, siglas del inglés propidium iodide) mediante citometría de flujo (Partec, Berlín, Alemania), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células tumorales A549 (1×10^5 célula/pozo) se cultivaron durante 24 h en placas de 24 pozos (Costar Corning®, Rochester, NY, EUA) para cultivos celulares, en atmósfera de 5 % CO_2 a 37°C . Al cabo de este tiempo, las células se trataron con 0,15; 0,3 y 0,6 mg/mL del veneno de escorpión *H. juncus* disuelto en medio de cultivo y se incubaron en las mismas condiciones por 24 h. El tratamiento con CDDP (2,65 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en F3II se utilizó como control positivo. Luego, se desprendieron por tratamiento con una solución de tripsina-EDTA (0,25%), se lavaron dos veces con PBS y se centrifugaron a 132 g durante 5 min. El precipitado celular se resuspendió en 500 μL de una solución para el doble marcaje con Anexina V-FITC y PI. Las células se incubaron durante 30 min a 4°C en la oscuridad, se lavaron tres veces con PBS, se adquirieron 10 000 eventos en un citómetro PAS III (Partec, Berlín, Alemania) y se utilizó el programa del citómetro FloMax versión 2.57. Para el procesamiento y presentación de los datos se empleó el programa FlowJo versión 7.6.1 (Ashland, EUA). Las células Anexina V-FITC negativas/PI negativas se clasifican como vivas, Anexina V-FITC positivas y PI negativas son las células en apoptosis temprana, Anexina V-FITC positivas y PI positivas son células en apoptosis tardía y las Anexina V-FITC negativas/PI positivas corresponden a células en necrosis, según lo descrito previamente en la literatura (Kari y cols., 2022). El porcentaje total de células en apoptosis es la sumatoria del porcentaje de células en apoptosis temprana y tardía.

Análisis estadístico

Para los análisis estadísticos realizados, se utilizó el programa GraphPad Prism versión 5.01 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). En todas las variables se evaluó la normalidad mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de varianza mediante la prueba de Levene. En los casos analizados en los cuales no existió distribución normal, ni homogeneidad de varianza, incluso después de las transformaciones de los datos, se aplicó el método no paramétrico Kruskal Wallis y las comparaciones múltiples se realizaron por la prueba de Dunn. Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$.

RESULTADOS

En la Figura 1A, se observa que el tratamiento combinado del veneno con CDDP fue más eficaz que el tratamiento individual para las concentraciones de CDDP de 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$

($p < 0,001$), 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($p < 0,001$) y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($p < 0,05$) en la reducción de la viabilidad de la línea tumoral humana de pulmón de células no pequeñas A549. Mientras que el porcentaje de células A549 viables obtenidos con el tratamiento combinado de una concentración de 0,5 mg/mL del veneno *H. junceus* con 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($p < 0,01$), 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CTX mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$), en comparación con CTX como agente simple (Fig. 1B). Adicionalmente, la combinación del veneno con 5-FU, se observó una reducción estadísticamente significativa ($p < 0,001$) en comparación con 5-FU como monoterapia, para todas las concentraciones evaluadas (Fig. 1C).

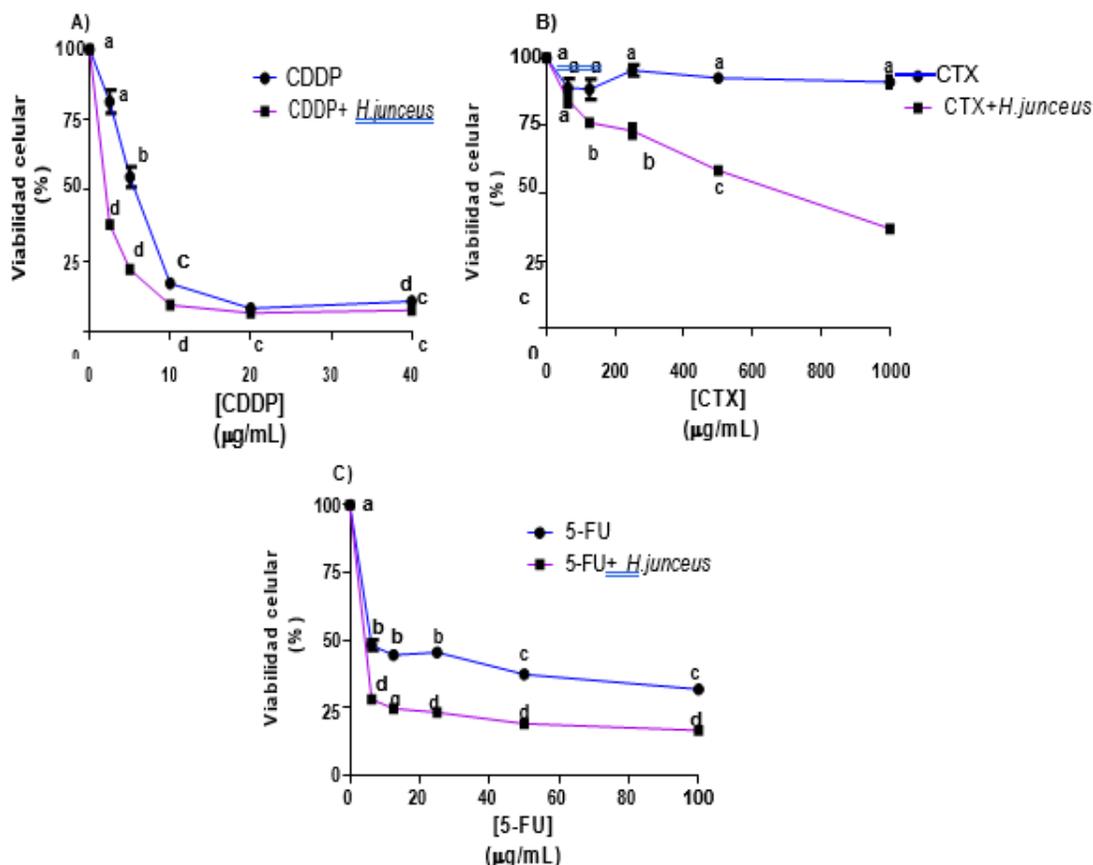


Figura 1: Efecto sobre la viabilidad de A549 de la combinación del veneno de escorpión *H. junceus* con CDDP, CTX y 5-FU. Los gráficos muestran la viabilidad celular después del tratamiento con CDDP como monoterapia o combinado simultáneamente con 0,5 mg/mL del veneno de escorpión *H. junceus* con 2,5-40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CDDP (A), 62,5-1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CTX (B) y 6,25-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de 5-FU (C). Los valores representan la media \pm DE obtenidos de tres

experimentos independientes. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas, según la prueba de Dunn a posteriori ($p < 0,05$).

En la Tabla 1, se muestra el valor promedio del IC y del IRD obtenidos a partir de la fracción afectada de la viabilidad celular de A549 correspondientes a las combinaciones del veneno *H. junceus* con CDDP/CTX/5-FU. En tres de las cinco combinaciones evaluadas del veneno con CDDP se obtuvo un IC menor que 1, por lo que el tipo de interacción entre los fármacos es sinérgico, mientras que en la combinación con $\frac{1}{8}$ CI₅₀ del CDDP el sinergismo es moderado y para la combinación con $\frac{1}{16}$ CI₅₀ se obtuvo un IC entre 0,9 y 1,1, lo cual es indicativo de un efecto aditivo. Sin embargo, en cuatro de las cinco combinaciones evaluadas con CTX, el IC obtenido fue mayor que 1 con valores indicativos de antagonismo. Mientras que en todas las combinaciones del veneno con 5-FU evaluadas se obtuvieron un IC indicativos de una interacción sinérgica entre ambos fármacos. Los valores de IRD para el tratamiento combinado del CDDP con el veneno de escorpión *H. junceus* indican que con dicha combinación se puede reducir la concentración del mencionado citostático de 1,86 a 2,95 veces para lograr el mismo efecto que la monoterapia; mientras que para 5-FU los IRD obtenidos fueron de 2,16-3,49. Sin embargo, para las combinaciones donde se obtuvo un IRD menor que 1, indica que reducir la dosis del fármaco no es favorable como se observa para la única combinación antagonista observada con CDDP y para las cuatro combinaciones con CTX donde también se observa antagonismo. Adicionalmente, aunque una sola combinación del veneno con CTX es sinérgica, el valor de IRD obtenido para el mencionado citostático fue de 230 879, lo cual es muy favorable.

Tabla 1. Determinación del grado de interacción farmacológica para las combinaciones *in vitro* en A549 del veneno de escorpión *H. junceus* con cisplatino (CDDP), ciclofosfamida (CTX) y 5-Fluoruracilo (5-FU).

<i>H. junceus</i> (mg/mL)	Citostático ($\mu\text{g/mL}$)	Valor de IC	Tipo de interacción farmacológica	IRD <i>H.</i> <i>junceus</i>	IRD Citostático
		CDDP			
0,5	2,5	0,98	+/- (aditivo)	1,57	2,95
	5	0,75	++ (moderado sinergismo)	2,72	2,64

	10	0,54	+++ (sinergismo)	5,54	2,79
	20	0,67	+++ (sinergismo)	7,28	1,86
	40	1,36	-- (moderado antagonismo)	6,53	0,83
			CTX		
	62,5	3,05	--- (antagonismo)	0,33	135,41
	125	2,06	--- (antagonismo)	0,49	827,06
	250	1,84	--- (antagonismo)	0,55	869,32
0,5	500	1,15	- (ligero antagonismo)	0,87	8500,6
	1000	0,62	+++ (sinergismo)	1,62	230879
			5-FU		
	6,25	0,5	+++ (sinergismo)	23,76	2,16
	12,5	0,46	+++ (sinergismo)	19,98	2,45
	25	0,47	+++ (sinergismo)	12,56	2,59
	50	0,4	+++ (sinergismo)	13,31	3,1
	100	0,38	+++ (sinergismo)	10,89	3,49

IC: índice de combinación; IRD: índice de reducción de la dosis; 0,3–0,7: +++ sinergismo, 0,7–0,85: moderado sinergismo (++); 0,9–1,1: ± aditivo; 1,10–1,20: ligero antagonismo (-); 1,20–1,45: moderado antagonismo (--); 1,45–3,3: antagonismo (---).

En la Figura 2, se muestra un dot plot representativo del doble marcaje Anexina V-FITC/PI de las células tumorales A549 no tratadas (Figura 2A); así como tratadas con $\frac{1}{2}$ CI₅₀ (Figura 2B)-CI₅₀

(Figura 2C) del veneno *H. junceus*, $\frac{1}{2}$ CI₅₀ (Figura 2D)-CI₅₀ (Figura 2E) del CDDP, $\frac{1}{2}$ CI₅₀ veneno + $\frac{1}{2}$ CI₅₀ CDDP (Figura 2F) y CI₅₀ veneno + CI₅₀ CDDP (Figura 2G). El menor porcentaje de células vivas (Anexina V/PI negativas) se obtuvo para la combinación de la CI₅₀ del veneno *H. junceus* con CI₅₀ del CDDP (Figura 2G). El tratamiento individual con el veneno del *H. junceus* y el control positivo CDDP incrementó el porcentaje de células en apoptosis temprana (Anexina V positivas/PI negativas), apoptosis tardía (Anexina V positivas/PI positivas) y la apoptosis total, respecto al control no tratado. Adicionalmente, la combinación del veneno con CDDP para las dos concentraciones evaluadas indujo un mayor porcentaje de células en apoptosis con respecto a cada una de las monoterapias.

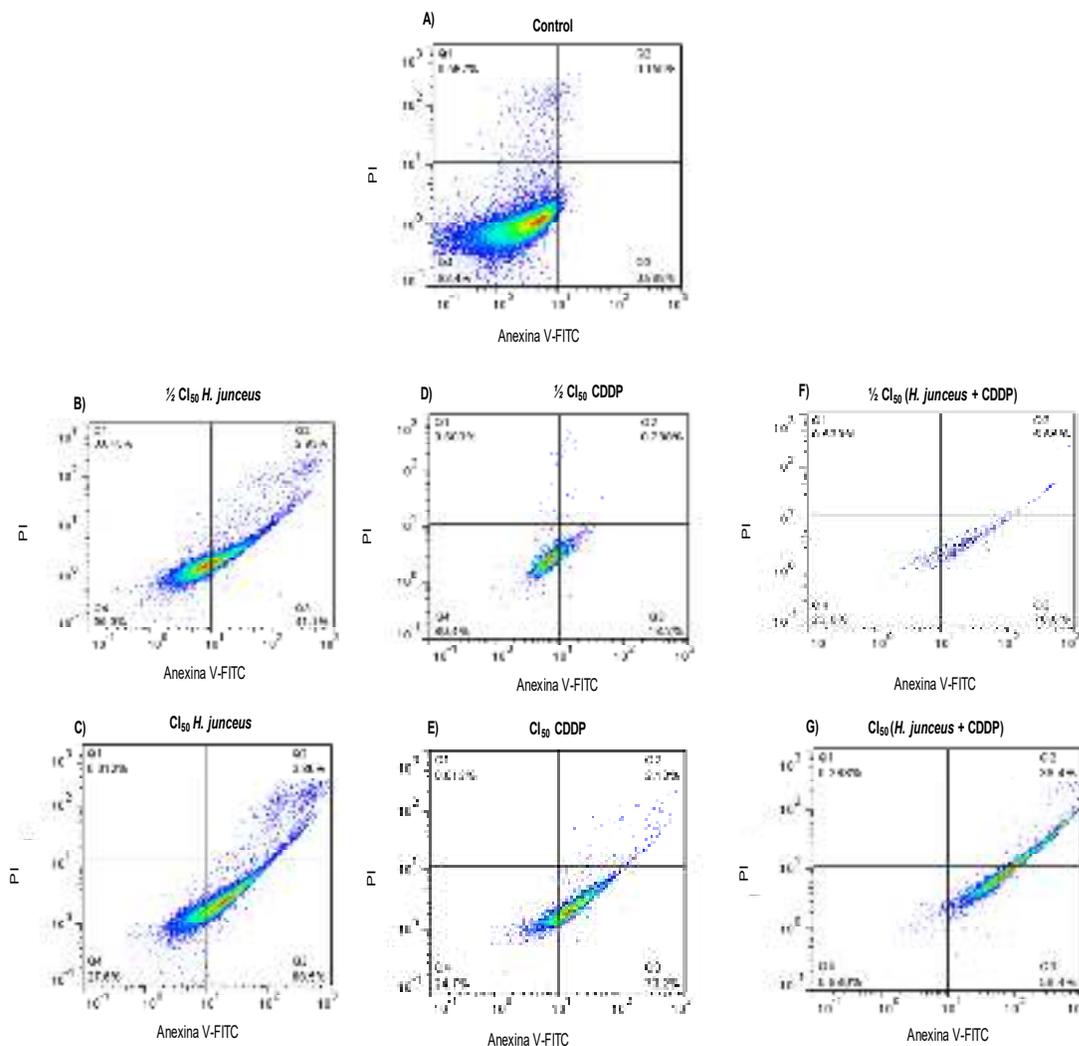


Figura 2. Dot plot del doble marcaje con Anexina V y PI de las células tumorales A549 tratadas con monoterapia y la combinación del veneno de escorpión *H. junceus* con

CDDP. Las células A549 se trataron durante 24 horas con $\frac{1}{2}$ CI₅₀ *H. junceus*, CI₅₀ *H. junceus*, $\frac{1}{2}$ CI₅₀ CDDP, CI₅₀ CDDP, $\frac{1}{2}$ CI₅₀ *H. junceus* + $\frac{1}{2}$ CI₅₀ CDDP y CI₅₀ *H. junceus* + CI₅₀ CDDP + $\frac{1}{2}$ CI₅₀ CDDP. A) Dot plot representativo de las células no tratadas. B) Dot plot representativo de las células tratadas con $\frac{1}{2}$ CI₅₀ *H. junceus*. C) Dot plot representativo de las células tratadas con CI₅₀ *H. junceus*. D) Dot plot representativo de las células tratadas con $\frac{1}{2}$ CI₅₀ CDDP. E) Dot plot representativo de las células tratadas con CI₅₀ CDDP. F) Dot plot representativo de las células tratadas con $\frac{1}{2}$ CI₅₀ CDDP + $\frac{1}{2}$ CI₅₀ *H. junceus*. G) Dot plot representativo de las células tratadas con CI₅₀ CDDP + CI₅₀ *H. junceus*. Se representa el porcentaje de células vivas (Anexina V negativas/PI negativas), en apoptosis temprana (Anexina V positivas/PI negativas), en apoptosis tardía (Anexina V positivas/PI positivas) y en necrosis (Anexina V negativas/PI positivas).

En la Tabla 2, se observa que después de 24 h, la combinación del veneno del escorpión *H. junceus* con CDDP fue el tratamiento con mayor eficacia en la inducción de apoptosis. El % de células vivas del tratamiento con el veneno se obtuvo en un rango de 24,98%-51,24%, para el CDDP entre el 21,30-70,46% y para la combinación entre 1,07-19,51%. El tratamiento con el veneno indujo entre un 48,7 %-74,96% de células en apoptosis, el CDDP entre un 28,04 %-78,71% y la combinación del veneno con CDDP entre un 80,20-98,37 % de células en apoptosis total.

Tabla 2: Valores promedios correspondiente a el porcentaje (%) de células vivas, en apoptosis y necrosis según el doble marcaje con Anexina V/PI de las células tumorales A549 tratadas con el veneno *H. junceus*, el CDDP y la combinación del veneno con CDDP.

Tratamiento		Células Vivas (%)	Apoptosis (%)			Necrosis
			Temprana	Tardía	Total	
Control		93,56	0,24	0,24	0,48	5,74
<i>H. junceus</i> (mg/mL)	1/2 CI ₅₀	51,24	40,74	7,96	48,70	0,05
	CI ₅₀	24,98	64,49	10,47	74,96	0,05
CDDP (mg/mL)	1/2 CI ₅₀	70,46	22,64	5,41	28,04	1,49
	CI ₅₀	21,30	72,75	5,96	78,71	0,02
<i>H. junceus</i> + CDDP	1/2					
	CI ₅₀	19,51	51,34	28,86	80,20	0,29

(mg/mL)						
	CI ₅₀	1,07	50,11	48,26	98,37	0,14

DISCUSIÓN

Los productos naturales se han utilizado fundamentalmente en combinación con agentes quimioterapéuticos convencionales, lo cual aumenta la efectividad del tratamiento contra el cáncer y logra una disminución de los efectos secundarios provocados por los antineoplásicos (Pezzani y cols., 2019; Hackman y cols., 2020; Zhang y cols., 2020; Vladu y cols., 2022). Una ventaja adicional de la combinación con productos naturales es la posibilidad de reducir la concentración del fármaco convencional, lo cual posibilita la reducción de su potencial efecto tóxico sobre células no tumorales e impide la quimiorresistencia que con frecuencia ocasiona una interrupción e ineficacia de la terapia antitumoral (Eslami y cols., 2024). Hasta el momento, se desconoce el tipo de interacción farmacológica de la combinación del veneno de escorpión *H. junceus* con citostáticos convencionales sobre células tumorales de pulmón.

La combinación del veneno con 5-FU fue sinérgica para todas las concentraciones evaluadas, en la combinación con CDDP fue sinérgica en tres concentraciones evaluadas y antagonicas en la mayoría de las concentraciones evaluadas con CTX. El hecho que la combinación de un producto natural con quimioterapia convencional puede inducir diferentes interacciones farmacológicas fue similar a lo informado para la combinación del resveratrol con 5-FU en HeLa, debido a que produce un efecto antagonista o aditivo en dependencia de la concentración empleada del producto natural (Mohan y cols., 2014). Además, concuerdan con lo informado para la combinación del extracto de la flor *Allium atrovioleaceum* Boiss con DOX da como resultado un incremento sinérgico de la actividad inhibitoria del crecimiento de HeLa, en comparación con la monoterapia (Khazaei y cols., 2017). Por otro lado, Ayyagari y colaboradores (2017) demostraron que la eficacia de la combinación del bitionol (BT) con CDDP depende de las concentraciones de los fármacos utilizadas. En las líneas celulares sensibles al cisplatino, la combinación de BT con CDDP fueron en su mayoría antagonistas excepto cuando se usaron en concentraciones bajas, donde se observó sinergia, lo que concuerda con nuestros resultados. Por el contrario, en las células resistentes al CDDP, el tratamiento combinado de BT con CDDP mostró efectos sinérgicos en la mayoría de las proporciones de concentraciones



de fármaco (Ayyagari y cols., 2017). Esto sugiere que los efectos de combinación de dos o más compuestos se rigen por la interacción de sus respectivas concentraciones (Tallarida, 2012).

Los resultados del presente estudio con CTX pudiesen parecer contradictorios a lo informado de que a bajas concentraciones de los citostáticos 5-FU, DOX y CDDP interactúan sinérgicamente con el veneno *H. junceus* y solo se observan interacciones antagónicas a altas concentraciones de los citostáticos en la línea tumoral de cérvico-uterino HeLa (Yglesias-Rivera y cols., 2019). No obstante, estas diferencias pueden estar porque a pesar de que son líneas tumorales de origen epitelial, difieren los valores de CI_{50} del veneno *H. junceus* para el cáncer cérvico-uterino humano HeLa y el de pulmón A549; siendo esta última más sensible. Además, en el estudio de Yglesias-Rivera y colaboradores donde la interacción antagónica se observó a altas concentraciones de los citostáticos, no se evaluó el citostático CTX. Por otro, los resultados de ambos estudios fueron similares para el CDDP. En el caso del 5-FU en la línea A549, a diferencia del estudio publicado en el 2019 con HeLa todas las combinaciones evaluadas fueron sinérgicas y esta diferencia puede estar dada por la sensibilidad de la línea tumoral a la acción del veneno.

En el presente estudio se demostró que la combinación del veneno con CDDP que es un citostático muy utilizado en la práctica clínica en el tratamiento de diferentes localizaciones tumorales incrementa el porcentaje de células en apoptosis, respecto al tratamiento individual. El veneno del escorpión *H. junceus* induce la muerte celular por apoptosis en HeLa (Díaz-García y cols., 2013) y MDA-MB-231 (Díaz-García y cols., 2017) mediante la regulación positiva de los genes pro-apoptóticos p53 y bax y la regulación negativa del gen anti-apoptótico bcl-2. Por lo general, una disminución de la expresión de bcl-2 se ha asociado con una mejora de la quimiosensibilidad a agentes como DOX (Emi y cols., 2005). Autores como Khazaei y colaboradores (2017) han sugerido que la disminución la expresión de Bcl-2 por el extracto natural *Allium atrovioleaceum* Boiss mejora la sensibilidad al fármaco al modular la vía de transducción de señales apoptóticas (Khazaei y cols., 2017).

CONCLUSIÓN

El tratamiento combinado del veneno de escorpión *H. junceus* con citostáticos convencionales es capaz de potenciar sinérgicamente su efecto antitumoral, en dependencia de la concentración y del tipo de citostático empleado en la combinación; así como promover una favorable reducción de la



dosis de la terapia convencional, lo cual implicaría una reducción de sus efectos adversos y de la quimiorresistencia.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Siegel R, Miller K, Sandeep N, Jemal A. Cancer statistics, 2023. *CA Cancer J Clin.* 2023; 73: 17-48.
- Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay ME, Siegel R, Soerjomataram I, Jemal A. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2024; 74: 229-263.
- García-Fernández C, Saz A, Fornaguera C. Cancer immunotherapies revisited: state of the art of conventional treatments and next-generation nanomedicines. *Cancer Gene Ther.* 2021; 28: 935–46.
- Pezzani R, Salehi B, Vitalini S, Iriti M, Zuñiga F, Sharifi-Rad J, et al. Synergistic Effects of Plant Derivatives and Conventional Chemotherapeutic Agents: An Update on the Cancer Perspective. *Medicina.* 2019; 55: 1-15.
- Pan P, Huang Y, Oshima K, Yearsley M, Zhang J, Arnold M, et al. The immunomodulatory potential of natural compounds in tumor-bearing mice and humans. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2019; 59: 992-1007.
- Mikaelian A, Traboulay E, Zhang X, Yeritsyan E, Pedersen P, Ko Y, et al. Pleiotropic Anticancer Properties of Scorpion Venom Peptides: *Rhopalurus princeps* Venom as an Anticancer Agent. *Drug Des Devel Ther.* 2020; 14: 881-93.
- Rajput SS, Mohan H, Jadhav E, Sonone SS, Nagar V, Singh A, et al. Therapeutic potential of scorpion venom in cancer treatment as anticancer agent: A review. *J Forensic Med Toxicol.* 2021; 38: 1-14.
- Esposito L, Yamaguti H, Souza C, Pinto-Da Rocha R, Prendini L. Revision of the neotropical club-tailed scorpions, *Physoctonus*, *Rhopalurus* and *Troglophalurus*, revalidation of *Heteroctenus*, and descriptions of two new genera and three new species (*Buthidae: Rhopalurusinae*). *Bull Am Mus Natural History.* 2017; 415: 1-134.
- Díaz-García A, Morier-Díaz L, Frión-Herrera Y, Rodríguez-Sánchez H, Caballero-Lorenzo Y, Mendoza-Llanes D. In vitro anticancer effect of venom from Cuban scorpion *Rhopalurus junceus* against a panel of human cancer cell lines. *J Venom Res.* 2013; 4:5-12.



Díaz-García A, Ruiz-Fuentes JL, Rodríguez-Sánchez H, Fraga-Castro JA. *Rhopalurus junceus* scorpion venom induces apoptosis in the triple negative human breast cancer cell line MDA-MB-231. *J Venom Res.* 2017; 8:9-13.

Casamayor-Laime Z, Guevara-García M, Gonzalez-Laime S. Empleo del Vidatox 30 CH en el alivio del dolor y otros síntomas de enfermedades inflamatorias. *Rev Cub Farm.* 2020; 53: 1-15.

Zhang G, Wang J, Zhao Z, Xin T, Fan X, Shen Q. Regulated necrosis, a proinflammatory cell death, potentially counteracts pathogenic infections. *Cell Death Dis.* 2022; 13: 1-14.

Vladu A, Ficai D and Ficai A. Combination Therapy Using Polyphenols: An Efficient Way to Improve Antitumoral Activity and Reduce Resistance. *Int. J. Mol. Sci.* 2022; 23: 1-36.

Alajmi R, Al-ghamdi S, Barakat I, Mahmoud A, Abdon N, Al-Ahidib M, Abdel-Gaber R. Antimicrobial Activity of Two Novel Venoms from Saudi Arabian Scorpions (*Leiurus quinquestriatus* and *Androctonus crassicauda*) *Int. J. Pept. Res. Ther.* 2020; 26: 67-74.

Kari, S., Subramanian, K., Altomonte, I.A. et al. Programmed cell death detection methods: a systematic review and a categorical comparison. *Apoptosis.* 2022; 27: 482-508.

Hackman G, Collins M, Lu X, Lodi A, DiGiovanni J, Tiziani S. Predicting and Quantifying Antagonistic Effects of Natural Compounds Given with Chemotherapeutic Agents: Applications for High-Throughput Screening. *Cancers.* 2020; 12: 1-20. *Oncol.* 2022; 12: 1-38.

Eslami M, Memarsadeghi O, Davarpanah A, Arti A, Nayernia K, Behnam B. Overcoming Chemotherapy Resistance in Metastatic Cancer: A Comprehensive Review. *Biomedicines.* 2024; 12: 1-28.

Mohan A, Narayanan S, Sethuraman S, Maheswari U. Novel Resveratrol and 5-Fluorouracil Coencapsulated in PEGylated Nanoliposomes Improve Chemotherapeutic Efficacy of Combination against Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *BioMed Research International.* 2014.

Khazaei S, Ramachandran V, Abdul R, Mohd N, Etemad A, Moradipoor S, et al. Flower extract of *Allium atroviolaceum* triggered apoptosis, activated caspase-3 and down-regulated antiapoptotic Bcl-2 gene in HeLa cancer cell line. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2017; 89 1216–26.

Ayyagari V, Jeff-Hsieh T, Diaz-Sylvester P, Brard L. Evaluation of the cytotoxicity of the Bithionol - cisplatin combination in a panel of human ovarian cancer cell lines. *BMC Cancer.* 2017; 17: 1-15.



Tallarida R. Revisiting the isobole and related quantitative methods for assessing drug synergism. *J Pharmacol Exp Ther.* 2012; 342: 2-8.

Yglesias-Rivera A, Rodríguez-Sánchez H, Díaz-García A. Synergistic effect of *Rhopalurus junceus* scorpion venom combined with conventional cytostatics in cervical cancer cell line HeLa. *jppres.* 2019;7(1):67-76.