

UNIVERSIDAD DE SONORA

FACULTAD INTERDISCIPLINARIA DE INGENIERÍA

Departamento de Investigación en Polímeros y
Materiales

**Actividad Antitumoral de Toxinas del Veneno de
Serpientes de Cascabel (*Crotalus* spp.) Libre y
Encapsulado en Nanopartículas de PLGA Frente a
Células Cáncer de Mama.**

TESIS

Que para obtener el título de
DOCTOR EN CIENCIA DE MATERIALES

PRESENTA:

c.Dr.: Jorge Jiménez Canale

**“El saber de mis hijos
hará mi grandeza”**

Hermosillo, Sonora

Agosto del 2023

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**

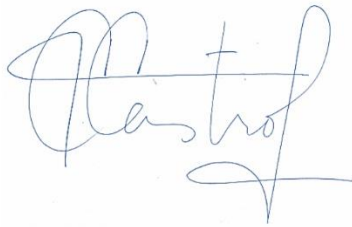


Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual de la Universidad de Sonora y del Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales (DIPM). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del director de tesis, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director de la Tesis.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al DIPM, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Castro', with a stylized flourish at the end.

Dra. Teresa del Castillo Castro

Jefe del Departamento

APROBACIÓN DE TESIS

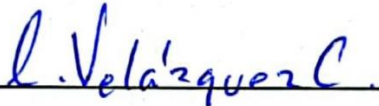
Los miembros del jurado designado para revisar la tesis de doctorado del M.N. Jorge Jiménez Canale, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de **Doctor en Ciencia de Materiales**.



Dr. Enrique Fernando Velázquez Contreras
Presidente



Dr. José Andrei Sarabia Sainz
Secretario



Dr. Carlos Arturo Velázquez Contreras
Sinodal



Dra. Erika Silva-Campa
Sinodal



Dra. Hisila del Carmen Santacruz Ortega
Sinodal



Dr. José Ángel Huerta Ocampo
Sinodal Externo

DEDICATORIA

Pocas personas tienen idea lo que es tener que recibir animales de importancia médica, cuyos piquetes o mordeduras ponen en riesgo la salud, en sus casas, por cuestiones de rescate y reubicación. Por ello, dedico este trabajo primeramente a mi familia. Mi esposa la Dra. Estephania Monteverde Bernal quien con su apoyo incondicional y profundo amor aguantó tantas veces la situación anterior. A mis padres, quienes tuvieron que criar a una pequeña persona con un interés hacia estos animales desde muy temprana edad. A mis hermanas y hermanos, quienes fácilmente pueden contar más de una aventura de mis hazañas con fauna.

Se dice que una persona es un cúmulo de aquello que ha vivido y que lo rodea, dedico este trabajo también a todas aquellas amistades que me han ayudado a forjarme en quien soy actualmente. José Vázquez, Héctor Rogel y Diego Félix, Jesús Castellanos, Cristian Navarro y sus familias, quienes no ha habido ocasión en la que no me reciban de manera calurosa como un integrante más.

Al grupo de Capoeira Brasil Hermosillo, especialmente a Iván Sandoval, quien guio, entrenó y aconsejó durante mi desarrollo desde la adolescencia hasta la adultez, y a un sinnúmero de sus integrantes, quienes desafortunadamente no tengo el espacio para mencionarlos a todos, ustedes saben quiénes son, y ustedes saben que este trabajo se los dedico también.

A mis colegas, compañeros y amigos de la licenciatura en Biología, su apoyo en que siguiera mis sueños, entre bromas y verdades, por fin ha rendido frutos. A los compañeros de la maestría en Nanotecnología, quienes definitivamente forjamos una amistad invaluable, muchas gracias. Recuerden que tatuarse algo automáticamente los convierte expertos en el tema. A los compañeros del posgrado en Ciencia de Materiales, y muy especialmente a todos aquellos con quienes tuve oportunidad de conocer y trabajar en el laboratorio de Biofísica médica, sin ustedes no pudiera haberse completado esto.

Por último, creo que es muy importante reconocer a aquellas primeras personas que nos educaron, a los doctores Julián Robles y Andrei Sarabia, Martín Grajeda, Arnulfo Morales y Rafael Canett. Muchas gracias, lo pudimos hacer.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) por el otorgamiento de una Beca (CVU No. 863549) durante la duración del posgrado para poder continuar con mis estudios.

Al Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales (DIPM) de la Universidad de Sonora (UNISON) por el aporte de reactivos, equipo e instalaciones necesarios para realizar los experimentos del presente proyecto.

Al equipo de investigación del Dr. Alejandro Alagón Cano y el Dr. Edgar Neri Castro del Instituto de Biotecnología de la UNAM por sus valiosas donaciones de venenos, así como consejo técnico.

Al laboratorio de Bioquímica de Proteínas y Glicanos del Centro de Investigaciones en Alimentación y Desarrollo, A.C., por su ayuda en el análisis de muestras y prestación de equipo.

Al Museo Itinerante de Vida Animal, y especialmente su director general, Gerardo Lorenzo Acosta Campaña, por su exhaustiva labor y cooperación en la donación de venenos, sin su apoyo este y muchos otros trabajos no serían posible.

A mi comité tutorial por su invaluable apoyo en este proyecto, sus consejos y dirección experimental.

Muchas gracias

CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE TABLAS.....	IX
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
CAPÍTULO 1	4
1.1 INTRODUCCIÓN	4
1.2 OBJETIVOS.....	6
1.2.1 Objetivo general	6
1.2.2 Objetivos específicos	6
CAPÍTULO 2	7
2.1 ANTECEDENTES.....	7
2.1.1 Cáncer.....	7
2.1.2 Nanopartículas y Nanomedicina	13
2.1.3 Venenos de Serpientes	17
CAPÍTULO 3	24
3.1 DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	24
3.1.1 Materiales.....	24
3.1.2 Métodos	24
3.1.3 Caracterización	25
CAPÍTULO 4	31
4.1 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
4.1.1 Caracterización del Veneno de <i>Crotalus molossus</i>	31
4.1.2 Síntesis y Caracterización de Nanopartículas de PLGA	41

CAPÍTULO 5	57
5.1 CONCLUSIONES.....	57
5.2 PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES.....	58
REFERENCIAS.....	59
ANEXOS	73
Presentaciones en Congresos	103

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de incidencia por cáncer en el mundo para el año 2020, considerando toda la población (imagen modificada de Cancer Today).....	8
Figura 2. Mapa de mortalidad por cáncer en el mundo para el año 2020, considerando toda la población (Imagen modificada de Cancer Today).....	8
Figura 3. Medicamentos anticancerígenos y su mecanismo de acción en el ciclo celular.....	11
Figura 4. Principales efectos secundarios derivados de la aplicación de algunos agentes quimioterapéuticos.....	12
Figura 5. Escala de trabajo en Nanotecnología y nanoestructuras.	13
Figura 6. Estructura molecular del ácido poli-(D-L-láctico-co-glicólico) (PLGA). ..	15
Figura 7. Fotografías de serpientes mexicanas. (A) Serpiente rey mexicana (<i>Lampropeltis nigrata</i>), (B) Chicotera sonorensis (<i>Masticophis bilineatus</i>), (C) Serpiente narizona/Falsa coralillo (<i>Rhinocheilus lecontei</i>) y (D) Cascabel de Mojave (<i>Crotalus scutulatus</i>).	17
Figura 8. Esquema del uso de venenos de víboras de cascabel para desarrollo farmacéutico.....	19
Figura 9. Representación gráfica de abundancia relativa de familias de toxinas presentes en veneno de serpientes del género <i>Crotalus</i> spp. (imagen modificada de Tasoulis & Isbister, 2017).....	21
Figura 10. Estructura 3D de crotamina y sus posibles usos en Biología y Farmacéutica.....	23
Figura 11. Geles de SDS-PAGE 15 % con (A) y (C) marcadores de amplio espectro, (B) veneno de <i>C. molossus</i> , (D) veneno de <i>C. culminatus</i> y (E) crotamina aislada de veneno de <i>C. culminatus</i>	32
Figura 12. Abundancia relativa de familias de toxinas en el veneno de <i>C. molossus</i>	33
Figura 13. Actividad hemolítica directa de veneno de <i>C. molossus</i> y crotamina. Datos son promedios, \pm para desviación estándar. C+ es H ₂ O y C- es solución salina.....	35

Figura 14. Actividad citotóxica del veneno de <i>C. molossus</i> sobre la línea celular T-47D.....	37
Figura 15. Determinación de IC ₅₀ de veneno de <i>C. molossus</i> sobre la línea celular T-47D.	38
Figura 16. Actividad citotóxica de la crotamina sobre la línea celular T-47D.....	40
Figura 17. Geles de SDS-PAGE de (A) veneno de <i>C. molossus</i> , (B) veneno extraído de NPs de PLGA, (C) crotamina y (D) crotamina extraída de NPs de PLGA.	45
Figura 18. Imágenes de Nanopartículas (A) NPs PLGA, (B) PLGA-Veneneo y (C) PLGA-Crotamina, reconstruidas en AFM en modo no-contacto.....	46
Figura 19. Análisis de FT-IR en modalidad ATR de Veneno de <i>C. molossus</i> , crotamina, NP PLGA, PLGA-Veneno y PLGA-Crotamina, en orden ascendente..	47
Figura 20. Actividad hemolítica directa de NPs de PLGA, PLGA-Veneno y PLGA-Crotamina.....	49
Figura 21. Determinación de porcentaje de liberación acumulativo de veneno de <i>C. molossus</i> en NPs PLGA-Veneno y crotamina en PLGA-Crotamina.....	50
Figura 22. Actividad citotóxica de NPs PLGA-Veneno en células T-47D.	52
Figura 23. Evaluación de IC ₅₀ de NP PLGA-Veneno.....	53
Figura 24. Evaluación de actividad citotóxica de NPs PLGA-Crotamina en línea celular T-47D.....	55

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Medicamentos aprobados por la FDA basados en nanopartículas, incluyendo PLGA.....	16
Tabla 2. Medicamentos basados en toxinas de venenos de animales, aprobados por la FDA.	20
Tabla 3. Toxinas provenientes de serpientes que han sido evaluadas en fases clínicas en humanos.....	22
Tabla 4. Resultados de síntesis de NPs de PLGA bajo distintas condiciones de solvente orgánico (DCM: diclorometano, ACN: acetonitrilo, TCM: triclorometano) y tipo de sonicación (C: sonicación continua, P: sonicación pulsada). Nm: Nanómetros, PDI: Índice de polidispersidad, Potencial ζ : Carga superficial. Datos son promedios, \pm para desviación estándar de triplicado.....	42
Tabla 5. Resultados de eficiencias de encapsulación (EE%), capacidad de carga (LC%) y rendimientos de NPs. Datos son promedios, \pm para desviación estándar.	43

RESUMEN

El cáncer es una enfermedad de origen multivariable y considerada como de gran importancia en el sector de salud pública de países desarrollados y en vías de desarrollo. En México el cáncer de mama se encuentra entre los primeros lugares con respecto a la incidencia, mortalidad y prevalencia, por lo que se precisan nuevas estrategias tanto para el diagnóstico como el tratamiento de la enfermedad. En ese sentido, la nanomedicina ha proporcionado nuevas estrategias para aumentar la efectividad de ciertos medicamentos anticancerígenos, entre las cuales destaca el encapsulamiento de fármacos en micro y nanopartículas poliméricas biodegradables. Adicionalmente, en los últimos años se ha reportado un incremento de fármacos de origen proteico aprobados por la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA por sus siglas en inglés) de Estados Unidos de América, y de manera similar, se ha reportado que algunas familias de toxinas provenientes de venenos de serpientes presentan actividad anticancerígena. En el presente trabajo desarrollamos un sistema de encapsulamiento de toxinas del veneno de la víbora de cascabel cola negra nortea, *Crotalus molossus*, así como de crotamina proveniente de la víbora de cascabel del pacífico, *Crotalus culminatus*, dentro de nanopartículas de PLGA. Se caracterizó el veneno, la crotamina y NPs PLGA-Veneno y PLGA-Crotamina, mediante técnicas fisicoquímicas y se evaluaron sus actividades biológicas y citotóxicas en la línea de carcinoma mamario ductal infiltrante, T-47D. Se obtuvieron NPs con un tamaño ~300 nm, monodispersas (PDI: 0.1 – 0.2) con carga superficial negativa (ζ : ~ -30 mV), así como una alta eficiencia de encapsulación. Se determinó una IC₅₀ para el veneno de *C. molossus* en 1.55 µg/mL y PLGA-Veneno en 22.24 µg/mL. Adicionalmente, se determinó una liberación sostenida del veneno de *C. molossus* de la matriz de PLGA, liberándose un ~25 % en un lapso de 72 h, y, una liberación bifásica por de crotamina, liberándose un ~40 % en 24 h y hasta un ~50 % a 72 h. En conclusión, el veneno de *C. molossus* y las NPs PLGA-Veneno lograron disminuir la viabilidad celular de las células cancerígenas T-47D. En ese sentido, la crotamina y NPs PLGA-

Crotamina también lograron dicha disminución, pero en menor medida, por lo que sugerimos realizar más estudios al respecto. Los resultados son prometedores para continuar investigando el potencial farmacológico de las toxinas de víboras de cascabel mexicanas como fuentes de agentes anticancerígenos, así como el sistema de encapsulamiento como una forma segura y efectiva de transporte de drogas.

ABSTRACT

Cancer is a disease of multivariable origin and considered to be of great importance in the public health sector of developed and developing countries. In Mexico, breast cancer is among the first places regarding its incidence, mortality, and prevalence, therefore new strategies are needed for diagnosis and treatment in the country. In that matter, nanomedicine has provided strategies to increase the effectiveness of certain anticancer drugs, such as encapsulating drugs in biodegradable polymeric micro and nanoparticles. Additionally, in recent years an increase in FDA-approved protein-based drugs has been reported, and similarly, some families of toxins from snake venoms have been reported to exhibit anticancer activity. In the present work we develop a system of encapsulation of toxins of the venom of the northern black-tailed rattlesnake, *Crotalus molossus*, and crotamine from the Pacific rattlesnake, *Crotalus culminatus*, within PLGA nanoparticles. The venom, crotamine and NPs PLGA-Venom and PLGA-Crotamine were characterized by physicochemical techniques and their biological and cytotoxic activities were evaluated in infiltrating ductal mammary carcinoma cell-line, T-47D. NPs with a size of ~300 nm, monodisperse (PDI: 0.1 – 0.2) and negative surface charge (ζ : ~ -30 mV) were obtained, both systems with high encapsulation efficiencies. An IC_{50} was determined for *C. molossus* venom at 1.55 $\mu\text{g/mL}$ and PLGA-Venom at 22.24 $\mu\text{g/mL}$. Additionally, it was determined that *C. molossus* venom underwent a sustained release from the PLGA matrix quantifying ~25 % at 72 h, and, crotamine on the other hand had a biphasic release with ~40 % at 24 h and ~50 % at 72 h. In conclusion, *C. molossus* Venom and PLGA-Venom NPs effectively lowered the T-47D cancer cells viability. In that sense, both crotamine and PLGA-Crotamine NPs were able to lower the cells viability, but in a lower manner, hence we recommend more studies to further understand why. The results are promising for further investigation of the pharmacological potential of Mexican rattlesnake toxins as sources of anticancer agents, as well as the use of PLGA NPs as a safe and effective form of drug delivery systems.

CAPÍTULO 1

1.1 INTRODUCCIÓN

El cáncer se considera como una de las principales causas de muerte tanto en países desarrollados, como algunos en vías de desarrollo (*World Health Organization*, 2023). Por ello, se ha estudiado profundamente su biología (Nunes et al., 2018) y diversos grupos de investigación buscan continuamente mejorar el tratamiento de estas enfermedades.

Entre las estrategias que se han empleado para mejorar el tratamiento, destacan los avances en nanomedicina (Abbasi Kajani et al., 2021). La nanomedicina ha destacado en los últimos años debido a los avances en el diseño y desarrollo de biomateriales que permiten mejorar la actividad farmacéutica de algunas moléculas (Abdel-Mageed et al., 2021), como es el caso de la encapsulación de medicamentos para una liberación prolongada (Ansary et al., 2017) o bien, el uso del efecto de permeabilidad y retención aumentada (EPR por sus siglas en inglés) de tumores sólidos (Subhan et al., 2021).

Uno de los biomateriales aprobados por la FDA para su desarrollo en fármacos dirigidos a humanos (Namiot et al., 2023) es el ácido poli-(láctico-co-glicólico) o PLGA. Este poliéster es capaz de formar micro y nanopartículas capaces de encapsular tanto moléculas hidrofóbicas como hidrofílicas (Makadia & Siegel, 2011) dependiendo de la técnica de síntesis empleada. Específicamente para el caso de moléculas hidrofílicas como péptidos y proteínas, se suele emplear una técnica de doble emulsión con evaporación de solvente (Iqbal et al., 2015).

Por otra parte, ciertos péptidos y proteínas se han reportado con excelente bioactividad con interés farmacéutico (Danquah & Agyei, 2012). La FDA ha aprobado hoy en día más de 20 medicamentos de origen proteico. Entre las principales limitantes para utilizar péptidos/proteínas como fármacos es su completa caracterización, los cortos tiempos de vida media en circulación sanguínea, así como posibles reacciones inmunogénicas. Sin embargo, también presentan ciertas ventajas sobre otros tipos de moléculas, por ejemplo, una alta

especificidad hacia ciertas células o tejidos, así como bioprocesos (biosíntesis de moléculas, señalización celular, activación de rutas metabólicas, entre otros), y claro, ser altamente solubles en medios acuosos. (Al Musaimi et al., 2021).

Adicionalmente, una fuente sumamente rica en péptidos y proteínas con actividad farmacológica son los venenos de serpientes (Calderon et al., 2014; Jimenez Canale et al., 2022B). Destacan en el continente americano los venenos de serpientes de la familia Viperidae, donde podemos encontrar las nauyacac (*Bothrops* spp.), víboras de pestañas (*Bothriechis* spp.) y víboras de cascabel (*Crotalus* spp.). México es el país que cuenta con mayor número de especies de víboras de cascabel en el mundo, y solamente en el estado de Sonora se han descrito 11 especies (Lemos-Espinal et al., 2019). Recientemente se han caracterizado algunos de los componentes principales de los venenos de víboras de cascabel (Deshwal et al., 2021) y anteriormente se ha demostrado que algunos de ellos presentan actividad anticancerígena *in vitro* e *in vivo* (Calderon et al., 2014).

Con el fin de avanzar en el estudio del uso de venenos de serpientes para el tratamiento de cáncer, en el presente trabajo se evaluó la actividad citotóxica tanto del veneno de la serpiente de cascabel cola negra (*Crotalus molossus*) y crotamina, una fracción de interés proveniente del veneno de la serpiente de cascabel del pacífico (*C. culminatus*), como en sus formas encapsuladas en NPs de PLGA, en líneas tumorales de cáncer de mama. Para ello se cultivaron células de la línea de carcinoma mamario ductal infiltrante, T-47D, las cuales representan un modelo *in vitro* de carcinoma ductal.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo general

Evaluar la actividad citotóxica de toxinas del veneno de serpientes de cascabel (*Crotalus* spp.), encapsulado en nanopartículas de PLGA.

1.2.2 Objetivos específicos

- 1.- Determinar el contenido de proteínas del veneno de *Crotalus molossus* de ejemplares provenientes de Hermosillo, Sonora, México, mediante LC-MS/MS y SDS-PAGE.
- 2.- Sintetizar nanopartículas poliméricas de PLGA mediante un proceso de doble emulsión-evaporación de solvente encapsulando veneno de *C. molossus* y crotamina proveniente de *C. culminatus*.
- 3.- Caracterizar las NPs obtenidas mediante técnicas fisicoquímicas como DLS, AFM, UV-VIS y FT-IR.
- 4.- Evaluar mediante ensayos de actividad hemolítica directa e indirecta la biocompatibilidad del veneno de *C. molossus*, crotamina y de las NPs PLGA-Veneno y PLGA-Crotamina.
- 5.-Evaluar la cinética de liberación del veneno encapsulado en las NPs PLGA-Veneno y PLGA-Crotamina mediante cuantificación de proteína en sobrenadante por el método del ácido bicinconínico (BCA).
- 6.- Determinar la actividad citotóxica del veneno, y NPs PLGA-Veneno, mediante ensayos de MTT en células de carcinoma mamario ductal infiltrante (T-47D).

CAPÍTULO 2

2.1 ANTECEDENTES

2.1.1 Cáncer

La palabra “cáncer” define al conjunto de malestares causados por el crecimiento de células neoplásicas (tumores) malignas en algún tejido. Estas células transformadas han perdido su capacidad de morir de manera natural (apoptosis) y crecen de manera descontrolada. La transformación de estas células normales a malignas puede estar ligada a procesos y rutas altamente conservadas en células que permiten una buena comunicación celular. En ese sentido, fallos en dichos procesos o rutas se han propuesto como puntos clave para la iniciación del desarrollo tumoral. Es importante hacer énfasis en que el cáncer se diferencia de otras enfermedades formadoras de tumores benignos, por su capacidad de invadir tejidos vecinos o secundarios, proceso que se denomina como metástasis (Arvelo & Cotte, 2006; Calderon et al., 2014; Trigos et al., 2018).

El cáncer es una de las principales causas de muerte en países desarrollados y subdesarrollados. En el año 2020, la Organización Mundial de la Salud, mediante el Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (IARC por sus siglas en inglés), estimaron más de 15 millones nuevos casos de cáncer, así como más de 9 millones de muertes debido a esta enfermedad (figura 1 y 2, respectivamente). Adicionalmente, se ha reportado que los gastos relacionados a estas enfermedades superan el trillón de dólares a nivel mundial, por lo que debemos de considerar el efecto no solo en la salud pública, sino también en la economía mundial y nacional (Bray et al., 2018; Padilla-Raygoza et al., 2020).

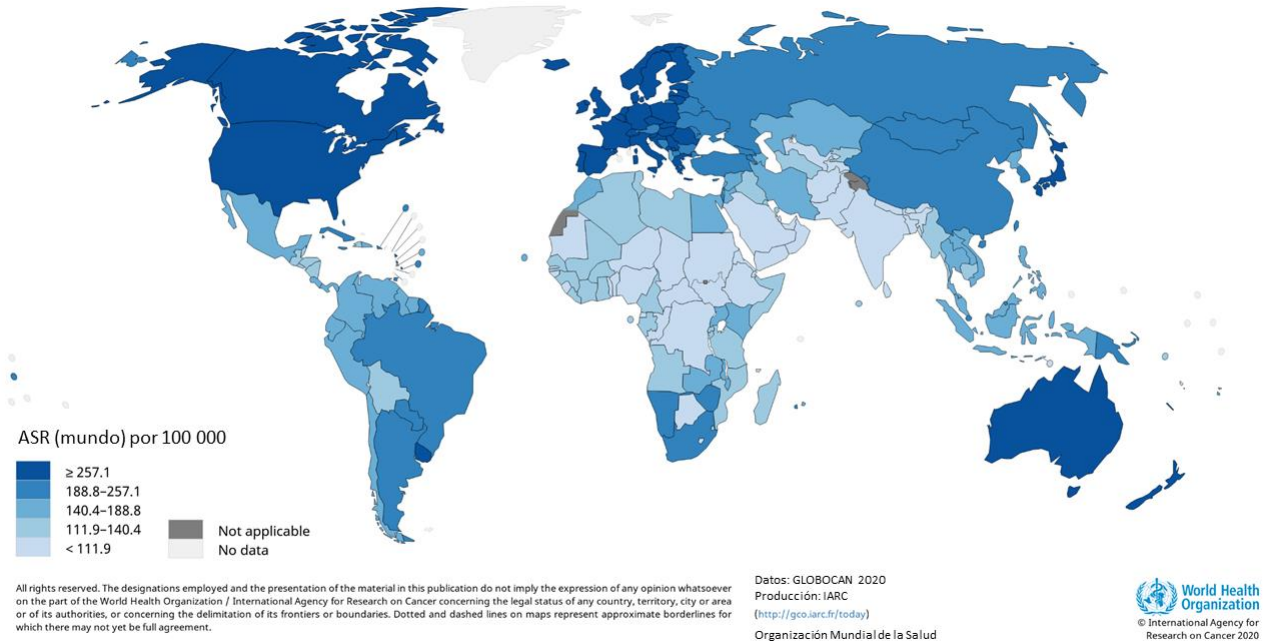


Figura 1. Mapa de incidencia por cáncer en el mundo para el año 2020, considerando toda la población (imagen modificada de Cancer Today).

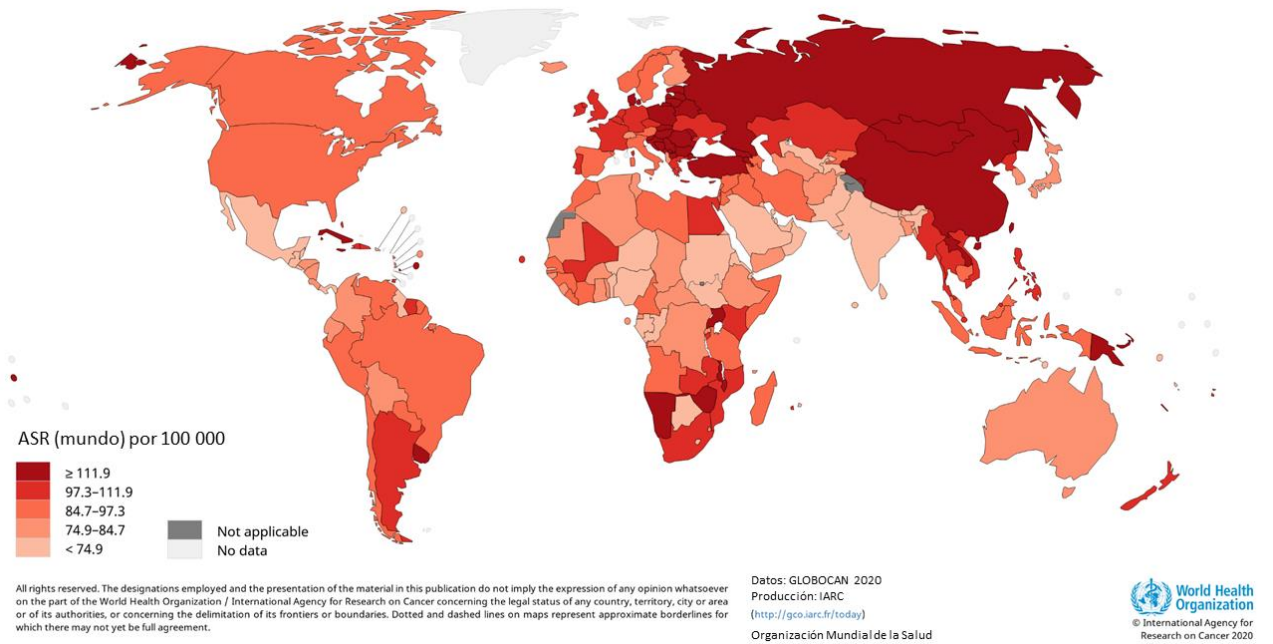


Figura 2. Mapa de mortalidad por cáncer en el mundo para el año 2020, considerando toda la población (Imagen modificada de Cancer Today).

Las causas que originan esta enfermedad son multifactoriales; si bien se ha reportado que el origen de la transformación celular puede estar relacionado con la herencia genética, existen factores de riesgo (FR) que ayudan a promoverlo. Entre los FR mejor estudiados y reconocidos destacan el sedentarismo, tabaquismo y alcoholismo. Un índice de masa corporal (BMI por sus siglas en inglés) elevado, puede ser indicador de sobrepeso y obesidad en un paciente, lo cual se considera como un factor de riesgo importante, ya que puede estar relacionado con una dieta no óptima y/o falta de actividad física. Por otro lado, se ha reportado que los cigarrillos pueden contener más de 50 agentes carcinogénicos. Estudios han reportado una asociación de cerca del 30 % de las muertes causadas por cáncer al tabaquismo. Cabe mencionar que el tabaquismo secundario (exposición de personas no fumadoras al humo de cigarrillo) también es considerado como un factor de riesgo. Adicionalmente, el consumo excesivo de alcohol es reconocido como un causante de cáncer de la cavidad oral del tracto digestivo (boca, faringe, laringe, esófago) así como de órganos relacionados con la digestión (estómago, hígado, colon y recto, entre otros) (Padilla-Raygoza et al., 2020).

Se ha reportado que la mayoría de las personas comienzan el tratamiento contra el cáncer alrededor de 35 días después de haber notado síntomas propios de una enfermedad grave y ser diagnosticados. Específicamente se observó el inicio de la terapia a los 25 y 35 días para el cáncer gastro-esofágico y de pulmón respectivamente, mientras que para el cáncer urinario y colorrectal fue de 59 y 49 días respectivamente. Aquellos pacientes que prolongaron el tiempo para atender los síntomas de la enfermedad presentaron un índice de mortalidad más alto que aquellos que se atendieron de manera más pronta. Uno de los principales problemas para el diagnóstico de cáncer es la detección temprana del mismo. Hoy en día las principales técnicas de diagnóstico diferenciado se basan en la imagenología de rayos X, resonancia magnética nuclear, colonoscopia, así como la obtención de biopsias y análisis de tejidos. El principal problema con estas técnicas es que carecen de sensibilidad y especificidad para una detección en las etapas iniciales de cáncer. Por otro lado, existen técnicas como tomografías por emisión de positrones (PET por sus siglas en inglés) que han reportado una alta tasa de

sensibilidad. Sin embargo, la necesidad de equipos altamente especializados, así como del personal requerido para operarlos e interpretar los resultados, dificulta un poco su uso con respecto a las técnicas previamente mencionadas (Dregan et al., 2013; Groheux & Hindie, 2021).

Si bien es de vital importancia obtener nuevos métodos diferenciales de diagnóstico para estas enfermedades, es de igual importancia el tratamiento específico de la enfermedad. Las tres principales estrategias actualmente empleadas para ello son la cirugía, radioterapia y quimioterapia. En particular, el desarrollo de nuevos fármacos recae en el campo de la quimioterapia. De manera general, los agentes quimioterapéuticos, comúnmente denominados como medicamentos anticancerígenos, se clasifican según su mecanismo de acción. Entre ellos se encuentran los agentes alquilantes (oxafosforinas, mostazas de nitrógeno, hidrazina, etc.), antimetabolitos (antagonistas de pirimidina, antagonistas de purinas, análogos de purinas, etc.), inhibidores de topoisomerasas I y II (irinotecan y topotecan, etopósido y tenipósido, respectivamente), inhibidores del huso mitótico (taxanos y vinca alcaloides) y otros, caracterizados por presentar mecanismos de acción no homogéneos, aquí destacan algunas enzimas como la L-asparaginasa, inhibidores de proteosoma y antibióticos antineoplásicos como las antraciclinas (Bukowski et al., 2020). En la figura 3 se representan algunos de los medicamentos mencionados, y de manera general, su mecanismo de acción en el ciclo celular.

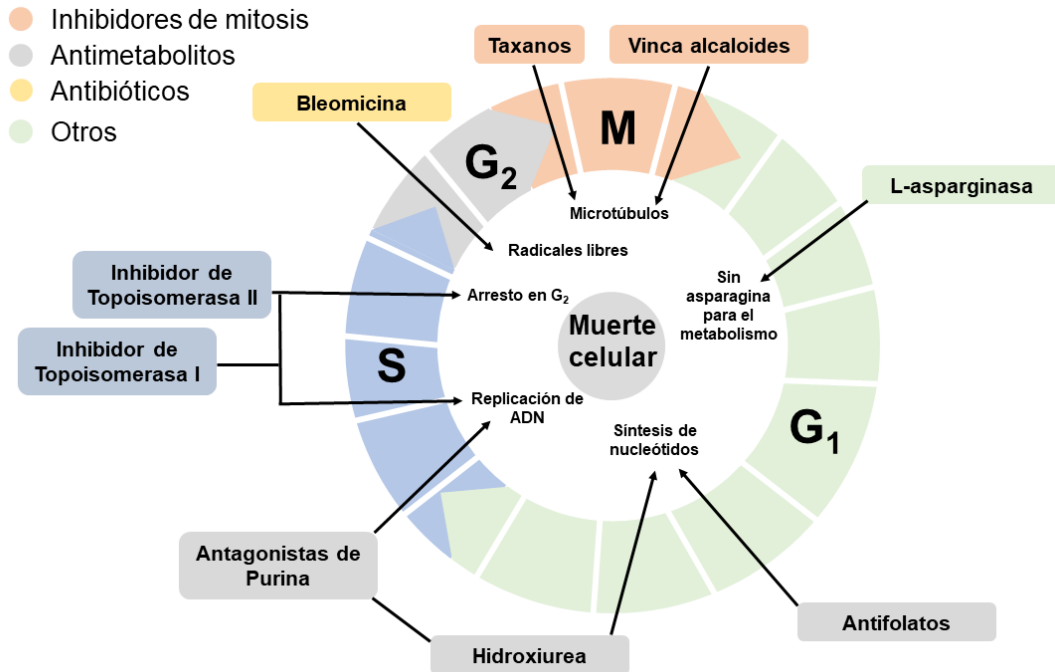


Figura 3. Medicamentos anticancerígenos y su mecanismo de acción en el ciclo celular.

Uno de los factores limitantes más importantes para la administración de fármacos antitumorales actualmente aprobados por agencias reguladores como la Administración de Alimentos y Medicamentos y la Asociación Médica Europea (FDA y EMA, por sus siglas en inglés, respectivamente), es la dificultad que estos presentan para diferenciar a células malignas de normales, produciendo efectos secundarios como se muestra en la figura 4. Adicionalmente, algunos de estos fármacos son poco solubles en agua, son poco estables en circulación sanguínea y/o costosos de producir. En ese sentido, se han propuesto diversas estrategias en las últimas décadas para mejorar la farmacocinética y farmacodinamia de estos medicamentos. Entre ellas se ha sugerido usar anticuerpos para ayudar a dirigir medicamentos a tejidos específicos, sin embargo, la inestabilidad genética de los tumores les confiere defensas naturales ante ellos conforme transcurre el tiempo. Por otra parte, una de las principales corrientes actuales para el desarrollo de mejores fármacos se basa en el diseño de nuevos sistemas de transporte y liberación de agentes activos para lo cual se ha propuesto el uso de moléculas como anticuerpos, péptidos penetradores de células (CPPs por sus siglas en inglés),

toxinas provenientes de plantas y animales, entre otros (Bell et al., 2014; Biswas et al., 2014).

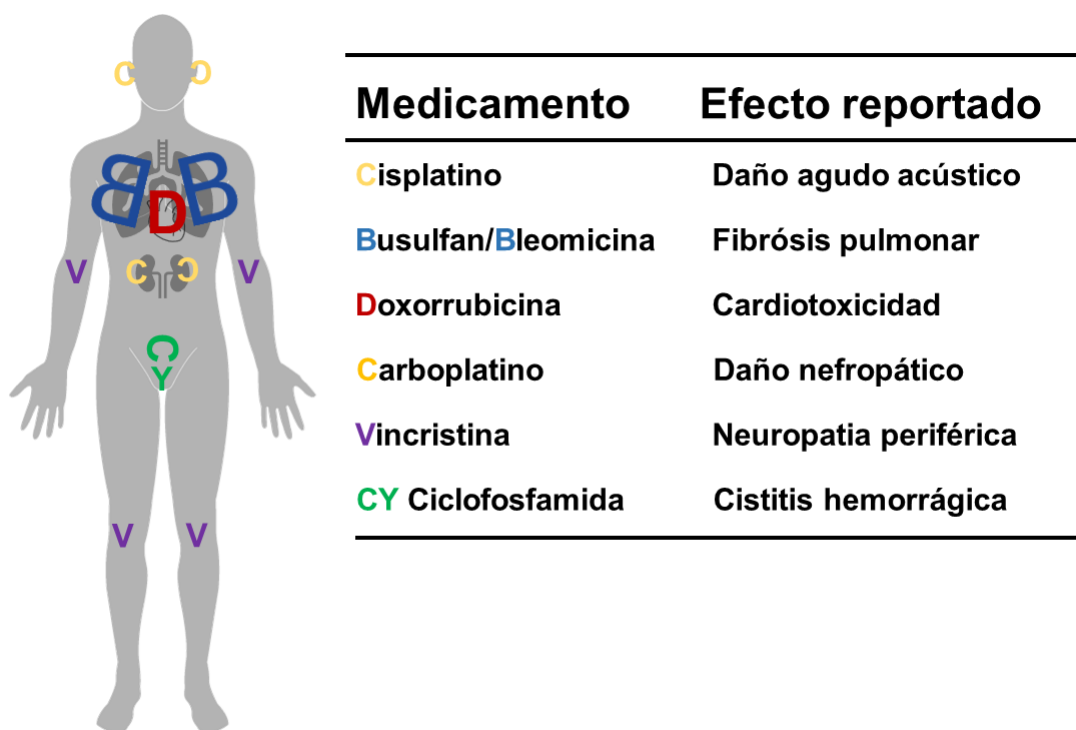


Figura 4. Principales efectos secundarios derivados de la aplicación de algunos agentes quimioterapéuticos.

Cabe destacar, como se representa en la figura 4, que todos los medicamentos antitumorales presentan efectos secundarios, los cuales pueden variar desde neuropatías periférica, hasta cardiotoxicidad y daño pulmonar. Lo anterior representa una gran área de oportunidad en la mejora de medicamentos para este tipo de enfermedades. Queda claro entonces que el mejoramiento de transportadores de fármacos es de gran interés en el sector farmacéutico. Una de las tantas formas en que se ha propuesto lo anterior, es combinar medicamentos con biomateriales, lo cual puede mejorar las propiedades farmacológicas. Por ejemplo, la encapsulación de medicamentos poco solubles en agua dentro de micro o nanopartículas puede aumentar significativamente su solubilidad acuosa, mejorando así su farmacocinética (Abbasi Kajani et al., 2021).

2.1.2 Nanopartículas y Nanomedicina

La nanotecnología es una ciencia interdisciplinaria que trabaja en una magnitud de 1×10^{-9} m. Es un área multi e interdisciplinaria en donde convergen conocimientos de química, física y biología, así como de muchas otras ciencias y ramas. Los avances proporcionados por la nanotecnología han permitido desarrollar nuevos materiales capaces de solucionar problemas de gran interés como energéticos, ecológicos y médicos. En la figura 5 se muestra una representación comparativa con una escala de tamaño. Destacan entre los 1 y 1000 nanómetros una variedad de nanoestructuras conocidas como nanopartículas (NPs). Una rama de la nanotecnología que ha sobresalido en las últimas décadas es la nanomedicina. La combinación de conocimientos de las ciencias previamente mencionadas con la medicina ha permitido la obtención de materiales de gran interés farmacológico (Biswas et al., 2014; Tran et al., 2017).

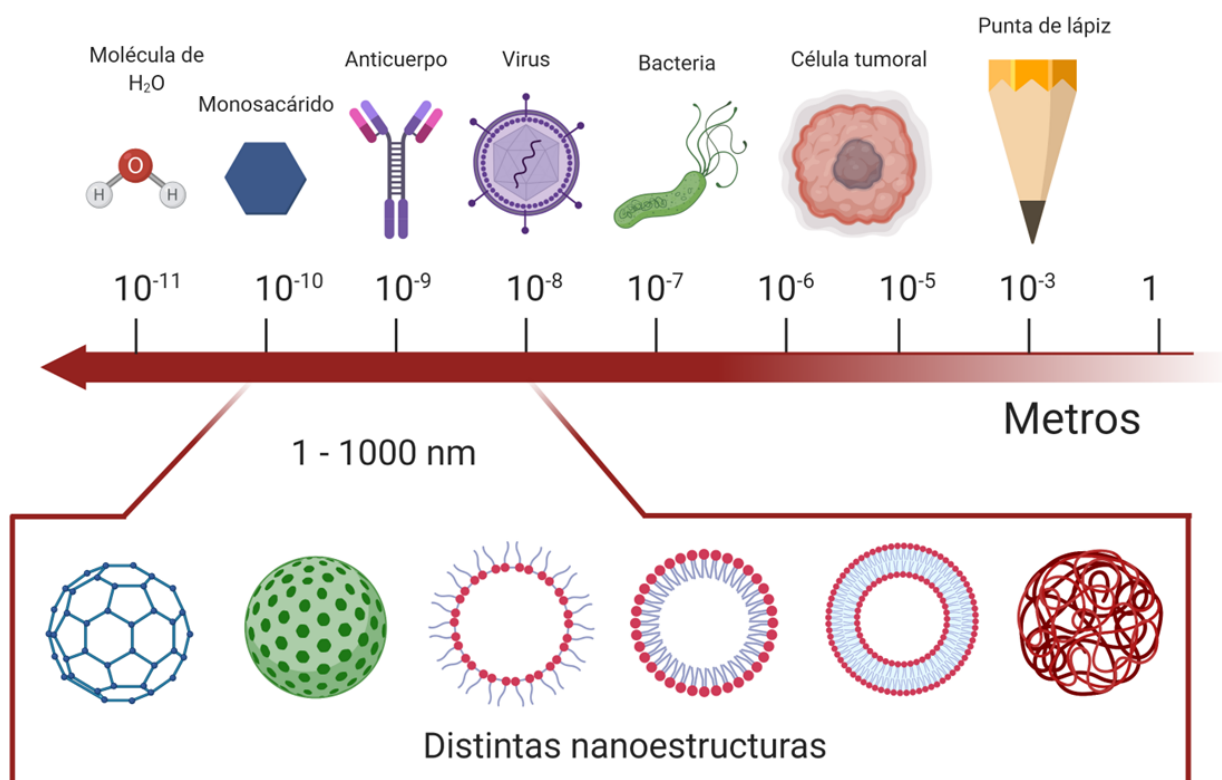


Figura 5. Escala de trabajo en Nanotecnología y nanoestructuras.

Un gran número de grupos de investigación han trabajado en el diseño y mejoramiento de transportadores de fármacos basados en su asociación con NPs.

Por ejemplo, se ha reportado que la encapsulación de fármacos en NPs de quitosano, alginato, o NPs lipídicas puede mejorar el efecto terapéutico de algunos medicamentos. Asimismo, una de las ventajas más notorias que se han reportado del uso de NPs para futuros tratamientos contra el cáncer, es la explotación del efecto de permeabilidad y retención aumentada (EPR por sus siglas en inglés), que se presenta en tumores sólidos. Los tumores suelen presentar una matriz extracelular muy distinta a la de células no transformadas, confiriéndoles un microambiente tumoral con un sistema linfático poco óptimo (pobre drenaje celular, aumentando la retención de ciertas partículas). Adicionalmente, se ha reportado que ciertas células tumorales presentan una mayor permeabilidad, por lo cual endocitan con gran facilidad y en mayor cantidad que células normales, partículas con tamaños > 500 nm. La combinación de un tamaño óptimo de NPs, así como un sistema de drenaje pobre, hacen que el efecto EPR potencialice el efecto terapéutico de algunos nanomedicamentos. Como se mencionó anteriormente, se pueden obtener NPs y asociarlas a moléculas de interés de diversos biomateriales, tales como quitosano (Cs), alginato de sodio (ALG), ácido láctico (PLA), ácido glicólico (PGA) y ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) (Butreddy et al., 2021; Maeda, 2021; Teran-Saavedra et al., 2020).

El ácido poli-(D-L-láctico-glicólico) (PLGA), figura 6, es probablemente uno de los polímeros más estudiados como vehículo transportador de fármacos. Lo anterior se debe a que se considera como un material biodegradable y biocompatible (la FDA y EMA lo categorizan como un material seguro), en la tabla 1 se muestran medicamentos con PLGA en su formulación. Se ha descrito que la internalización celular de NPs de PLGA se lleva a cabo por medio de pinocitosis, así como endocitosis regulada por la proteína clatrina, la cual forma parte del recubrimiento de las microcavidades de membranas celulares donde se sitúan receptores de lipoproteínas. Es importante denotar que la hidrólisis de este polímero sintético genera monómeros de los ácidos láctico y glicólico, los cuales son fácilmente metabolizados durante el ciclo de Krebs (Astete & Sabliov, 2006; Dangi & Shakya, 2013; Mohammadi-Samani & Taghipour, 2015).

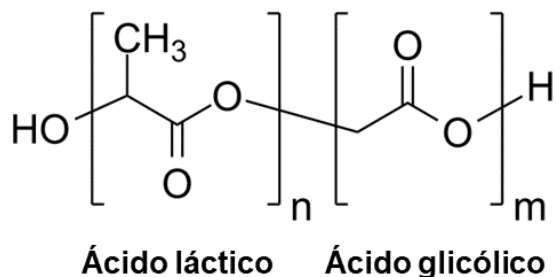


Figura 6. Estructura molecular del ácido poli-(D-L-láctico-co-glicólico) (PLGA).

Una ventaja de usar PLGA con respecto a otros compuestos, es que se pueden encapsular tanto moléculas hidrofóbicas como hidrofílicas, ambas con altas eficiencias de encapsulación (EE%). Dependiendo de los porcentajes de los monómeros que componen el PLGA, es posible controlar las características fisicoquímicas de las NPs. En ese sentido, las NPs de PLGA nos permiten trabajar en una gran gama de posibilidades, al poder controlar la estabilidad dentro de un sistema, sus perfiles de liberación, así como una vectorización pasiva/activa hacia un sitio de interés. Se pueden obtener NPs de PLGA empleando métodos como la nanoprecipitación así como emulsión sencilla y doble con evaporación de solvente. En el caso de la emulsión sencilla, se ha demostrado que es una técnica efectiva para la encapsulación de moléculas hidrofóbicas. Por otro lado, la técnica de emulsión doble ha sido la preferida para la encapsulación de compuestos hidrofílicos, como péptidos y proteínas (Allahyari & Mohit, 2015; Danhier et al., 2012).

Tabla 1. Medicamentos aprobados por la FDA basados en nanopartículas, incluyendo PLGA.

Medicamento	Material	Indicación	Referencia
Atrigel (triptorelina)	PLGA	Pacientes con cáncer de próstata o endometriosis	(Center for Drug Evaluation and Research, 2023)
Onivyde (irinotecán)	Liposoma – PLGA	Pacientes con cáncer de páncreas	
DepoDur (sulfato de morfina)	Liposoma – PLGA	Alivio de dolor postoperatorio	
Doxil (doxorubicina)	Liposoma - PLGA	Pacientes con cáncer de mama u ovario	
Abraxane (paclitaxel)	Albúmina – PLGA	Pacientes con cáncer de mama o páncreas	

Al controlar los parámetros de la síntesis, como la concentración de PLGA, concentración de péptido/proteína, volumen de fase acuosa y tiempos de homogenización/sonicación se puede controlar tanto el tamaño como la EE%.

Algunos péptidos/proteínas que se encuentran presentes tanto en plantas como en animales, se han estudiado a profundidad por sus actividades antibacterianas, antiparasitarias, cardiometabólicas y anticancerígenas. Una ventaja que ofrecen estas moléculas en contraste con otros medicamentos es que pueden llegar a presentar sitios de acción sumamente específicos en tejidos, así como su alta solubilidad en agua. Sin embargo, algunas de las claras desventajas son su inestabilidad en ambientes hostiles (cambios de pH, presencia de enzimas proteolíticas, etc.), su actividad citotóxica en tejidos sanos, así como su inmunogenicidad. Considerando que la encapsulación de estas moléculas dentro de NPs de PLGA puede conferir una barrera protectora contra estos efectos adversos, podemos entonces comenzar a visualizar una enorme gama de oportunidades para desarrollar una nueva línea de fármacos anticancerígenos (Allahyari & Mohit, 2015; Dingman & Balu-Iyer, 2019; Mohammadi-Samani & Taghipour, 2015).

2.1.3 Venenos de Serpientes

México cuenta con una gran diversidad de especies de reptiles donde destacan por factores culturales, ambientales y sociales, las serpientes. Las serpientes son animales escamados ectotérmicos (dependen de la temperatura externa para regular su homeostasis) y elongados, sin extremidades, como se observa en la figura 7. En México se han descrito 447 especies, convirtiéndolo en el país con la mayor diversidad de serpientes en el mundo. Adicionalmente, cabe destacar que algunas de estas especies producen venenos en glándulas especializadas, el cual utilizan tanto para defensa como para inmovilización de presas (Jimenez Canale et al., 2022B; *THE REPTILE DATABASE*, 2023).



Figura 7. Fotografías de serpientes mexicanas. (A) Serpiente rey mexicana (*Lampropeltis nigrita*), (B) Chicotera sonorensis (*Masticophis bilineatus*), (C) Serpiente narizona/Falsa coralillo (*Rhinocheilus lecontei*) y (D) Cascabel de Mojave (*Crotalus scutulatus*).

Existe una necesidad notoria de continuar estudiando a los venenos de serpientes. Lo anterior debido a que la composición de ellos está directamente ligada a los síntomas clínicos que se desarrollan post mordedura. Ciertos grupos de investigación han estudiado, caracterizado y evaluado exhaustivamente venenos de serpientes mexicanas, lo cual representa un pequeño, pero muy significativo,

avance con respecto al número de especies con las que cuenta el país. En ese sentido, en México contamos con la presencia de 93 especies de serpientes consideradas de importancia médica (su mordedura causará estragos en la salud tales que requieran atención médica), repartidas en dos familias: Viperidae con 76 especies y Elapidae con 17 especies. La familia Elapidae es reconocida a nivel mundial porque dentro de ella se encuentran serpientes como las cobras africanas y asiáticas, así como las mambas negras y verdes, y serpientes marinas. Por otro lado, en la familia Viperidae se encuentran serpientes que comúnmente conocemos como víboras, todas cuentan con la presencia de foseas loreales capaces de percibir calor de organismos. Un claro ejemplo de estas últimas víboras son las víboras de cascabel (*Crotalus* spp., y *Sistrurus* spp.) (Castro et al., 2020; Jimenez Canale et al., 2022B; Sánchez et al., 2020; *THE REPTILE DATABASE*, 2023).

México es el país que tiene mayor diversidad de especies de víboras de cascabel en todo el mundo, por lo que estudiar, caracterizar y evaluar los venenos de estas serpientes de manera sistemática es imprescindible para el aprovechamiento de sus componentes. Con respecto a lo anterior, debemos de considerar que estas serpientes ocasionan un número importante de mordeduras al año (~4000 según el (*Boletín Epidemiológico Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Sistema Único de Información | Secretaría de Salud | Gobierno | Gob.Mx*, 2023), y como se mencionó anteriormente, los componentes de los venenos son los que desencadenan distintos cuadros clínicos para pacientes mordidos. En ese sentido, es importante considerar que los componentes que ocasionan los diferentes síntomas clínicos derivados de la mordedura de una víbora de cascabel (neuro, hemo y citotoxinas), pudieran ser candidatos a fármacos, como se muestra en la figura 8.

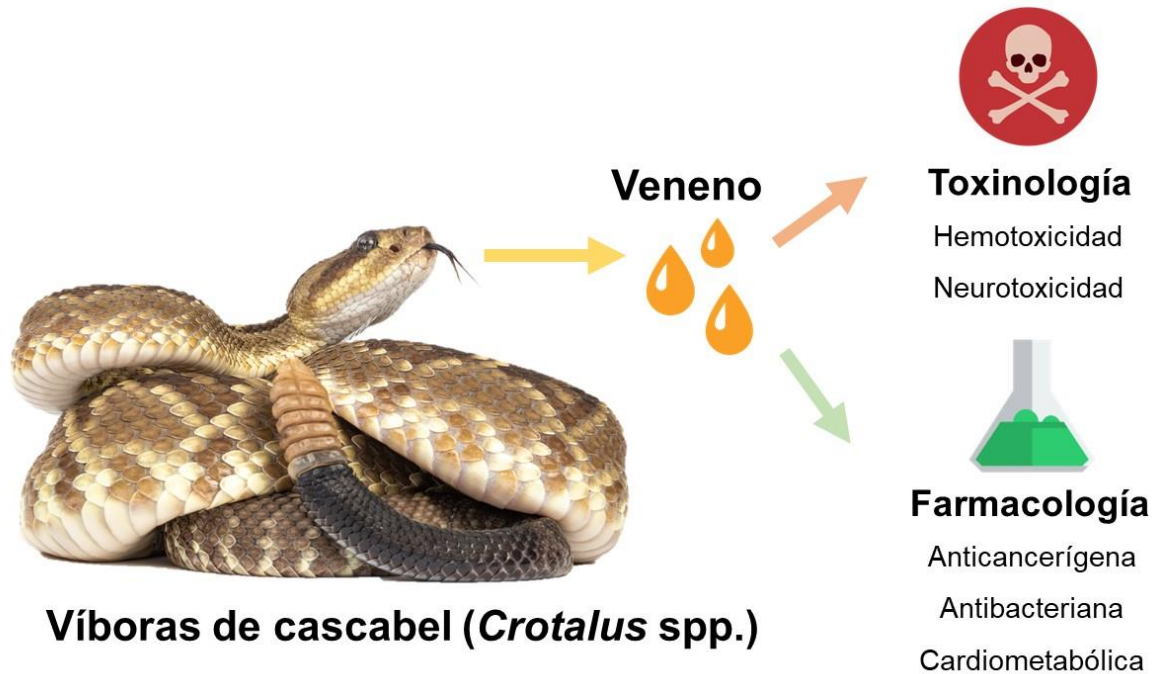


Figura 8. Esquema del uso de venenos de víboras de cascabel para desarrollo farmacéutico.

El uso de venenos de serpientes es una práctica ancestral, la cual se ha reportado en varias culturas. Adicionalmente, hoy en día se cuenta con medicamentos los cuales están basados en péptidos/proteínas provenientes de venenos de animales, los cuales se enlistan en la tabla 2. Para comenzar a visualizar su uso como medicamentos primero debemos definir qué es un veneno y qué propiedades presentan con características farmacológicas. Los venenos son mezclas complejas de biomoléculas como azúcares, lípidos, ácidos nucleicos, y principalmente péptidos y proteínas. Estos últimos son los principales causantes del desarrollo de síntomas clínicos derivados de su mordedura. Al ser de carácter proteico, las toxinas presentes en los venenos son sumamente variables, reportándose inclusive cambios ontogenéticos (con respecto al desarrollo del organismo), por sexo, distribución de la especie, entre otros (Anke Kaufmann et al., 2013; Borja et al., 2018; Fry, 2015).

Tabla 2. Medicamentos basados en toxinas de venenos de animales, aprobados por la FDA.

Medicamento	Especie de origen	Blanco de Tratamiento	Referencia
Capoten (Captopril)	<i>Bothrops jararacá</i>	Inhibidor de ACE utilizado para tratar hipertensión e insuficiencia cardiaca congestiva	(Center for Drug Evaluation and Research, 2023)
Byetta (Exenatida)	<i>Heloderma suspectum</i>	Medicamento inyectable para el tratamiento de diabetes tipo 2	
Prialt (Ziconotida)	<i>Conus magus</i>	Medicamento no opioide para el tratamiento de dolor crónico severo	
Aggrastat (Tirofiban)	<i>Sistrurus miliaris</i>	Medicamento antiplaquetario utilizado para la prevención de coágulos	
Exanta (Ximelagatran)	<i>Echis carinatus</i>	Medicamento anticoagulante utilizado para la prevención de coágulos	

Estudios anteriores han determinado que los componentes mayoritarios de los venenos de víboras de cascabel son familias de toxinas como las fosfolipasas A2 (PLA₂s), metaloproteasas (SVMPs), serinoproteasas (SVSPs) así como L-aminoácido oxidasas (LAAOs), lectinas de tipo C (CTLs) y proteínas secretoras ricas en cisteína (CRiSPs) como se muestra en la figura 9. (Tasoulis & Isbister, 2022). Adicionalmente, muchas de estas familias de toxinas se ha reportado que pueden presentar actividad citotóxica *in vitro* e *in vivo* sobre células tumorales. En algunos casos reportados, los mecanismos moleculares de dicha actividad están por definirse. Por otro lado, el empleo de algunas de estas toxinas ya se encuentra en fases clínicas en humanos, fortaleciendo la idea del potencial farmacológico que pueden presentar para diferentes malestares.

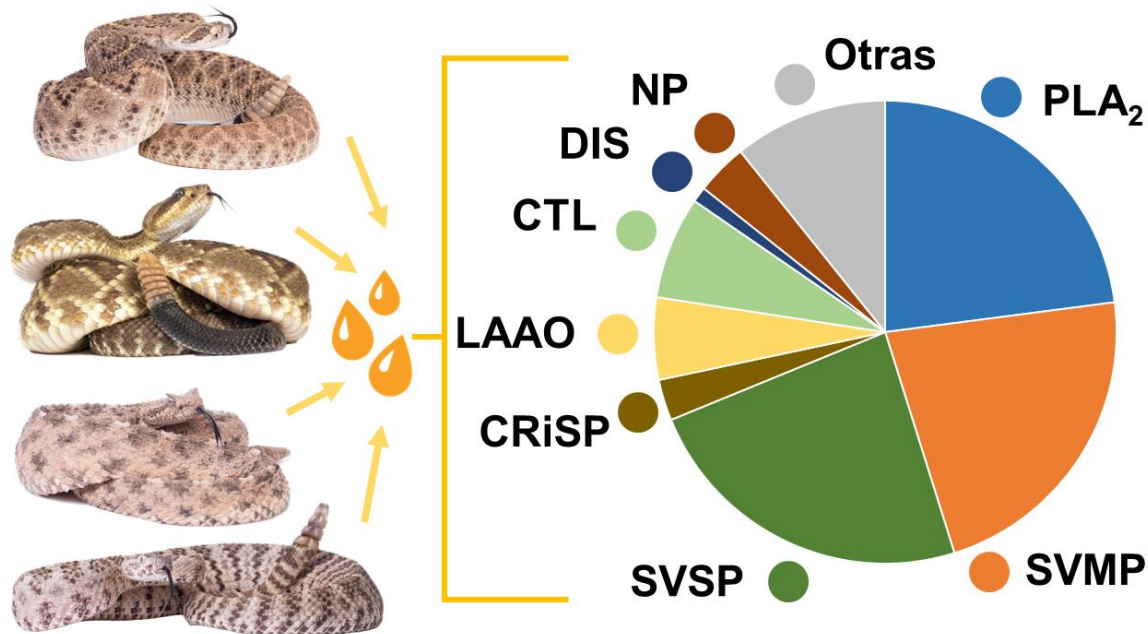


Figura 9. Representación gráfica de abundancia relativa de familias de toxinas presentes en veneno de serpientes del género *Crotalus* spp. (imagen modificada de Tasoulis & Isbister, 2017).

Es importante destacar que los mecanismos moleculares por los cuales algunas de estas familias de toxinas, así como toxinas aisladas y purificadas, presentan actividad citotóxica en líneas tumorales no se ha estudiado a profundidad. Sin embargo, lo anterior no ha detenido los esfuerzos por desarrollar nuevos biofármacos con origen en venenos de estos organismos. En la tabla 3 se presentan algunas toxinas provenientes de venenos de serpientes las cuales han llegado a alguna fase clínica, para diferentes enfermedades.

Tabla 3. Toxinas provenientes de serpientes que han sido evaluadas en fases clínicas en humanos.

Medicamento	Especie de origen	Blanco de Fase Clínica	Referencia
Crotoxina	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	Neurotoxina dimérica, se ha estudiado por sus efectos analgésicos en pacientes con cáncer, así como su potencial anticancerígeno	(Celtic Biotech Ltd, 2018)
Batroxobina	<i>Bothrops atrox</i>	Enzima proteolítica, se ha evaluado su potencial uso como agente anticoagulante	(Meng, 2020)
Ancrod	<i>Calloselasma rhodostoma</i>	Enzima serina proteasa, se ha evaluado su potencial uso como agente anticoagulante	(Neurobiological Technologies, 2009)
Eptifibatida	<i>Sistrurus miliaris</i>	Péptido pequeño, aprobada por la FDA como agente antiplaquetario para prevenir coágulos sanguíneos	(Pancioli, 2015)

Por otro lado, la crotamina es una α -neurotoxina caracterizada por primera vez del veneno de la víbora de cascabel tropical brasileña *Crotalus durissus terrificus*. La crotamina se ha reportado como una molécula de alto interés biotecnológico, como se muestra en la figura 10, debido a su capacidades antibacterianas, antifúngicas, antiparasitarias y antitumorales. El perfil catiónico de esta α -neurotoxina, su tamaño y masa molecular pequeños, así como alto contenido de aminoácidos básicos (Arg y Lys) le proporcionan características de péptido penetrador de células (CPP por sus siglas en inglés). Específicamente, se ha reportado que la crotamina tiene una internalización selectiva a células en altas tasas de proliferación (fases G₁/S), sin afectar de manera significativa a células normales no transformadas, convirtiéndola en una molécula con gran interés farmacéutico (Marinovic et al., 2017).

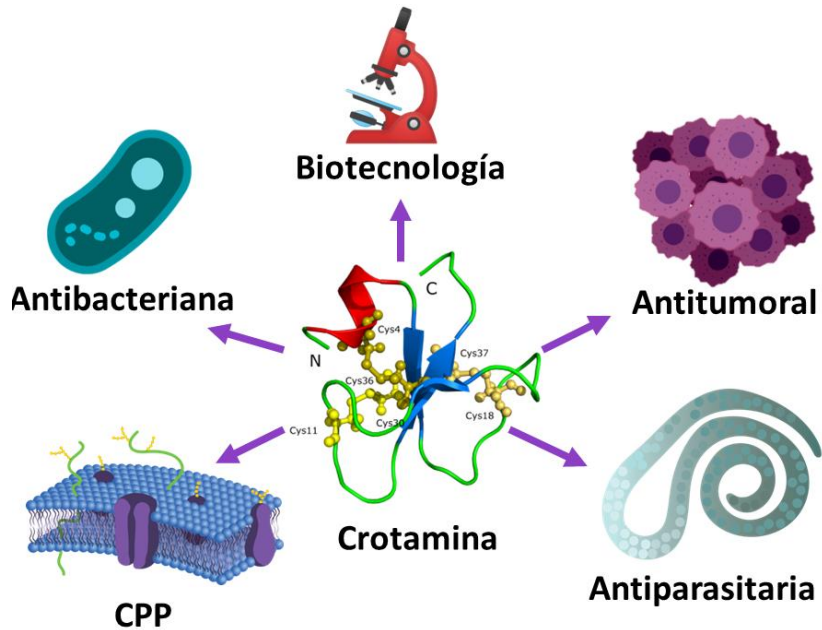


Figura 10. Estructura 3D de crotamina y sus posibles usos en Biología y Farmacéutica.

En ese sentido, nuestro grupo de investigación ha propuesto desarrollar NPs de PLGA para encapsular veneno de la víbora de cascabel cola negra norteña (*Crotalus molossus*) y crotamina proveniente de la víbora de cascabel del pacífico (*Crotalus culminatus*), cuyo veneno se ha caracterizado y cuenta con la presencia de familias de toxinas con actividad antineoplásica, así como la presencia de crotamina, respectivamente (Durban et al., 2017). La encapsulación en nanopartículas de PLGA de las toxinas presentes en el veneno de esta serpiente, así como de la fracción de crotamina aislada, permitirá obtener un método de transporte pasivo hacia células tumorales, el cual protegerá de la transformación propia del metabolismo a las moléculas de interés y permitirá una liberación prolongada.

CAPÍTULO 3

3.1 DESARROLLO EXPERIMENTAL

3.1.1 Materiales

PLGA (Resomer® RG 503 H, terminación ácida, 50:50, Mw: 24–38 kDa), diclorometano (DCM) (ACS reactivo, $\geq 99.5\%$) y alcohol polivinílico (PVA) (Miowiol® 4-88, Mw: ~ 31 kDa) fueron comprados de la empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Kit de ensayo de proteína BCA Pierce™ fue comprado de Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). Todos los experimentos fueron realizados utilizando agua ultrapura Tipo 2 ($0.18\ \mu\text{S}/\text{cm}$).

3.1.2 Métodos

3.1.2.1 Obtención de Veneno de Serpientes

El veneno de la víbora de cascabel cola negra (*Crotalus molossus*) se obtuvo mediante donación por parte del Museo Itinerante de Vida Animal (permisos de SAGARHPA 12/09-00462/15 y DGFF/12/09-1106/18). Brevemente, se permitió que 3 ejemplares adultos de la especie mencionada mordieran un contenedor de plástico estéril cubierto de Parafilm, para asemejar tejido. Posteriormente, el veneno fue centrifugado a 5000 rpm durante 10 minutos y se obtuvo el sobrenadante. Finalmente, el veneno fue congelado a $-80\ ^\circ\text{C}$ durante 24 horas y después liofilizado y guardado a $-20\ ^\circ\text{C}$ hasta su uso.

3.1.2.2 Síntesis, Eficiencia de Encapsulación y Carga de Nanopartículas

Se obtuvieron nanopartículas de PLGA que contenían veneno de víbora de cascabel cola negra (*C. molossus*) mediante un método de doble emulsión- evaporación de solvente ($W_1/O/W_2$), similar al reportado por Liao et al. (Liao et al., 2020), con ligeras modificaciones. En resumen, se disolvieron 60 mg de PLGA en

2.5 mL de DCM. Una vez que se disolvieron completamente, se añadieron 200 μ L de veneno [25 mg/mL H₂O] a la fase orgánica y se emulsionaron con un sonificador de sonda ultrasónica (sonificadores QSonica, Newton, CT, USA.) durante 30 s (pulsos de 1 s encendido-apagado) al 25 % de amplitud para obtener una solución W₁/O. Luego, se añadió la fase W₁/O a 40 mL de PVA al 2.5 % y se emulsionó durante 30 s (pulsos de 1 s encendido-apagado) al 30 % de amplitud para obtener una solución W₁/O/W₂. Posteriormente, la solución se dejó bajo agitación magnética durante 3 h a 400 rpm para evaporar el DCM y obtener las nanopartículas de PLGA cargadas con veneno (PLGA-Veneno). Las NPs de PLGA sin veneno (control) se sintetizaron mediante el mismo procedimiento, pero añadiendo 200 μ L de agua de milli-Q en lugar de las toxinas. El exceso de PVA se eliminó mediante la centrifugación de las NPs a 8000 rpm durante 20 minutos a 4 °C, esto se realizó tres veces. Finalmente, se liofilizaron y se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

La cuantificación de la eficiencia de encapsulación (EE%) y capacidad de carga (LC%) se determinaron mediante ensayos de BCA al cuantificar la proteína total en el sobrenadante de los lavados de nanopartículas, como lo indica el fabricante. Se usaron las ecuaciones (1) y (2) para determinar la EE% y LC%, respectivamente.

$$EE\% = \frac{\text{Total de proteína} - \text{Proteína de sobrenadante}}{\text{Total de proteína}} \times 100 \quad (1)$$

$$LC\% = \frac{\text{Proteína encapsulada}}{\text{Peso de Nanopartícula liofilizada}} \times 100 \quad (2)$$

3.1.3 Caracterización

3.1.3.1 Identificación de Proteínas de Veneno de *C. molossus*

El veneno de serpiente se solubilizó en buffer RH (Urea 8 M, 2 % de CHAPS) y estimó la cantidad de proteínas empleando el método de Bradford. Las proteínas del veneno (100 μ g) se mezclaron con 20 mM DTT y se ajustó a un volumen final de 500 μ L con bicarbonato de amonio 50 mM, pH 8.0 y se incubó 37 °C en agitación

constante a 500 rpm por 1 h. Posteriormente, se añadieron 100 μ L de iodoacetamida 300 mM y se incubó en la oscuridad a temperatura ambiente por 30 min. Posteriormente se añadieron 750 μ L de bicarbonato de amonio 50 mM, pH 8.0 y la digestión de las proteínas se realizó adicionando 3.6 μ g de tripsina grado espectrometría de masas a cada muestra. Las muestras se incubaron a 37 °C por 20 h.

Después de la digestión, las muestras se secaron utilizando un evaporador (Vacufuge plus, Eppendorf). Una vez secas, se eliminó el detergente. Para esto, las muestras se ajustaron a un volumen final de 110 μ L con agua (grado Milli-Q) y se añadieron 110 μ L de acetato de etilo. Posteriormente se agregó 1 μ L de ácido trifluoroacético (TFA) y se homogenizó mediante vórtex por 5 min, después las muestras se centrifugaron a 13,000 rpm a temperatura ambiente por 10 min. Esta etapa de lavado permitió separar la fase orgánica de la fase acuosa. Posteriormente se eliminó la fase orgánica (fase superior) sin romper el velo formado entre ambas fases y nuevamente se agregó un volumen de acetato de etilo y se homogenizó mediante vórtex por 5 min, después las muestras se centrifugaron a 13,000 rpm a temperatura ambiente por 10 min y se eliminó la fase orgánica. Finalmente, las muestras se secaron empleando un evaporador (Vacufuge plus, Eppendorf).

Posteriormente las muestras se desalaron utilizando cromatografía de fase reversa mediante extracción en fase sólida (C18, SepPack, Waters). Para ello, la muestra suspendió en 1 mL de ácido trifluoroacético al 0.1% y se homogenizó mediante vórtex por 5 min. Después, se acondicionó la columna C18 con 2 mL de acetonitrilo al 100% y al 50%. Enseguida, la columna se equilibró con 2 mL de ácido trifluoroacético al 0.1% y una vez desechado se cargó 1 mL de la muestra en la columna. Después se lavó la columna con 2 mL de ácido trifluoroacético al 0.1% y se desechó. Finalmente, se eluyeron los péptidos de la columna agregando 1.5 mL de acetonitrilo al 50% con ácido trifluoroacético al 0.1% y se recolectó la muestra en un microtubo Eppendorf. Los péptidos desalados se secaron empleando un evaporador (Vacufuge plus, Eppendorf). Posteriormente los péptidos se fraccionaron mediante fase reversa a pH alto (8 fracciones) empleando un Kit de

fraccionamiento de péptidos mediante fase reversa a pH alto (Pierce, San José, CA, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las fracciones obtenidas se redijeron a 4 y cada fracción se analizó por espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) de la siguiente manera: se suspendieron en una solución de acetonitrilo al 10% con 0.1% de ácido fórmico y se separaron con en cromatógrafo de líquidos ultra desempeño (Dionex Ultimate 3000, RSLCnano UHPLC system, Thermo Fisher Scientific, San José CA, USA) acoplado a un espectrómetro de masas de alta resolución (Q-Exactive Plus high resolution mass spectrometer, Thermo Fisher Scientific). Los péptidos se atraparon en una precolumna (C18 PepMap 100, 5 μ m, 100 Å, 300 μ m diámetro interno x 5 mm) y posteriormente se separaron mediante un gradiente de elución de 250 min en una columna capilar a un flujo de 250 nL/min (EASY Spray Column, PepMap RSLC, C18, 3 μ m, 100 Å, 75 μ m x 150 mm). Las fases móviles fueron las siguientes: A, 0.1% ácido fórmico en agua y B, 90:10 (v/v) acetonitrilo: agua con 0.1% de ácido fórmico. El espectrómetro de masas se operó en modo positivo mediante un programa de adquisición dependiente de datos. En el modo MS se filtraron los iones con un rango de 300-2000 m/z. Los 10 iones más intensos de cada escaneo en modo MS con estados de carga de 2 y superiores se aislaron con una ventana de aislamiento de 1 m/z en el cuadrupolo y se fragmentaron con una energía normalizada de colisión de 27%. La masa/carga de los iones precursores se midió a una resolución de 70000 (a 200 m/z) mientras que la de los fragmentos se midió a una resolución de 17500.

La identificación de las proteínas se realizó empleando el software Max Quant (v 2.0.3) y la base de datos de proteínas del infraorden Serpentes de UniProt (333,368 secuencias, junio 2023). Usando los siguientes parámetros: tripsina como proteasa específica, permitiendo la omisión de un sitio de corte, la tolerancia de masa para los iones precursores y para sus iones fragmento fue de 20 ppm. Se consideró la carbamidometilación de las cisteínas como modificación fija y oxidación de las metioninas y la acetilación del N-terminal de las proteínas como modificaciones variables. Se consideraron como identificaciones positivas aquellas en las que se obtuvo una tasa de falsos positivos (False Discovery Rate) menor de 0.01.

La abundancia relativa de cada proteína se estimó con base en porcentaje de abundancia de los iones correspondientes a cada proteína en relación con la abundancia del total de iones con identificación positiva.

3.1.3.2 Electroforesis SDS-PAGE de Veneno

Las proteínas del veneno de *C. molossus* fueron analizadas en condiciones reductoras y desnaturalizantes (SDS-PAGE) en un gel de poliacrilamida al 15 %, de acuerdo a Laemmli (Laemmli, 1970). El análisis PAGE se realizó cargando 15 µg de muestras y posteriormente fueron teñidos con azul de Coomassie. La masa molecular de las proteínas fue estimada comparándolas con marcadores de masa molecular de amplio espectro (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

3.1.3.3 Actividad Hemolítica Directa

Se evaluó la capacidad del veneno libre y encapsulado de *C. molossus* de inducir hemólisis siguiendo el protocolo que se describe a continuación. Brevemente, se obtuvieron muestras de sangre y fueron inmediatamente transferidas a tubos limpios (anticoagulante EDTA BD Vacutainer). La sangre fue disuelta en solución salina a una relación de 5:1000 µL, respectivamente. Después, concentraciones de 1.95 – 125 µg/mL de veneno de *C. molossus* fueron evaluadas, incubándose a 37 °C por 24 h. Finalmente, las muestras fueron centrifugadas a 5000 rpm x 1 min, se determinó la cantidad de hemólisis al medir la absorbancia de la hemoglobina libre a 540 nm usando un espectrofotómetro (Thermo Scientific Multiskan GO). Sangre disuelta en agua y en solución salina a la misma concentración fueron utilizadas como controles positivo y negativo, respectivamente (Jimenez-Canale et al., 2022A).

3.1.3.4 Evaluación de Actividad Citotóxica

Se evaluó la actividad citotóxica del veneno de *C. molossus*, crotamina y NPs de PLGA-Veneno y PLGA-Crotamina, cuantificando la viabilidad celular de la línea

de carcinoma mamario ductal infiltrante T-47D, mediante ensayos de MTT, similar a lo reportado previamente por nuestro equipo. Las células cancerígenas fueron plaqueadas en microplacas estériles de 96 pozos, a una densidad de 20,000 células por 100 μL de medio DMEM con 5 % de suero fetal bovino (SFB). Las células fueron incubadas durante 24 h a 37 °C y 5 % CO_2 . Después el medio fue cambiado por uno nuevo conteniendo 0.78 – 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de veneno de *C. molossus*, crotamina, NPs PLGA-Veneno y PLGA-Crotamina y se dejó incubando a las mismas condiciones durante 4 h. Se utilizó DMSO (10 %) y medio DMEM como control positivo y negativo, respectivamente. Finalmente, se removió el medio y se agregaron 100 μL de dimetilsulfóxido (DMSO), incubándose durante 10 minutos a 37° C y se midió la absorbancia a 540 nm (Jimenez-Canale et al., 2022A).

3.1.3.5 Análisis de Tamaño y Estabilidad Coloidal de Nanopartículas

El diámetro hidrodinámico (D_H) y potencial Z de las nanopartículas fue analizado mediante la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS) a un ángulo de dispersión de 90 ° utilizando el equipo Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments Ltd, Malvern, UK) con un láser de anemometría Doppler. Las muestras se diluyeron a una relación 100:1000 μL , todas las muestras se analizaron por triplicado.

3.1.3.6 Análisis de Composición Molecular de Nanopartículas

Se analizó la composición molecular de muestras liofilizadas de veneno de *C. molossus*, crotamina y las NPs de PLGA, PLGA-Veneno y PLGA-Crotamina, obtenidas mediante la técnica de espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR) (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) en modo ATR, a una resolución de 4 cm^{-1} en un rango de 500 a 4000 cm^{-1} .

3.1.3.7 Topografía de Nanopartículas

La morfología de las NPs de PLGA-Veneno fue caracterizada por microscopía de fuerza atómica (AFM) (Alpha 300RA, WiTec, Germany). Las

imágenes de AFM fueron reconstruidas en modo no contacto utilizando nanosensores con una constante de resorte de 42 N/m y una frecuencia resonante de 285 kHz. Los análisis de la forma de NPs se realizaron en áreas de 20 x 20 μm que finalmente fueron analizadas en el software gratuito para análisis de datos SPM Gwyddion.

3.1.3.8 Cinética de Liberación de Nanopartículas

Las proteínas liberadas de la matriz de las NPs de PLGA-Veneno fueron cuantificadas utilizando el kit de cuantificación de proteínas, previamente mencionado en la sección 3.1.2.2. Brevemente, 15 mg de nanopartículas se solubilizaron en 10 mL de PBS 1X (pH: 7.4 – 7.7) e incubó a 37 °C durante 15 días. Las muestras se obtuvieron al centrifugar la solución de NPs a 5000 rpm durante 5 min, obteniéndose 1 mL del sobrenadante, y posteriormente agregando 1 mL de PBS 1X a la solución, a fin de no afectar las futuras mediciones por cambios de concentración. La alícuota de 1 mL se mantuvo a -20 °C hasta su uso. Se obtuvieron muestras a distintos tiempos de 0 a 75 h.

CAPÍTULO 4

4.1 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.1 Caracterización del Veneno de *Crotalus molossus*

Los venenos de serpientes de la familia Viperidae se han reconocido como altamente variables, en ocasiones presentándose variación por sexo, dieta, ubicación geográfica y ontogenética (Borja et al., 2018). Lo anterior representa una gran área de oportunidad, ya que los avances en el desarrollo farmacológico con base en toxinas de serpientes dependen en gran manera del aislamiento y caracterización de estas. Por ello por lo que se consideran de gran importancia los trabajos relacionados con el potencial uso de venenos o extractos de origen biológico.

4.1.1.1 Caracterización Electroforética de Venenos

El veneno de 3 ejemplares machos adultos de la serpiente de cascabel cola negra nortea (*Crotalus molossus*) (B) y el veneno de ejemplares adultos de la serpiente de cascabel del pacífico (*C. culminatus*) (D) y (E) fueron evaluados mediante la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida, en condiciones reductoras y desnaturizantes (SDS-PAGE), figura 11. Lo anterior con la finalidad de realizar una separación electroforética de los péptidos y proteínas presentes en el veneno de las serpientes, y asociar con las familias de toxinas de acuerdo a información previamente reportada por nuestro equipo de investigación (Jimenez-Canale et al., 2022A).

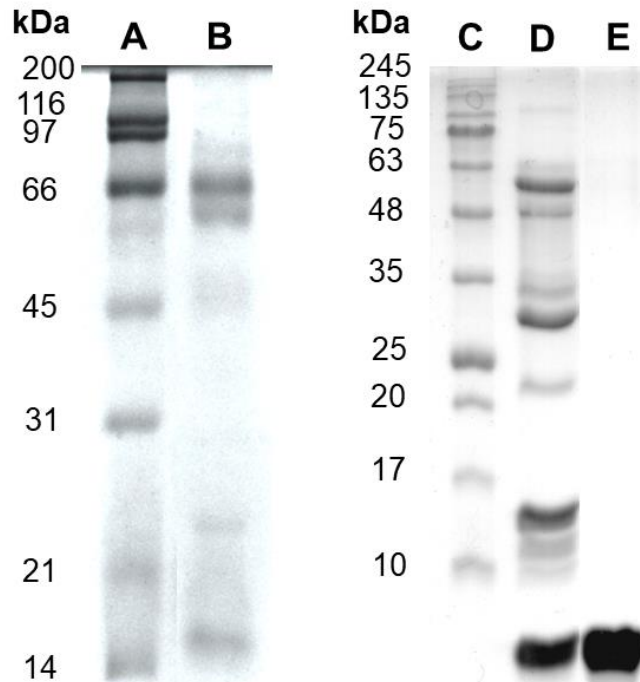


Figura 11. Geles de SDS-PAGE 15 % con (A) y (C) marcadores de amplio espectro, (B) veneno de *C. molossus*, (D) veneno de *C. culminatus* y (E) crotamina aislada de veneno de *C. culminatus*.

Los carriles A y C representan marcadores moleculares de amplio espectro, utilizados como referencias de masa molecular de acuerdo con sus bandas correspondientes. Por otro lado, el patrón de migración del veneno de *C. molossus* se presenta en el carril B, en el cual se observa gran diversidad de bandas asociadas al intervalo de 100 – 10 kDa, presentándose dos prominentes en ~70 y 25 kDa, y una tercera banda en el intervalo de 21 – 14 kDa.

En la figura 11 se observan 3 bandas notorias las cuales Borja y colaboradores asociaron a metaloproteasas P-III (P-III SVMPs), metaloproteasas P-II (P-II SVMPs) y miotoxinas similares a crotamina (CRO-MYO) en el intervalo de masas de 75 – 50, 25 – 20 y ~10 kDa, respectivamente (Borja et al., 2018). Su trabajo tiene un gran peso con respecto a lo evaluado por nuestro equipo, debido a que *C. nigrescens* fue recientemente elevada a su propia especie, antes considerada como una subespecie de *C. molossus*, con lo que se espera poca

variación venómica entre dichas especies, y, considerando una clínica similar derivada de la mordedura de ambas especies.

Por otro lado, nuestro equipo de investigación previamente identificó las toxinas de veneno de otro ejemplar macho adulto de *C. molossus* proveniente de Hermosillo, Sonora, México. En dicho trabajo, se observaron las mismas bandas presentes en la figura 11, en el rango de 75 – 70, 25 – 20 y 15 – 10 kDa. Además, dichas bandas del gel se procesaron mediante digestión enzimática y, con el apoyo de la técnica de cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC/MS-MS), se determinó que las toxinas asociadas a las bandas electroforéticas eran una P-III SVMP (VAP2A, 68 kDa), LAAO (Apoxina I, 56 kDa), P-I SVMP (Ruberlycina, 23 kDa) y PLA₂ (Fosfolipasa A2_2, 16 kDa) (Jimenez-Canale et al., 2022A). En la figura 12 se muestra de manera gráfica la abundancia relativa de familias de toxinas presentes en el veneno de *C. molossus*.

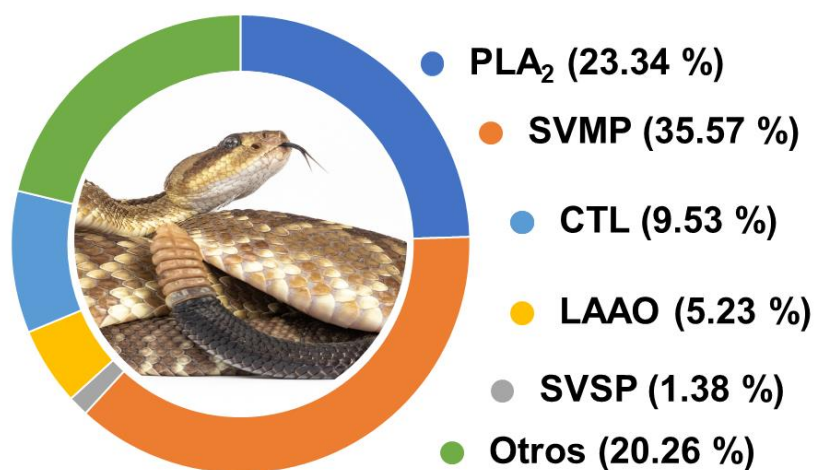


Figura 12. Abundancia relativa de familias de toxinas en el veneno de *C. molossus*.

La técnica de SDS-PAGE nos permite inferir y determinar las principales toxinas presentes en el veneno extraído de los ejemplares de *C. molossus*, así como la muestra correspondiente a crotamina incluida en el presente trabajo.

Adicionalmente en el presente trabajo se evaluó una fracción aislada del veneno de *C. culminatus*, que corresponde a la miotoxina identificada como crotamina. En el carril (D) se observa el patrón de migración del veneno de *C.*

culminatus y en el carril (E) la fracción de la crotamina aislada. Cabe mencionar que la fracción de crotamina fue donada por el equipo de investigación del Dr. Alejandro Alagón Cano y el Dr. Edgar Neri Castro, del Instituto de Biotecnología de la UNAM, Cuernavaca, Morelos, México

4.1.1.2 Actividad Hemolítica de Veneno de *C. molossus* y Crotamina

Los glóbulos rojos son las células más abundantes de nuestro cuerpo, por lo que es imprescindible evaluar la capacidad de inducir hemólisis tanto del veneno de *C. molossus*, así como de la crotamina. En ese sentido, los venenos de serpientes se pueden clasificar de manera general en tipo I/B (hemorrágico/proteolítico) y tipo II/A (neurotóxico) (Dobson et al., 2018). En ese sentido, el contenido venómico de ejemplares adultos de *C. molossus* se ha catalogado como veneno de tipo I/B, debido a toxinas como P-III y P-I SVMPs, así como LAAO, las cuales se ha reportado pueden generar efectos hemotóxicos como hemorragias locales o sistémicas, así como coagulopatías. Por otro lado, la crotamina es una neurotoxina de la familia de defensinas (DEF), la cual se ha reportado que no presenta actividad hemolítica (AH) (Marinovic et al., 2017; Oguiura et al., 2011). En la figura 13 se muestran los resultados de los estudios de AH evaluados en un intervalo de concentraciones de 125 – 1.95 µg/mL de veneno y crotamina. Estos resultados indican que, a las concentraciones evaluadas, tanto el veneno de *C. molossus* como la crotamina, no inducen hemólisis de los glóbulos rojos.

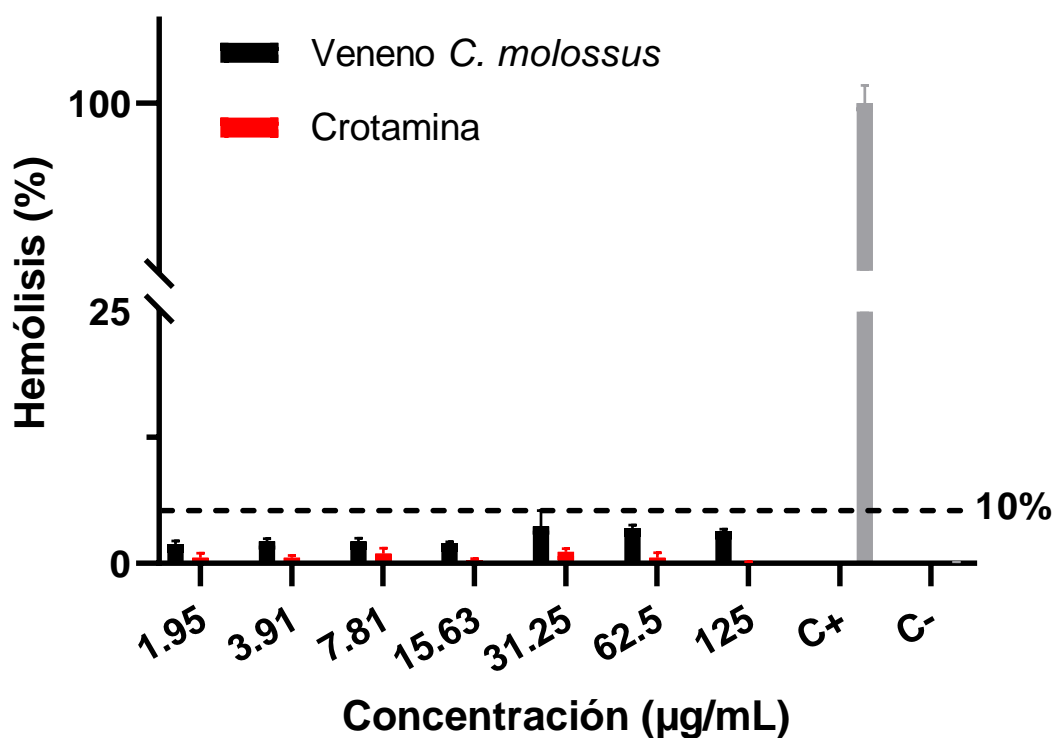


Figura 13. Actividad hemolítica directa de veneno de *C. molossus* y crotamina. Datos son promedios, \pm para desviación estándar. C+ es H₂O y C- es solución salina.

Nuestro equipo de investigación previamente reportó que el veneno de *C. molossus* no presentó AH directa >10 % a concentraciones menores de 100 µg/mL (Jimenez-Canale et al., 2022A). Adicionalmente, Gorai y Sivaraman reportaron que se necesita de una concentración de ~700 µg/mL de veneno crudo de la cobra india (*Naja naja*) para lograr un 70 % de hemólisis (Gorai & Sivaraman, 2017) en un esquema similar al que se utilizó en el presente trabajo. Por otro lado, Macías Rodríguez y colaboradores evaluaron el efecto hemolítico del veneno de ciertas especies de serpientes de cascabel, incluida *C. molossus*, en geles de agarosa con glóbulos rojos (AH indirecta). En su estudio, determinan que el veneno de *C. molossus* sí produce halos hemolíticos, lo cual toma sentido considerado la clínica reportada para las mordeduras de esta especie (Macias-Rodríguez et al., 2014).

La capacidad de uno u otro veneno de inducir hemólisis está altamente asociada a la acción de ciertas toxinas. Por ejemplo, algunas familias de toxinas

como SVMPs, SVSPs y PLA₂s se han reportado con actividad hemorrágica/proteolítica, esto se debe a su actividad sobre proteínas de anclaje y estructura en la matriz extracelular, interacciones con receptores de glóbulos rojos y lisis membranal, por mencionar algunos. Lo anterior ayuda a definir algunos de los mecanismos por los que el veneno de ciertas especies, como *C. molossus* suele derivar en clínica relacionada con hemotoxicidad (Akhtar et al., 2021; Gutiérrez & Rucavado, 2000).

Por otra parte, la crotamina se ha caracterizado como una neurotoxina sin AH, actuando principalmente en canales iónicos de potasio. Marinovic y colaboradores resumen en su trabajo las propiedades farmacológicas que presenta esta toxina, enfatizando un gran potencial en células con alta tasa de proliferación como líneas tumorales, sin afectar a células no transformadas (Marinovic et al., 2017). Es importante mencionar que las dosis de analitos son vitales para la determinación de una actividad tóxica o terapéutica. En el caso del veneno de *C. molossus*, concentraciones menores a los 100 µg/mL no producen más del 10 % de hemólisis, lo cual resulta bastante alentador para su posible desarrollo y uso como fármaco, ya que se trata de una concentración relativamente alta de veneno.

4.1.1.3 Actividad Citotóxica de Toxinas

La actividad citotóxica de venenos de serpientes, así como de toxinas aisladas y/o purificadas sobre líneas celulares tumorales ha sido de gran interés para el sector farmacológico (Mohamed Abd El-Aziz et al., 2019). Lo anterior se debe a la gran variabilidad de moléculas capaces de inducir apoptosis *in vitro* e *in vivo*, abriendo una gran área de investigación y desarrollo para medicamentos oncológicos. Calderon y colaboradores resumen en su trabajo los mecanismos por los que algunas familias de toxinas presentes en los venenos de serpientes presentan citotoxicidad, incluyendo algunas que se encuentran en los venenos de serpientes de cascabel, *Crotalus* spp. (Calderon et al., 2014). En ese sentido, es importante delimitar el tipo de células tumorales a estudiar debido a la gran variabilidad que presentan. Considerando lo anterior, histológicamente se ha

reportado que la mayoría de tipos de cáncer de mama son de carácter infiltrante (Bahena et al., 2007). Con base en lo anterior, la línea celular de carcinoma mamario ductal infiltrante se ha reportado como un excelente modelo para estudios *in vitro* debido a las características que presenta (retención de caracteres claves específicos de epitelio mamario, así como la sensibilidad de receptores de estrógeno α), ayudando a extrapolar los resultados hacia futuras pruebas *in vivo* (Yu et al., 2017). En la figura 14 se presenta la gráfica de viabilidad celular de la línea de carcinoma mamario ductal infiltrante, T-47D, en presencia de veneno de *C. molossus* como tratamiento por 24 h.

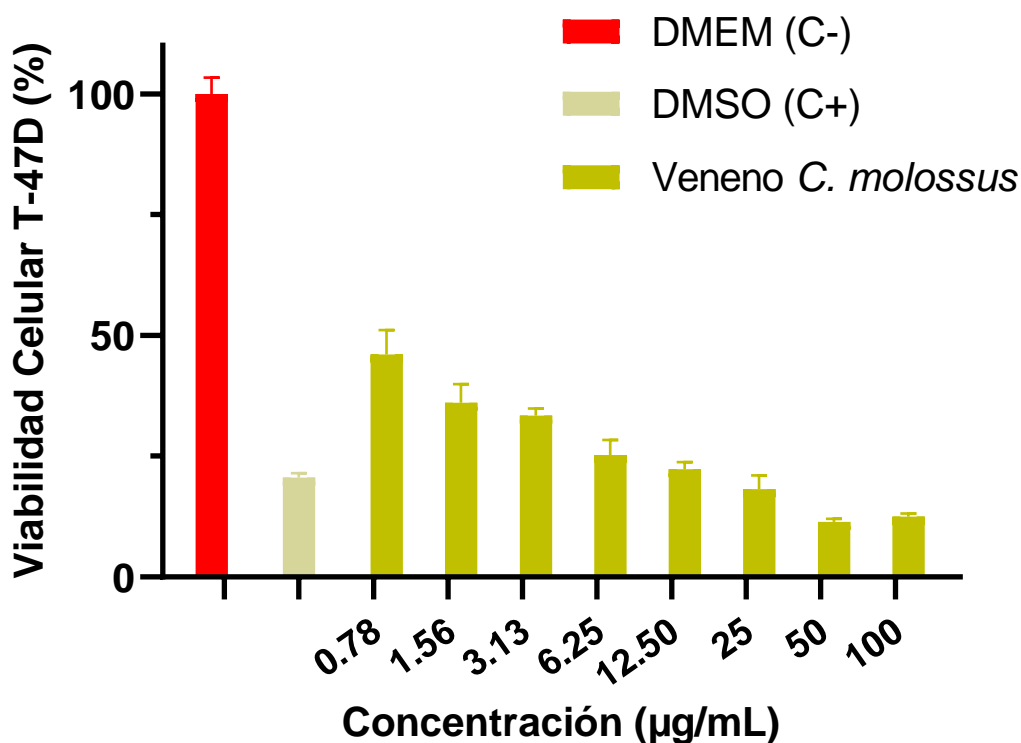


Figura 14. Actividad citotóxica del veneno de *C. molossus* sobre la línea celular T-47D.

De manera general, los mecanismos de actividad citotóxica sobre líneas tumorales del veneno y toxinas están relativamente poco estudiados. Calderon y colaboradores mencionan que el mecanismo de familias como las PLA₂s está ligado al metabolismo de lípidos membranales, mientras que de SVMPs y SVSPs se presume por cambios en el microambiente celular, por interacciones con componentes de la matriz extracelular (Calderon et al., 2014). En ese sentido,

realizamos un análisis para determinar la IC₅₀ del veneno como se muestra en la figura 15.

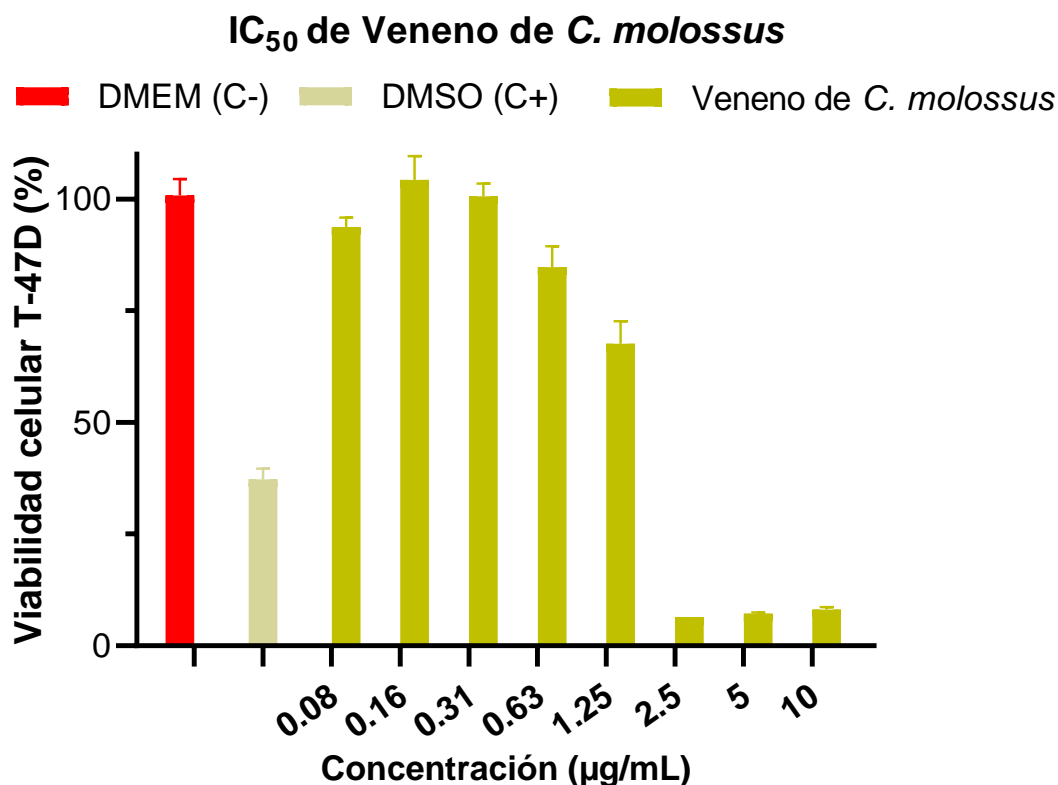


Figura 15. Determinación de IC₅₀ de veneno de *C. molossus* sobre la línea celular T-47D.

Se evaluaron y ajustaron los resultados de citotoxicidad del veneno de *C. molossus* a una curva de regresión no lineal, donde se determinó un valor de IC₅₀ de 1.46 µg/mL, con un intervalo de confianza del 95 % en el rango de 0.92 – 2.32 µg/mL. Anteriormente, nuestro equipo reportó una IC₅₀: 15.45 µg/mL para el veneno de un ejemplar adulto de *C. molossus* en células T-47D (Jimenez-Canale et al., 2022A). Las diferencias tan notorias entre el estudio anterior y actual realizado por nuestro equipo, aún y cuando el estudio electroforético presume la presencia de las mismas toxinas, puede deberse a diferentes motivos, siendo el más importante, la producción de toxinas de las serpientes durante su desarrollo, lo cual puede representar un reto en este tipo de estudios. Considerando que anteriormente solo se evaluó el veneno de un ejemplar, en esta ocasión se optó por una combinación de venenos extraídos de tres ejemplares adultos, representando de manera más

homogénea la composición de las especies en esta zona geográfica. Lo anterior puede explicar de alguna manera la discrepancia de nuestros resultados anteriores y actuales.

Los valores de IC₅₀ suelen variar si se comparan toxinas aisladas o veneno total. Por ejemplo, Li Lee y colaboradores reportaron una IC₅₀ para una LAAO proveniente del veneno de la cobra rey (*Ophiophagus hannah*) evaluada en dos líneas tumorales (MCF-7 y A5549) con valores de 0.04 y 0.05 µg/mL (Li Lee et al., 2014). Adicionalmente, Yalcin y colaboradores evaluaron el veneno de la víbora otomana (*Montivipera xanthina*) en las líneas tumorales LNCaP, MCF-7, HT-29 y Saos-2, reportando una IC₅₀ de 3.8 y 1.9 µg/mL (Yalcin et al., 2014). Song y colaboradores evaluaron el potencial del veneno de la víbora lebetina (*Macrovipera lebetina*) contra células de cáncer cervicouterino (PA-1 y SK-OV3) reportando una IC₅₀ de 4.5 y 6.5 µg/mL respectivamente (J. K. Song et al., 2012). Por otro lado, medicamentos como la doxorubicina (DOX) libre han reportado valores de IC₅₀ en intervalos de 1 – 2 µg/mL (Teran-Saavedra et al., 2020; Thao et al., 2017), por lo cual podemos asumir que la capacidad citotóxica del veneno de *C. molossus* reportada en este trabajo es favorable para continuar estudiándolo. Complementariamente, se evaluó la actividad citotóxica de la crotamina, la cual se puede observar en la figura 16.

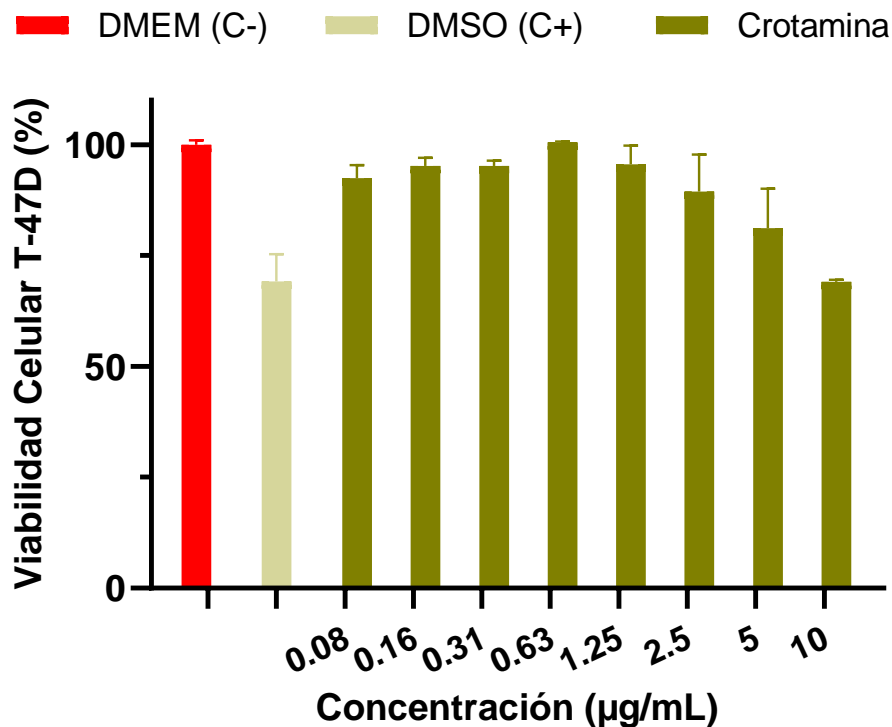


Figura 16. Actividad citotóxica de la crotonamina sobre la línea celular T-47D.

Como se describió anteriormente, la crotonamina es una neurotoxina altamente básica que se comporta como un péptido penetrador de células (CPP por sus siglas en inglés), la cual se ha reportado como citotóxica sobre varias líneas tumorales (Marinovic et al., 2017). Se ha reportado que el mecanismo por el cual se presenta dicha actividad citotóxica se debe a una interacción de la crotonamina con las vesículas de lisosomas, la cual consta de una ruptura de ellas, liberando sus contenidos en el citosol (Nascimento et al., 2012). En la figura 16 se observa la actividad citotóxica de la crotonamina sobre la línea tumoral T-47D, evaluada a concentraciones de 10 – 0.08 µg/mL. Se determinó la reducción de un 30 % de la viabilidad celular a la mayor concentración evaluada. Nascimento y colaboradores reportaron valores de la IC₅₀ de crotonamina purificada de *C. durissus terrificus* en la línea tumoral de melanoma de ratón B16F10 a las 4 y 24 h de tratamiento, resultando en un rango de valores de 24 – 48 y 2.4 – 4.8 µg/mL (Nascimento et al., 2012). Por otro lado, Hayashi y colaboradores reportaron una IC₅₀ de 24 µg/mL en una línea no tumoral de ovario, CHO-K1 (Hayashi et al., 2008). Por otro lado, Jang

y colaboradores, recientemente evaluaron la actividad citotóxica de crotamina recombinante en dos líneas celulares: BT474 (carcinoma mamario ductal invasivo) y MDA-MB-231 (carcinoma mamario triple negativo), determinando valores de IC₅₀ de 0.024 y 0.36 µg/mL (Jang et al., 2023). Evaluando nuestros resultados, esperaríamos una mayor actividad citotóxica de la crotamina sobre la línea T-47D, por lo cual será necesario eficientizar el proceso de aislamiento, almacenamiento y transporte, para evitar cualquier pérdida de la actividad de la toxina.

De esta manera concluimos la caracterización del veneno de *C. molossus* y crotamina, continuando con la de las NPs PLGA-Veneno y PLGA-Crotamina.

4.1.2 Síntesis y Caracterización de Nanopartículas de PLGA

La encapsulación de medicamentos o moléculas de interés anticancerígeno dentro de nanopartículas es una de las principales estrategias para: explotar el efecto EPR, protegerlos de una rápida degradación, o bien, dirigir de manera pasiva hacia sitios tumorales. Para ello se caracteriza el diámetro hidrodinámico (D_H) así como la estabilidad coloidal dada por el potencial Z (ζ) y el índice de polidispersidad (PDI). Estos valores nos brindan información valiosa con respecto al método de síntesis empleado, respondiendo preguntas básicas como ¿Podemos obtener nanopartículas con tamaños de interés? ¿Las NPs obtenidas presentan una población de tamaños óptima? ¿Las NPs obtenidas son estables en un sistema coloidal? Para contestar lo anterior, así como futuras preguntas con respecto a la biocompatibilidad de las NPs, así como su efecto citotóxico sobre una línea celular tumoral, se realizaron una serie de estudios, cuyos resultados se presentan continuación.

4.1.2.1 Tamaño y Potencial Z de Nanopartículas

En la tabla 4 se presentan los resultados de diferentes síntesis realizadas a fin de determinar el mejor sistema de encapsulación para proteínas provenientes

del veneno de *C. molossus*, así como de crotamina. Una de las principales ventajas de usar PLGA como material matriz es la relativa facilidad con la que se puede modificar el método de síntesis, para generar las características deseadas (Feczko et al., 2011). Modificando variables como el tipo de solvente orgánico, cantidad de proteína a encapsular, así como tiempos y amplitud de sonicación, se pueden obtener NPs con tamaños específicos y altas eficiencias de encapsulación.

Tabla 4. Resultados de síntesis de NPs de PLGA bajo distintas condiciones de solvente orgánico (DCM: diclorometano, ACN: acetonitrilo, TCM: triclorometano) y tipo de sonicación (C: sonicación continua, P: sonicación pulsada). nm: Nanómetros, PDI: Índice de polidispersidad, Potencial ζ : Carga superficial. Datos son promedios, \pm para desviación estándar de triplicado.

Solvente orgánico	Tamaño Diámetro Hidrodinámico (D_H) (nm)		PDI	Potencial ζ
DCM	Control (C)	227.3 \pm 5.21	0.06 \pm 0.03	-31.0 \pm 0.05
	Veneno (C)	251.9 \pm 4.87	0.10 \pm 0.01	-26.0 \pm 1.30
	Control (P)	286.9 \pm 3.49	0.11 \pm 0.02	-32.5 \pm 0.65
	Veneno (P)	310.2 \pm 5.36	0.15 \pm 0.02	-32.8 \pm 0.46
	Crotamina (P)	290.3 \pm 3.10	0.10 \pm 0.03	-27.5 \pm 0.49
ACN	Control (C)	286.5 \pm 15.99	0.09 \pm 0.02	-29.1 \pm 0.15
	Veneno (C)	224.8 \pm 3.85	0.04 \pm 0.02	-19.5 \pm 0.40
	Control (P)	272.8 \pm 5.20	0.08 \pm 0.04	-24.9 \pm 0.52
	Veneno (P)	220.6 \pm 0.64	0.03 \pm 0.02	-19.7 \pm 0.17
TCM	Control (C)	249.5 \pm 2.58	0.09 \pm 0.01	-14.6 \pm 0.46
	Veneno (C)	232.4 \pm 2.26	0.06 \pm 0.02	-17.6 \pm 1.21
	Control (P)	284.9 \pm 2.50	0.15 \pm 0.01	-17.7 \pm 0.25
	Veneno (P)	289.2 \pm 2.93	0.19 \pm 0.00	-20.8 \pm 0.41

Existen varias técnicas para generar NPs con PLGA, considerando si se desea encapsular compuestos hidrofóbicos, como ciertos medicamentos, compuestos fenólicos o poco polares, así como como compuestos hidrofílicos como péptidos y proteínas. Para lo último, la técnica de doble emulsión con evaporación

de solvente es generalmente la más utilizada (Iqbal et al., 2015). Dependiendo del tiempo de sonicación/homogenización, así como sus intervalos (emulsificación continua o pulsada (C) (P), respectivamente), se pueden generar partículas de mayor o menor tamaño. En la tabla 4 se resumen los resultados de síntesis obtenidas al evaluar condiciones de sonicación (continua y pulsada) y tipos de solventes orgánicos (DCM, ACN y TCM). De manera general, se observa un incremento de tamaño en las NPs obtenidas con sonicación pulsada (P) (~ 290 nm) con respecto a la sonicación continua (C) (~ 242 nm). Este efecto se debe a que la formación de las NPs se da una vez evaporado el solvente orgánico, por ello, si se presenta una síntesis con sonicación (C) se generan nanogotas más pequeñas que con sonicación (P) (Danhier et al., 2012).

Tabla 5. Resultados de eficiencias de encapsulación (EE%), capacidad de carga (LC%) y rendimientos de NPs. Datos son promedios, \pm para desviación estándar.

Solvente		EE%	LC%	Rendimiento (%)
DCM	Control (C)	-	-	-
	Veneno (C)	86.56 \pm 3.45	20.14 \pm 1.20	33.32
	Control (P)	-	-	-
	Veneno (P)	74.54 \pm 4.22	9.19 \pm 0.92	50.68
	Crotamina (P)	73.19 \pm 10.24	6.40 \pm 3.39	49.08
ACN	Control (C)	-	-	-
	Veneno (C)	42.30 \pm 5.02	12.56 \pm 1.79	31.78
	Control (P)	-	-	-
	Veneno (P)	14.49 \pm 9.02	4.39 \pm 1.18	30.70
TCM	Control (C)	-	-	-
	Veneno (C)	71.11 \pm 1.25	15.40 \pm 0.97	35.30
	Control (P)	-	-	-
	Veneno (P)	78.93 \pm 1.88	11.52 \pm 0.26	51.89

Feczko y colaboradores evaluaron los parámetros para optimizar la eficiencia de encapsulación (EE%). En su estudio reportan los diferentes mecanismos

fisicoquímicos que explicarían los resultados en la EE% y el tamaño de NP (Feczko et al., 2011). En ese sentido, ellos destacaron tres parámetros para poder obtener el mejor tamaño de NP con una alta EE%, la concentración de PLGA, el volumen de la fase acuosa y la concentración de proteína a encapsular. Por otro lado, Liao y colaboradores reportaron que para mantener óptima la actividad de enzimas encapsuladas en NPs de PLGA se recomienda realizar una sonicación pulsada (Liao et al., 2020). Lo anterior genera un tamaño de partícula relativamente mayor a las NPs obtenidas mediante un proceso de sonicación continua, como se observa comparando los D_{HS} de la tabla 4, las NPs (C) vs (P). Al evaluar la actividad citotóxica en líneas tumorales se optó por mantener la metodología de NPs pulsadas, a fin de evitar comprometer la bioactividad de las toxinas durante el proceso de síntesis. Adicionalmente, el DCM es probablemente el solvente orgánico más utilizado en este tipo de síntesis, por su excelente capacidad de solubilizar PLGA rápidamente y una enorme evidencia que respalda su uso para obtener grandes eficiencias de encapsulación (Feczko et al., 2011). En contraste con la utilización de ACN, como se observa en las tablas 4 y 5, se lograron obtener NPs relativamente más pequeñas que con DCM y TCM, sin embargo, con una EE% significativamente inferior a los otros solventes. Finalmente, se ha estudiado el potencial de TCM para este tipo de síntesis, principalmente para determinar la posible formación de productos tóxicos secundarios durante la sonicación (Liao et al., 2020). Liao y colaboradores previamente reportaron que, de manera general, las NPs obtenidas por medio de sonicación pulsada, permiten mantener mayor bioactividad que aquellas obtenidas por sonicación continua, aunque se presenta un ligero aumento del D_H , por ello, las NPs que a partir de aquí se presentan son aquellas obtenidas utilizando DCM como solvente orgánico y mediante sonicación pulsada.

4.1.2.2 Caracterización Electroforética de Veneno y Crotamina Extraídos de Nanopartículas de PLGA

Una vez que se determinaron las condiciones de síntesis de NPs de PLGA y la optimización de encapsulación del veneno de *C. molossus* y crotamina, se procedió a realizar la extracción de éstas de la matriz polimérica, y evaluar electroforéticamente las proteínas incorporadas, como se muestra en la figura 17.

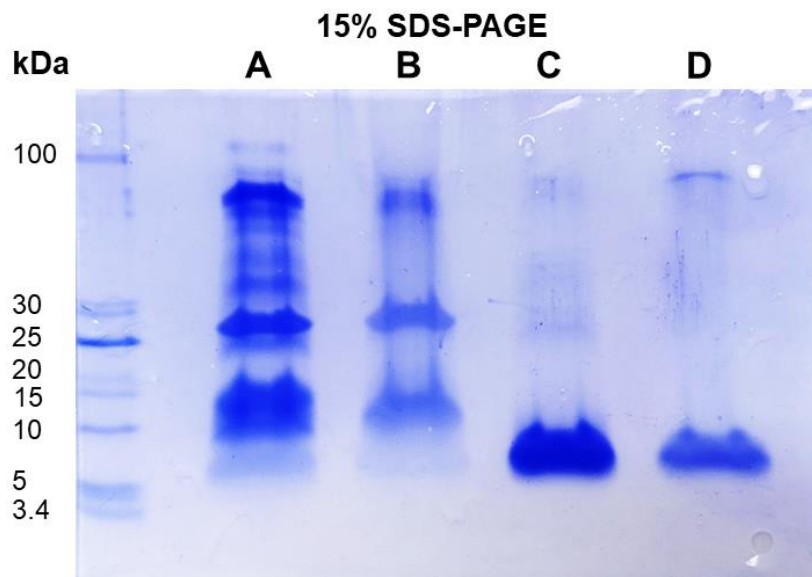


Figura 17. Geles de SDS-PAGE de (A) veneno de *C. molossus*, (B) veneno extraído de NPs de PLGA, (C) crotamina y (D) crotamina extraída de NPs de PLGA.

En el carril A se presenta el patrón de migración de veneno de *C. molossus*, se observa gran diversidad de bandas asociadas al intervalo de 100 – 10 kDa, presentándose dos prominentes en ~70 y 25 kDa, finalmente, se observa una tercera banda en el intervalo de 15 – 10 kDa. En el carril B se evaluó el perfil electroforético obtenido de la extracción de proteínas de nanopartículas de PLGA. Destacan las mismas 3 bandas previamente mencionadas, con base en ello, podemos inferir la encapsulación de esas proteínas dentro de la matriz polimérica. Por otro lado, en el carril C se agregaron 15 μ g de crotamina, obtenida del veneno de *C. culminatus*. De manera similar al carril B, en el carril D se observa la banda perteneciente a la crotamina extraída de las NPs de PLGA, infiriéndose de nuevo la encapsulación de esta toxina dentro de la matriz polimérica.

4.1.2.2 Forma de Nanopartículas por AFM

En la figura 18 se muestran imágenes topográficas de las NPs (A) de PLGA, (B) PLGA-Veneno y (C) PLGA-Crotamina, obtenidas por la técnica de AFM. De manera general se observan NPs de forma esferoidal y superficie lisa.

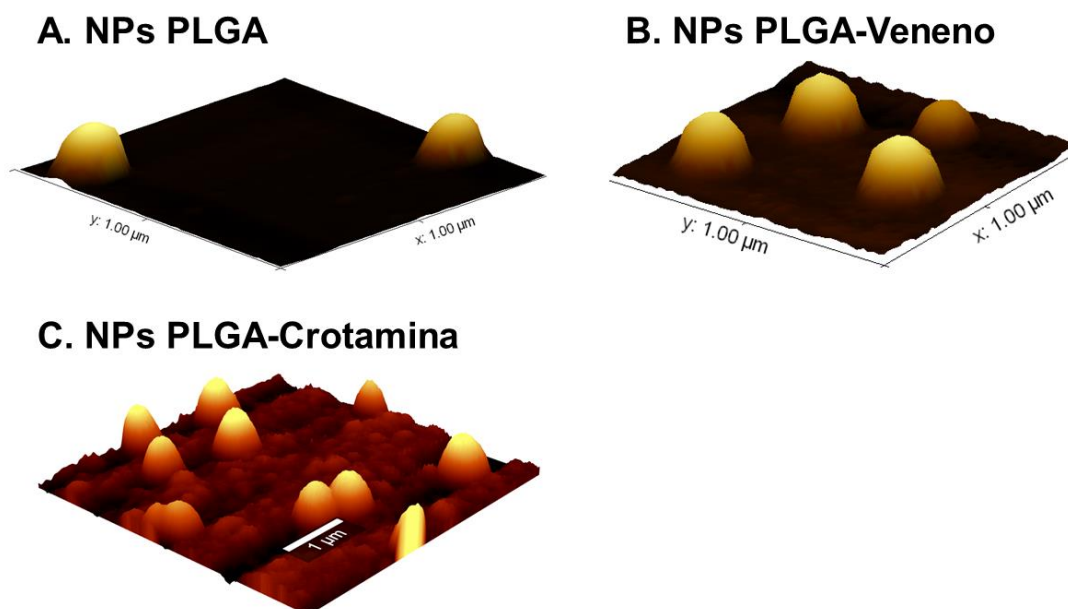


Figura 18. Imágenes de Nanopartículas (A) NPs PLGA, (B) PLGA-Veneno y (C) PLGA-Crotamina, reconstruidas en AFM en modo no-contacto.

Dependiendo del tipo de solvente orgánico empleado durante el proceso de síntesis, se pueden generar cambios en la superficie de NPs de PLGA (K. C. Song et al., 2006). En las imágenes de la figura 18 se observa claramente la morfología esferoide y apariencia lisa, características deseadas para optimizar el efecto EPR en células tumorales (Maeda, 2021). Adicionalmente, el tamaño observado en las figuras es relativamente similar con lo determinado mediante los análisis de DLS observados en la tabla 4. Es importante resaltar que los tamaños observados mediante este tipo de técnicas tienden a variar con respecto a lo evaluado en DLS, lo anterior debido a que en este caso las NPs se encuentran deshidratadas, lo cual tiende a reducir un poco su tamaño.

4.1.2.3 Estructura Molecular de Nanopartículas por FT-IR ATR

Continuando con la caracterización de las NPs de PLGA-Veneno, se realizaron análisis de estructura molecular mediante espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR) en modo de atenuación total reflejada (ATR) por sus siglas en inglés. En la figura 19 se observan los espectros obtenidos de NPs PLGA-Crotamina (verde), PLGA-Veneno (morado), PLGA (azul), crotamina (rojo) y veneno de *C. molossus* (negro).

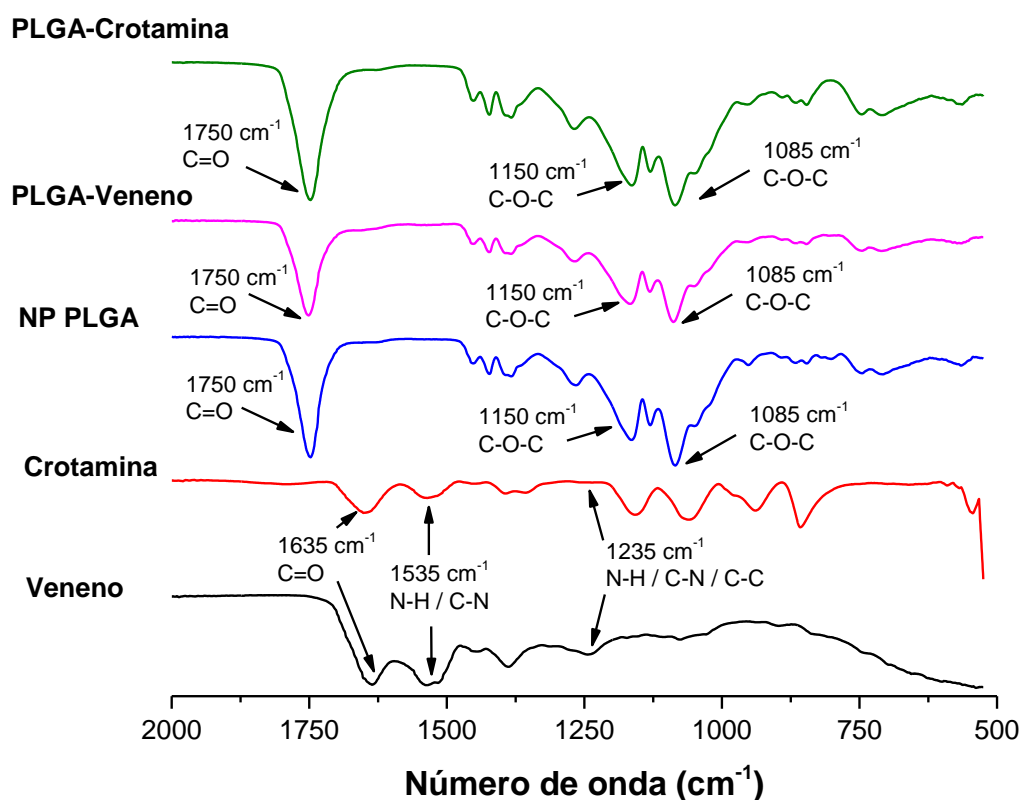


Figura 19. Análisis de FT-IR en modalidad ATR de Veneno de *C. molossus*, crotamina, NP PLGA, PLGA-Veneno y PLGA-Crotamina, en orden ascendente.

En la figura 19 se observan los espectros de las NPs de PLGA control, encapsulando veneno de *C. molossus* y crotamina, en todos los casos se puede observar picos característicos en un rango de 1085 – 1150 cm⁻¹ asociados a las vibraciones por estiramiento de enlaces éster (C-O-C). Generalmente estos picos se reportan en un intervalo de 1110 – 1150 cm⁻¹, probablemente se observen en

1085 cm^{-1} por efecto del proceso de síntesis de las NPs. Adicionalmente, en 1350 cm^{-1} se observan las series de picos asociados al dobléz de los enlaces C-H, en un intervalo de 1300 – 1400 cm^{-1} . Finalmente, el pico más notorio se observa en 1750 cm^{-1} , asociado al estiramiento del grupo éster (C=O) presente en el PLGA (Fu et al., 1999). Prácticamente todas las NPs con o sin proteínas, presentan el mismo espectro de FT-IR sin diferencias significativas o desplazamientos de picos.

Con respecto a los picos observados para la muestra de veneno de *C. molossus*, resaltan los grupos de la amida III en 1235 cm^{-1} , asociada a una posible combinación del dobléz de N-H y estiramiento de C-N y C-C, amida II en 1535 cm^{-1} , asociada al dobléz de N-H y estiramiento de C-N, y por último, la amida I en 1635 cm^{-1} la cual se asocia al estiramiento de C=O del enlace peptídico (Fu et al., 1999). En ese sentido, tal y como se observa en la figura 19, aparentemente no se distinguen los picos de las amidas en los espectros de las NPs. Lo anterior no es indicativo de una encapsulación efectiva o no de proteínas, sino un análisis cualitativo. Es probable que variando algunos ajustes en el análisis, como la utilización de pastillas de KBr, se pueda observar alguna diferencia con respecto a lo obtenido por ATR.

Nuestro equipo de investigación previamente había reportado el espectro de FT-IR en modo ATR del veneno de un ejemplar adulto de *C. molossus*, así como los espectros de NPs de quitosano encapsulándolo. De manera similar, tampoco se reportaron diferencias significativas entre los espectros de las NPs CS control y NPs CS-Veneno (Jimenez-Canale et al., 2022A). Lo anterior probablemente ocurra debido a una baja proporción de proteína con respecto a PLGA, así como a la capacidad de penetración de la modalidad ATR sobre las muestras.

4.1.2.4 Biocompatibilidad de Nanopartículas

Los eritrocitos o glóbulos rojos son las células más abundantes de nuestro cuerpo. Por ello es importante determinar la compatibilidad de materiales con fines farmacéuticos. En la figura 20 se observan los resultados de ensayos de actividad

hemolítica directa a 24 h en presencia de las NPs de PLGA, PLGA-Veneno y PLGA-Crotamina.

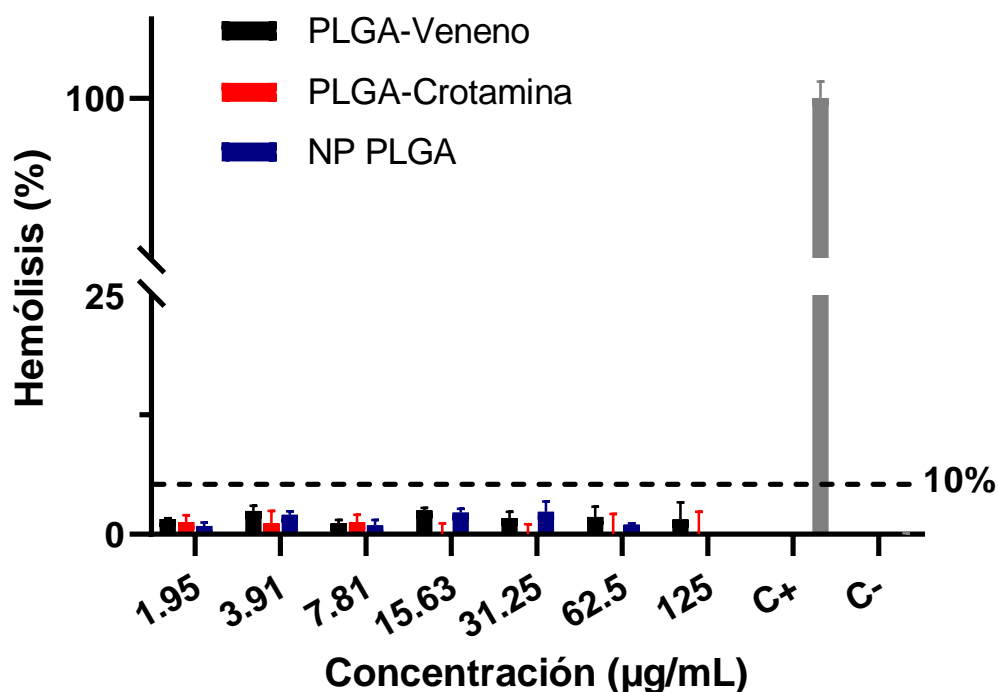


Figura 20. Actividad hemolítica directa de NPs de PLGA, PLGA-Veneno y PLGA-Crotamina.

Entre los principales síntomas derivados de la mordedura de *C. molossus* se encuentran aquellos referentes a patologías hemáticas, como hemorragia y coagulopatías. En este estudio se evaluaron concentraciones en intervalos de 125 – 1.95 µg/mL con respecto a la cantidad de veneno y crotamina para determinar la actividad hemolítica (AH) de las NPs. Se ha reportado que ensayos de AH *in vitro* que se encuentren con valores <10 %, no se consideran como formulaciones hemolíticas, por otro lado valores >25 %, se consideran como formulaciones con riesgo alto de presentar hemólisis (Amin & Dannenfelser, 2006). En todas las formulaciones, no se presentó AH >10 %, lo que va de acuerdo con los resultados anteriores presentados en la figura 13. Estudios anteriores realizados por nuestro equipo con veneno de *C. molossus* encapsulado en NPs de quitosano, tampoco se observó AH en las mismas concentraciones (Jimenez-Canale et al., 2022A).

4.1.2.5 Cinética de Liberación de Veneno y Crotamina

Una de las características más notorias de sistemas de micro/nanopartículas de PLGA es su capacidad de presentar perfiles de liberación controlada. Dependiendo de los parámetros utilizados durante el proceso de síntesis se puede modificar la cinética de liberación (Giteau et al., 2008). A continuación, la figura 21 muestra la liberación acumulativa del veneno y crotamina durante 75 h.

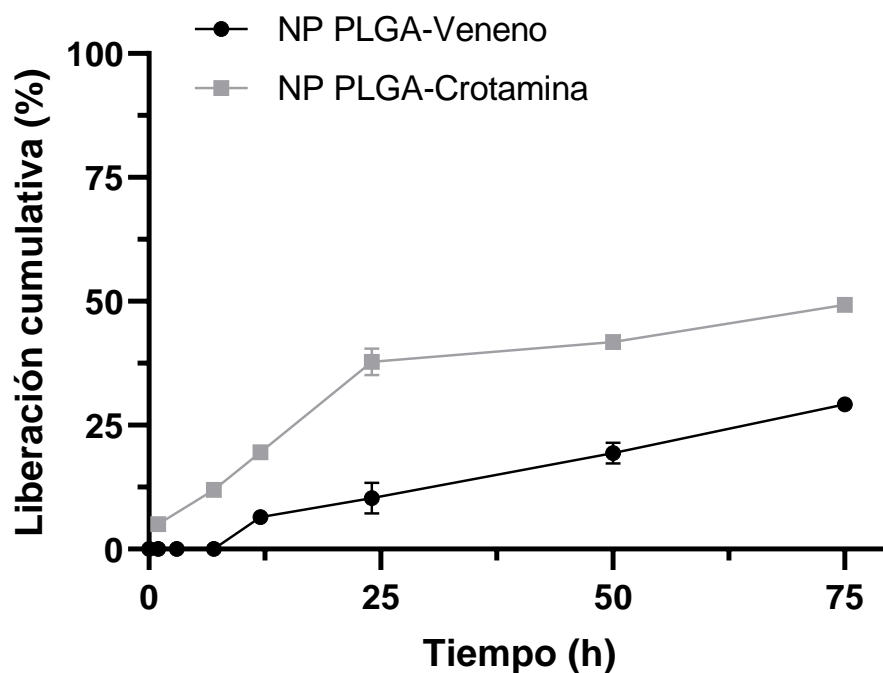


Figura 21. Determinación de porcentaje de liberación acumulativo de veneno de *C. molossus* en NPs PLGA-Veneno y crotamina en PLGA-Crotamina.

De acuerdo con lo observado en la figura 21, se determinó que el veneno de *C. molossus* es liberado aparentemente de manera controlada de la matriz de PLGA, cuantificándose un ~25 % a las 75 h. Por otro lado, se observó una clásica liberación bifásica por parte de la crotamina, cuantificándose un ~40 % durante las primeras 24 h, y cerca de un ~50 % a las 75 h. La degradación de micro/nanopartículas de PLGA depende de variables como el tipo de PLGA utilizado, el peso molecular del mismo, el grado de cristalinidad y su temperatura de transición vítrea (Makadia & Siegel, 2011). De manera general, se ha reportado,

tanto en sistemas *in vitro* como *in vivo*, que la degradación de la matriz de PLGA depende de un proceso colectivo de erosión del material y su superficie, así como difusión del contenido encapsulado, lo cual puede llegar a tomar hasta 60 días. Lo anterior entonces, hace que la liberación de fármaco o moléculas encapsuladas dentro de NPs de PLGA sea relativamente difícil de estudiar, considerando todas las variables que pueden afectar este proceso.

4.1.2.6 Actividad Citotóxica de Nanopartículas

Similar a lo observado en la figura 14, en la figura 22 se muestran y comparan los resultados de la actividad citotóxica de las NPs. Es importante mencionar que las concentraciones mostradas se encuentran con respecto a la cantidad de veneno y no de peso de NP, para el caso de NPs control, se utilizó la máxima concentración mostrada (100 µg/mL). En los análisis de actividad citotóxica por ensayo de MTT es muy importante considerar el tiempo empleado en el análisis, en este caso todos los análisis se realizaron considerando un tiempo de 24 h en presencia de los tratamientos.

La actividad citotóxica de las NPs PLGA-Veneno se evaluó en un rango de concentraciones de 100 – 0.78 µg/mL, con respecto a la cantidad de veneno. En el rango de concentraciones de 12.50 – 25 µg/mL se observa una viabilidad de ~50 – 25 %, indicando probablemente la concentración donde se encuentra la IC₅₀ de las NPs PLGA-Veneno. Asimismo, se observa que conforme disminuye la concentración es más notoria la diferencia de viabilidades comparando el veneno de *C. molossus* con las NPs PLGA-Veneno.

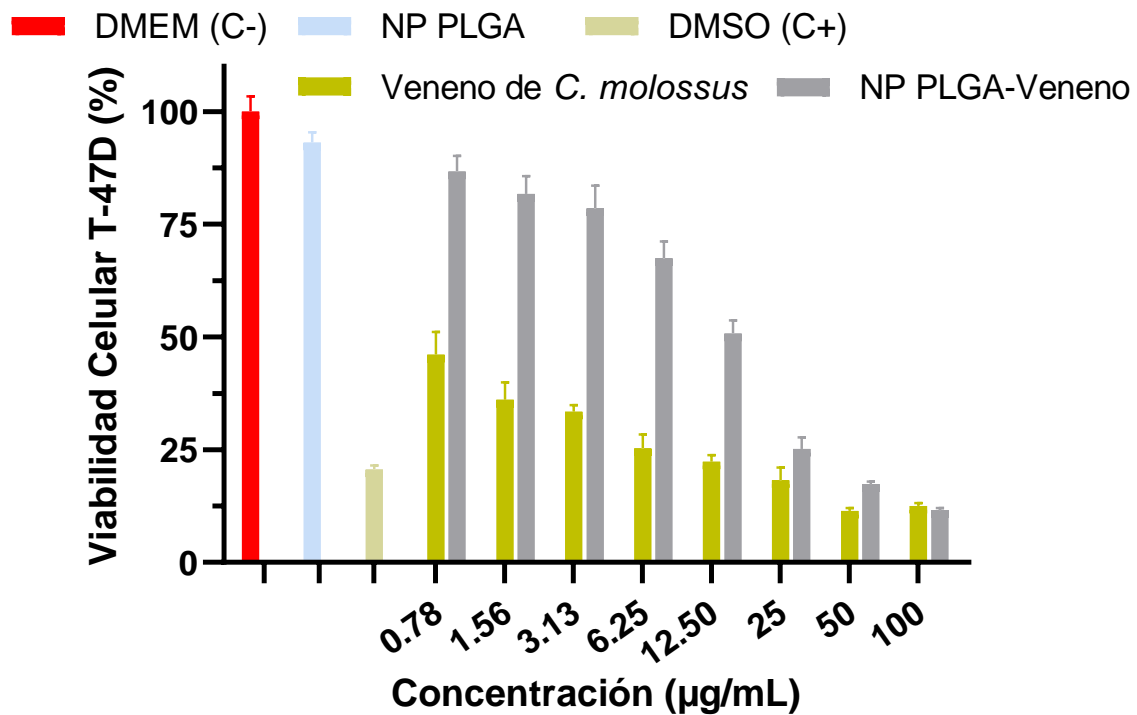


Figura 22. Actividad citotóxica de NPs PLGA-Veneno en células T-47D.

Calderon y colaboradores reportan que un gran número de familias de proteínas presentes en los venenos de especies pertenecientes a las familias Elapidae y Viperidae, siendo esta última donde se encuentran las serpientes de cascabel (*Crotalus* spp.), presentan actividad antitumoral *in vitro* y en algunos casos, *in vivo* (Calderon et al., 2014). Por otro lado, nuestro equipo recientemente publicó las propiedades farmacológicas que los componentes de venenos de cascabel en el estado Sonora, México pueden tener (Jimenez Canale et al., 2022B). De manera general, los componentes proteínicos mayoritarios en los venenos de serpientes de cascabel pertenecen a las familias primarias SVMPs, SVSPs y PLA₂s, y presentan mecanismos de citotoxicidad con sus respectivos mecanismos moleculares. De manera similar, algunas toxinas que pertenecen a familias secundarias y terciarias (LAAOs, CTLs, CRiSPs, DIS, DEF, NP, etc.) también se han reportado en el mismo contexto.

Previamente nuestro equipo de trabajo identificó las mismas bandas de proteínas que se observan en el gel de electroforesis SDS-PAGE (figura 11) como: VAP2A (P-III SVMP, 65 kDa), Apoxina I (LAAO, 56 kDa), Ruberlycina (P-I SVMP, 23 kDa) y

Fosfolipasa A2_2 (PLA₂, 16 kDa). Continuando con la evaluación de la actividad citotóxica, se determinó la IC₅₀ de las NPs PLGA-Veneno, como se muestra en la figura 23.

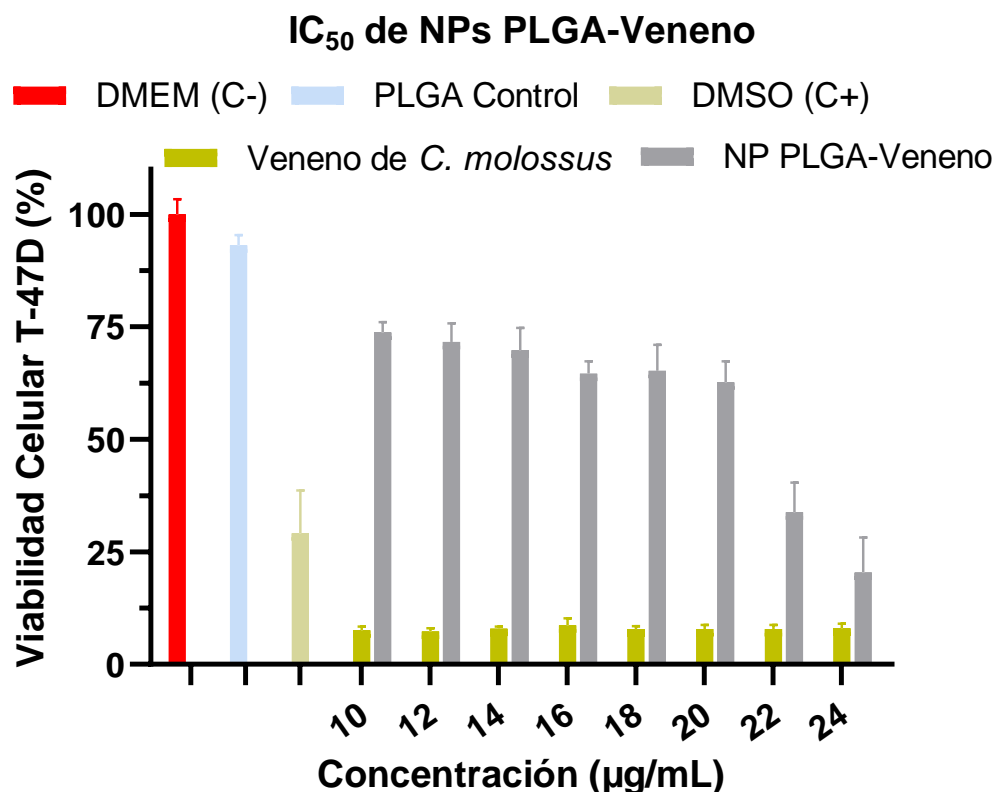


Figura 23. Evaluación de IC₅₀ de NP PLGA-Veneno.

Se determinó una IC₅₀ de las NPs PLGA-Veneno en 22.24 µg/mL, de acuerdo con los datos presentados en la figura 23. Las SVMs, también conocidas como zinc-metaloproteasas, son proteínas de masa molecular variable y multi dominio. Se asocia su acción al desarrollo de hemorragias y cambios en el proceso de coagulación. Se ha reportado que su principal mecanismo de acción es sobre componentes de la matriz extracelular (colágeno, laminina, fibronectina, entre otros). Dependiendo de su estructura se pueden clasificar en P-I, P-II, P-III y P-IV SVMs, las cuales hacen referencia a solo el dominio de SVM, SVM + DIS, SVM + DIS + dominio rico en cisteína y SVM heterodiméricas, respectivamente. Se ha reportado que algunos de sus mecanismos de acción anticancerígena se basan en la acción que presentan inhibiendo procesos adhesión celular (al actuar

sobre receptores de integrinas), reduciendo la probabilidad de iniciar un proceso metastásico (Calderon et al., 2014; Gutiérrez et al., 2016; Jimenez Canale et al., 2022B).

Por otro lado, las LAAOs se clasifican como glicoproteínas, de las que se ha reportado su presencia en organismos como bacterias, plantas y animales. Su mecanismo de acción es catalizar una deaminación oxidativa de L-aminoácidos, dando como productos ácidos alfa-keto, NH_3 y H_2O_2 . Se ha reportado que la actividad de las LAAOs puede llegar a producir altos niveles de H_2O_2 en la membrana celular, produciendo hipotensión en modelos mamíferos. Hacen falta estudios para determinar a profundidad los mecanismos de acción de estas toxinas en el contexto de su futuro desarrollo como fármacos (Calderon et al., 2014; Costa et al., 2014; Jimenez Canale et al., 2022B).

Por último, las PLA₂s son enzimas sumamente interesantes para el desarrollo de fármacos, no solo anticancerígenos. Su mecanismo de acción está relacionado con el metabolismo de lípidos membranales, lo cual llega a generar productos como ácido araquidónico, reconocido precursor de compuestos biológicamente activos como prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos, entre otros. Las PLA₂s se han posicionado como moléculas de alto interés en el desarrollo de agentes anticancerígenos ya que se ha reportado pueden inducir apoptosis en varias líneas tumorales, inhibir la migración celular y la angiogénesis, procesos altamente activos en procesos de metástasis (Calderon et al., 2014; Cummings, 2007; Jimenez Canale et al., 2022B).

Considerando lo anterior, sí como lo observado en las figuras 11 y 17, podemos inferir que las toxinas que fueron encapsuladas y liberadas son las mismas que nuestro equipo identificó anteriormente como SVMPs, LAAO y PLA₂. Es importante resaltar que la viabilidad celular observada en las figuras 22 y 23, es con base en la cantidad de veneno encapsulado, no con respecto a la cantidad de veneno liberada por la NP a 24/48/75 h. Continuando con la evaluación de las NPs PLGA-Crotamina, se realizaron sus respectivos análisis de actividad citotóxica, los cuales se observan en la figura 24.

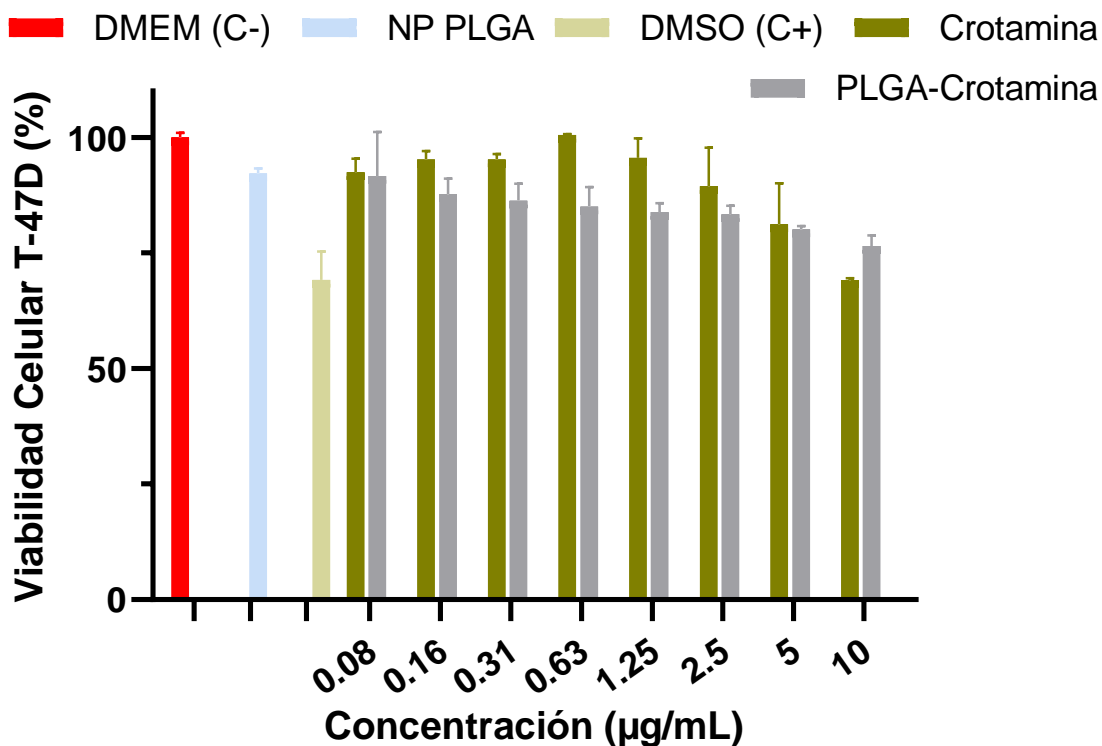


Figura 24. Evaluación de actividad citotóxica de NPs PLGA-Crotamina en línea celular T-47D.

De manera similar en comparación con la crotamina sola, en la figura 24 se observa una disminución del ~30 % de la viabilidad celular de T-47D a la mayor concentración evaluada (10 µg/mL). Adicionalmente, prácticamente se observa que en todas las concentraciones evaluadas se obtuvo mayor citotoxicidad por parte de las NPs que de la crotamina sola, indicando un efecto deseado, donde podemos inferir una correcta internalización de las NPs y liberación intracelular de la crotamina. Contrario a lo observado en la figura 22, no se logró determinar un valor de la IC₅₀ de las NPs PLGA-Crotamina, por lo que se recomienda aumentar las concentraciones evaluadas para ello. Hasta el momento, no se han encontrado otros trabajos publicados donde se pretendiera la encapsulación de crotamina en NPs de PLGA para su evaluación en células tumorales. En ese sentido, Macedo y colaboradores sintetizaron micropartículas (MPs) de PLGA encapsulando crotamina, para su evaluación de actividad antiparasitaria en *Leishmania amazonensis*, sin reportar valores de IC₅₀, en su trabajo reportaron una efectiva

liberación de la crotamina de manera intracelular al presentarse mayor citotoxicidad por las MPs que con la crotamina por si sola (Macedo et al., 2015). Por otro lado, considerando los valores de IC₅₀ para crotamina, reportados por varios autores en líneas tumorales, esperamos que aumentando la dosis al doble (20 µg/mL) observaríamos una disminución del 50 % de la viabilidad, o en su defecto, evaluando a las mismas concentraciones que el veneno (100 – 0.78 µg/mL) determinaríamos con mayor facilidad las concentraciones necesarias a evaluar.

Con base en los resultados anteriores, podemos concluir que el veneno de *C. molossus* y las NPs PLGA-Veneno son efectivos agentes citotóxicos con potencial farmacológico en la línea cancerígena T-47D. La crotamina y NPs PLGA-Crotamina presentan citotoxicidad en menor medida a las concentraciones evaluadas, por lo que hace falta realizar más análisis al respecto.

CAPÍTULO 5

5.1 CONCLUSIONES

En el presente trabajo se logró caracterizar las proteínas que se encontraron en el veneno de la víbora de cascabel cola negra, *C. molossus*. Dicho veneno y la crotamina fueron sometidas a evaluaciones de biocompatibilidad, donde se determinó que a concentraciones $< 125 \mu\text{g/mL}$ no producen hemólisis en los glóbulos rojos. Posteriormente, se determinó que el veneno de *C. molossus* es citotóxica en la línea de carcinoma mamario ductal infiltrante, T-47D, con una IC_{50} de $1.55 \mu\text{g/mL}$. La crotamina redujo la viabilidad celular de la línea celular mencionada en un 30 %.

Se logró sintetizar NPs de PLGA encapsulando veneno de *C. molossus* y crotamina (PLGA-Veneno y PLGA-Crotamina, respectivamente), ambas con promedios de D_H : 300 nm, PDI: 0.11 y $P-\zeta$: -28.5 mV. Ambos tipos de NPs no produjeron hemólisis en glóbulos rojos, presentaron una morfología esférica y superficie lisa, como se confirmó por imágenes de AFM en modo no contacto.

El perfil de cinética de liberación determinó una liberación prolongada y aparentemente controlada del veneno de la matriz polimérica, mientras que la crotamina presentó un perfil de liberación bifásico clásico. Finalmente, las NPs de PLGA-Veneno redujeron la viabilidad celular de las células T-47D, determinándose una IC_{50} : $22.24 \mu\text{g/mL}$. Similar a la crotamina libre, las NPs PLGA-Crotamina redujeron la viabilidad celular de T-47D en un 30 %.

Lo anterior representa un escalón en el desarrollo de nuevos agentes farmacéuticos basados en la encapsulación de agentes peptídicos/proteicos provenientes de venenos de serpientes.

5.2 PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES

El sistema de encapsulamiento de proteínas bioactivas de interés, mediante un proceso de síntesis de NPs de PLGA basado en la doble emulsión- evaporación de solvente es efectivo, pero cuenta con áreas de oportunidad para mejorar.

Se recomienda lo siguiente:

- El aislamiento y/o purificación de las fracciones del veneno de *C. molossus* permitirá evaluar de manera más efectiva el potencial farmacológico de cada toxina, así como determinar los mecanismos de esta.
- Mejorar el sistema de síntesis, a manera de evitar la mayor pérdida posible de la actividad de las toxinas durante este proceso, para ello se ha reportado el uso de diferentes agentes que ayudan a proteger a las proteínas.
- Mejorar la eficiencia de encapsulación del sistema para disminuir o evitar la pérdida de material, y de esta manera aumentar la capacidad de carga de las NPs.
- Evaluación de la capacidad de internalización de las NPs mediante tinción de toxinas con FITC, a manera de confirmar en la manera de lo posible la liberación de las toxinas de manera intracelular.
- Evaluación de actividad citotóxica utilizando controles positivos ya aprobados por la FDA para tratamiento oncológico de cáncer de mama (doxorubicina, epirubicina, docetaxel, paclitaxel, carboplatino, ciclofosfamida, entre otros).
- Evaluación de actividad sinérgica de toxinas provenientes del veneno de *Crotalus* spp., con los medicamentos mencionados en el punto anterior.

REFERENCIAS

- Abbasi Kajani, A., Haghjooy Javanmard, S., Asadnia, M., & Razmjou, A. (2021). Recent Advances in Nanomaterials Development for Nanomedicine and Cancer. *ACS Applied Bio Materials*, 4(8), 5908–5925. <https://doi.org/10.1021/acsabm.1c00591>
- Abdel-Mageed, H. M., AbuelEzz, N. Z., Radwan, R. A., & Mohamed, S. A. (2021). Nanoparticles in nanomedicine: A comprehensive updated review on current status, challenges and emerging opportunities. *Journal of Microencapsulation*, 38(6), 414–436. <https://doi.org/10.1080/02652048.2021.1942275>
- Akhtar, B., Muhammad, F., Sharif, A., & Anwar, M. I. (2021). Mechanistic insights of snake venom disintegrins in cancer treatment. *European Journal of Pharmacology*, 899, 174022. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174022>
- Al Musaimi, O., Al Shaer, D., Albericio, F., & de la Torre, B. G. (2021). 2020 FDA TIDES (Peptides and Oligonucleotides) Harvest. *Pharmaceuticals*, 14(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/ph14020145>
- Allahyari, M., & Mohit, E. (2015). Peptide/protein vaccine delivery system based on PLGA particles. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 12(3), 806–828. <https://doi.org/10.1080/21645515.2015.1102804>
- Amin, K., & Dannenfelser, R.-M. (2006). In vitro hemolysis: Guidance for the pharmaceutical scientist. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 95(6), 1173–1176. <https://doi.org/10.1002/jps.20627>

- Anke Kaufmann, Henry Johannes Greten, & Thomas Efferth. (2013). Animals and Animal Toxins in Traditional and Modern Medicine. *British Journal of Applied Science & Technology*, 4(4), 578–593.
- Ansary, R. H., Rahman, M. M., Mohamad, N., Arrif, T. M., Latif, A. Z. A., Katas, H., Nik, W. S. B. W., & Awang, M. B. (2017). Controlled Release of Lysozyme from Double-Walled Poly(Lactide-Co-Glycolide) (PLGA) Microspheres. *Polymers*, 9(10), Article 10. <https://doi.org/10.3390/polym9100485>
- Arvelo, F., & Cotte, C. (2006). [Metalloproteinases in tumor progression. Review]. *Investigacion Clinica*, 47(2), 185–205.
- Astete, C. E., & Sabliov, C. M. (2006). Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 17(3), 247–289. <https://doi.org/10.1163/156856206775997322>
- Bahena, R. P., Vázquez, R. Á., Hernández, D. E. M., & Prieto, B. A. B. (2007). A descriptive study of the frequency of breast cancer by histological type at Medica Sur Hospital. *Médica Sur*, 14(3), 103–107.
- Bell, I. R., Sarter, B., Koithan, M., Banerji, P., Banerji, P., Jain, S., & Ives, J. (2014). Integrative Nanomedicine: Treating Cancer With Nanoscale Natural Products. *Global Advances in Health and Medicine*, 3(1), 36–53. <https://doi.org/10.7453/gahmj.2013.009>
- Biswas, A. K., Islam, M. R., Choudhury, Z. S., Mostafa, A., & Kadir, M. F. (2014). Nanotechnology based approaches in cancer therapeutics. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 5(4), 043001. <https://doi.org/10.1088/2043-6262/5/4/043001>

Boletín Epidemiológico Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Sistema Único de Información | Secretaría de Salud | Gobierno | gob.mx. (2023).

<https://www.gob.mx/salud/documentos/boletinepidemiologico-sistema-nacional-de-vigilancia-epidemiologica-sistema-unico-de-informacion-231750>

Borja, M., Neri-Castro, E., Pérez-Morales, R., Strickland, J., Ponce-López, R., Parkinson, C., Espinosa-Fematt, J., Sáenz-Mata, J., Flores-Martínez, E., Alagón, A., & Castañeda-Gaytán, G. (2018). Ontogenetic Change in the Venom of Mexican Black-Tailed Rattlesnakes (*Crotalus molossus nigrescens*). *Toxins*, *10*(12), 501. <https://doi.org/10.3390/toxins10120501>

Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *68*(6), 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>

Bukowski, K., Kciuk, M., & Kontek, R. (2020). Mechanisms of Multidrug Resistance in Cancer Chemotherapy. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/ijms21093233>

Butreddy, A., Gaddam, R. P., Kommineni, N., Dudhipala, N., & Voshavar, C. (2021). PLGA/PLA-Based Long-Acting Injectable Depot Microspheres in Clinical Use: Production and Characterization Overview for Protein/Peptide Delivery. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(16), Article 16. <https://doi.org/10.3390/ijms22168884>

Calderon, L. A., Sobrinho, J. C., Zaqueo, K. D., de Moura, A. A., Grabner, A. N., Mazzi, M. V., Marcussi, S., Nomizo, A., Fernandes, C. F. C., Zuliani, J. P., Carvalho, B. M. A., da Silva, S. L., Stábeli, R. G., & Soares, A. M. (2014).

- Antitumoral Activity of Snake Venom Proteins: New Trends in Cancer Therapy. *BioMed Research International*, 2014, 1–19.
<https://doi.org/10.1155/2014/203639>
- Castro, E. E. N., Bénard-Valle, M., Alagón, A., Gil, G., León, J. L. de, & Borja, M. (2020). SERPIENTES VENENOSAS EN MÉXICO: UNA REVISIÓN AL ESTUDIO DE LOS VENENOS, LOS ANTIVENENOS Y LA EPIDEMIOLOGÍA. *Revista Latinoamericana de Herpetología*, 3(2), Article 2.
<https://doi.org/10.22201/fc.25942158e.2020.2.205>
- Celtic Biotech Ltd. (2018). *Open Label Phase I Clinical Trial of Crotoxin in Patients With Advanced Cancer Using an Intravenous Route of Administration* (Clinical Trial Registration NCT01481532). clinicaltrials.gov.
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01481532>
- Center for Drug Evaluation and Research. (2023). Index to Drug-Specific Information. *FDA*. <https://www.fda.gov/drugs/postmarket-drug-safety-information-patients-and-providers/index-drug-specific-information>
- Costa, T. R., Burin, S. M., Menaldo, D. L., de Castro, F. A., & Sampaio, S. V. (2014). Snake venom L-amino acid oxidases: An overview on their antitumor effects. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 20(1), 23. <https://doi.org/10.1186/1678-9199-20-23>
- Cummings, B. S. (2007). Phospholipase A2 as targets for anti-cancer drugs. *Biochemical Pharmacology*, 74(7), 949–959.
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2007.04.021>

- Dangi, R. S., & Shakya, S. (2013). Preparation, optimization and characterization of PLGA nanoparticle. *International Journal of Pharmacy & Life Sciences*, *4*(7), 2810–2818.
- Danhier, F., Ansorena, E., Silva, J. M., Coco, R., Le Breton, A., & Pr at, V. (2012). PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. *Journal of Controlled Release*, *161*(2), 505–522. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.01.043>
- Danquah, M. K., & Agyei, D. (2012). Pharmaceutical applications of bioactive peptides. *OA Biotechnology*, *1*(2), 1–7. <https://doi.org/10.13172/2052-0069-1-2-294>
- Deshwal, A., Phan, P., Datta, J., Kannan, R., & Thallapuranam, S. K. (2021). A Meta-Analysis of the Protein Components in Rattlesnake Venom. *Toxins*, *13*(6), Article 6. <https://doi.org/10.3390/toxins13060372>
- Dingman, R., & Balu-Iyer, S. V. (2019). Immunogenicity of Protein Pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *108*(5), 1637–1654. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2018.12.014>
- Dobson, J., Yang, D. C., op den Brouw, B., Cochran, C., Huynh, T., Kurrupu, S., Sánchez, E. E., Massey, D. J., Baumann, K., Jackson, T. N. W., Nouwens, A., Josh, P., Neri-Castro, E., Alagón, A., Hodgson, W. C., & Fry, B. G. (2018). Rattling the border wall: Pathophysiological implications of functional and proteomic venom variation between Mexican and US subspecies of the desert rattlesnake *Crotalus scutulatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, *205*, 62–69. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2017.10.008>

- Dregan, A., Møller, H., Charlton, J., & Gulliford, M. C. (2013). Are alarm symptoms predictive of cancer survival?: Population-based cohort study. *British Journal of General Practice*, 63(617), e807–e812. <https://doi.org/10.3399/bjgp13X675197>
- Durban, J., Sanz, L., Trevisan-Silva, D., Neri-Castro, E., Alagón, A., & Calvete, J. J. (2017). Integrated Venomics and Venom Gland Transcriptome Analysis of Juvenile and Adult Mexican Rattlesnakes *Crotalus simus*, *C. tzabcan*, and *C. culminatus* Revealed miRNA-modulated Ontogenetic Shifts. *Journal of Proteome Research*, 16(9), 3370–3390. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.7b00414>
- Feczkó, T., Tóth, J., Dósa, Gy., & Gyenis, J. (2011). Optimization of protein encapsulation in PLGA nanoparticles. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 50(8), 757–765. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2011.06.008>
- Fry, B. (2015). *Venomous Reptiles and Their Toxins: Evolution, Pathophysiology and Biodiscovery*. Oxford University Press.
- Fu, K., Griebenow, K., Hsieh, L., Klibanov, A. M., & Langer, R. (1999). FTIR characterization of the secondary structure of proteins encapsulated within PLGA microspheres—ScienceDirect. *Journal of Controlled Release*, 58(3), 357–366. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(98\)00192-8](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(98)00192-8)
- Giteau, A., Venier-Julienne, M. C., Aubert-Pouëssel, A., & Benoit, J. P. (2008). How to achieve sustained and complete protein release from PLGA-based microparticles? *International Journal of Pharmaceutics*, 350(1), 14–26. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.11.012>

- Gorai, B., & Sivaraman, T. (2017). Delineating residues for haemolytic activities of snake venom cardiotoxin 1 from *Naja naja* as probed by molecular dynamics simulations and in vitro validations. *International Journal of Biological Macromolecules*, 95, 1022–1036.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.10.091>
- Groheux, D., & Hindie, E. (2021). Breast cancer: Initial workup and staging with FDG PET/CT. *Clinical and Translational Imaging*, 9(3), 221–231.
<https://doi.org/10.1007/s40336-021-00426-z>
- Gutiérrez, J. M., Escalante, T., Rucavado, A., & Herrera, C. (2016). Hemorrhage Caused by Snake Venom Metalloproteinases: A Journey of Discovery and Understanding. *Toxins*, 8(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/toxins8040093>
- Gutiérrez, J. M., & Rucavado, A. (2000). Snake venom metalloproteinases: Their role in the pathogenesis of local tissue damage. *Biochimie*, 82(9), 841–850.
[https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(00\)01163-9](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(00)01163-9)
- Hayashi, M. A. F., Nascimento, F. D., Kerkis, A., Oliveira, V., Oliveira, E. B., Pereira, A., Rádis-Baptista, G., Nader, H. B., Yamane, T., Kerkis, I., & Tersariol, I. L. S. (2008). Cytotoxic effects of crotoamine are mediated through lysosomal membrane permeabilization. *Toxicon*, 52(3), 508–517.
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2008.06.029>
- Iqbal, M., Zafar, N., Fessi, H., & Elaissari, A. (2015). Double emulsion solvent evaporation techniques used for drug encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics*, 496(2), 173–190.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.10.057>

- Jang, J., Nguyen, M. Q., Park, S., Ryu, D., Park, H., Lee, G., Kim, C. J., Jang, Y. J., & Choe, H. (2023). Crotamine-based recombinant immunotoxin targeting HER2 for enhanced cancer cell specificity and cytotoxicity. *Toxicon*, 230, 107157. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2023.107157>
- Jimenez Canale, J., Velázquez-Contreras, E. F., & Sarabia Sainz, Jose Andrei. (2022B). El potencial farmacológico de venenos de serpientes de Sonora, México | EPISTEMUS. *EPISTEMUS*, 16(33). <https://doi.org/10.36790/epistemus.v16i33.226>
- Jimenez-Canale, J., Fernandez-Quiroz, D., Teran-Saavedra, N. G., Diaz-Galvez, K. R., Gallegos-Tabanico, A., Burgara-Estrella, A. J., Sarabia-Sainz, H. M., Guzman-Partida, A. M., Robles-Burgueño, M. del R., Vazquez-Moreno, L., & Sarabia-Sainz, J. A. (2022A). Cytotoxic activity of *Crotalus molossus molossus* snake venom-loaded in chitosan nanoparticles against T-47D breast carcinoma cells. *Acta Biochimica Polonica*, 69(1), Article 1. https://doi.org/10.18388/abp.2020_5975
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lemos-Espinal, J. A., Smith, G. R., & Rorabaugh, J. C. (2019). A conservation checklist of the amphibians and reptiles of Sonora, Mexico, with updated species lists. *ZooKeys*, 829, 131–160. <https://doi.org/10.3897/zookeys.829.32146>
- Li Lee, M., Chung, I., Yee Fung, S., Kanthimathi, M. s., & Hong Tan, N. (2014). Antiproliferative Activity of King Cobra (*Ophiophagus hannah*) Venom I-Amino

- Acid Oxidase. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 114(4), 336–343.
<https://doi.org/10.1111/bcpt.12155>
- Liao, R., Pon, J., Chungyoun, M., & Nance, E. (2020). Enzymatic protection and biocompatibility screening of enzyme-loaded polymeric nanoparticles for neurotherapeutic applications. *Biomaterials*, 257, 120238.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.120238>
- Macedo, S. R. A., Barros, N. B. de, Ferreira, A. S., Moreira-Dill, L. S., Calderon, L. A., Soares, A. M., & Nicolete, R. (2015). Biodegradable Microparticles Containing Crotonamine Isolated from *Crotalus durissus terrificus* Display Antileishmanial Activity in vitro. *Pharmacology*, 95(1–2), 78–86.
<https://doi.org/10.1159/000371391>
- Macias-Rodríguez, E. F., Martínez-Martínez, A., Gatica-Colima, A., Bojórquez-Rangel, G., & Plenge-Tellechea, L. F. (2014). Análisis comparativo de la actividad hemolítica entre las subespecies *Crotalus molossus* y *Crotalus molossus nigrescens*. *Revista Bio Ciencias*, 2(4), 302–312.
<https://doi.org/10.15741/revbio.02.04.08>
- Maeda, H. (2021). The 35th Anniversary of the Discovery of EPR Effect: A New Wave of Nanomedicines for Tumor-Targeted Drug Delivery—Personal Remarks and Future Prospects. *Journal of Personalized Medicine*, 11(3), 229. <https://doi.org/10.3390/jpm11030229>
- Makadia, H. K., & Siegel, S. J. (2011). Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers*, 3(3), 1377–1397.
<https://doi.org/10.3390/polym3031377>

- Marinovic, M. P., Mas, C. D., Monte, G. G., Felix, D., Campeiro, J. D., & Hayashi, M. A. F. (2017). Crotamine: Function Diversity and Potential Applications. In H. Inagaki, C.-W. Vogel, A. K. Mukherjee, & T. R. Rahmy (Eds.), *Snake Venoms* (pp. 265–293). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-007-6410-1_28
- Meng, R. (2020). *The Efficacy and Safety of Batroxobin Combined With Anticoagulation in Cerebral Venous Sinus Thrombosis* (Clinical Trial Registration NCT04269954). clinicaltrials.gov.
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04269954>
- Mohamed Abd El-Aziz, T., Soares, A. G., & Stockand, J. D. (2019). Snake Venoms in Drug Discovery: Valuable Therapeutic Tools for Life Saving. *Toxins*, *11*(10), Article 10. <https://doi.org/10.3390/toxins11100564>
- Mohammadi-Samani, S., & Taghipour, B. (2015). PLGA micro and nanoparticles in delivery of peptides and proteins; problems and approaches. *Pharmaceutical Development and Technology*, *20*(4), 385–393. <https://doi.org/10.3109/10837450.2014.882940>
- Namiot, E. D., Sokolov, A. V., Chubarev, V. N., Tarasov, V. V., & Schiöth, H. B. (2023). Nanoparticles in Clinical Trials: Analysis of Clinical Trials, FDA Approvals and Use for COVID-19 Vaccines. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/ijms24010787>
- Nascimento, F. D., Sancey, L., Pereira, A., Rome, C., Oliveira, V., Oliveira, E. B., Nader, H. B., Yamane, T., Kerkis, I., Tersariol, I. L. S., Coll, J.-L., & Hayashi, M. A. F. (2012). The Natural Cell-Penetrating Peptide Crotamine Targets Tumor Tissue *in Vivo* and Triggers a Lethal Calcium-Dependent Pathway in

Cultured Cells. *Molecular Pharmaceutics*, 9(2), 211–221.
<https://doi.org/10.1021/mp2000605>

Neurobiological Technologies. (2009). *ASP I (Ancrod Stroke Program) Study of Acute Viprinex™ for Emergency Stroke: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study of Ancrod (Viprinex™) in Subjects Beginning Treatment Within 6 Hours of the Onset of Acute, Ischemic Stroke* (Clinical Trial Registration NCT00141011). clinicaltrials.gov.
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00141011>

Nunes, T., Hamdan, D., Leboeuf, C., El Bouchtaoui, M., Gapihan, G., Nguyen, T., Meles, S., Angeli, E., Ratajczak, P., Lu, H., Di Benedetto, M., Bousquet, G., & Janin, A. (2018). Targeting Cancer Stem Cells to Overcome Chemoresistance. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(12), 4036.
<https://doi.org/10.3390/ijms19124036>

Oguiura, N., Boni-Mitake, M., Affonso, R., & Zhang, G. (2011). In vitro antibacterial and hemolytic activities of crotamine, a small basic myotoxin from rattlesnake *Crotalus durissus*. *The Journal of Antibiotics*, 64(4), Article 4.
<https://doi.org/10.1038/ja.2011.10>

Padilla-Raygoza, N., Monroy-Torres, R., Sandoval-Salazar, C., Vera-Becerra, L. E., Patiño-López, M. E., de Lourdes García-Campos, M., Campos, V. B., del Carmen Ortega Jiménez, M., del Carmen Delgado-Sandoval, S., Ramírez-Gómez, X. S., Jimenez-García, S. N., & Lemus, H. L. L.-. (2020). Cancer prevention programmes in Mexico: Are we doing enough? *Ecancermedicalscience*, 14, 997. <https://doi.org/10.3332/ecancer.2020.997>

- Pancioli, A. (2015). *Phase 2 The Combined Approach to Lysis Utilizing Eptifibatide and Rt-PA in Acute Ischemic Stroke-Full Dose Regimen(CLEAR-FDR)* (Clinical Trial Registration NCT01977456). clinicaltrials.gov. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01977456>
- Sánchez, M., Solano, G., Vargas, M., Reta-Mares, F., Neri-Castro, É., Alagón, A., Sánchez, A., Villalta, M., León, G., & Segura, Á. (2020). Toxicological profile of medically relevant *Crotalus* species from Mexico and their neutralization by a *Crotalus basiliscus/Bothrops asper* antivenom. *Toxicon*, 179, 92–100. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.03.006>
- Song, J. K., Jo, M. R., Park, M. H., Song, H. S., An, B. J., Song, M. J., Han, S. B., & Hong, J. T. (2012). Cell growth inhibition and induction of apoptosis by snake venom toxin in ovarian cancer cell via inactivation of nuclear factor κ B and signal transducer and activator of transcription 3. *Archives of Pharmacal Research*, 35(5), 867–876. <https://doi.org/10.1007/s12272-012-0512-1>
- Song, K. C., Lee, H. S., Choung, I. Y., Cho, K. I., Ahn, Y., & Choi, E. J. (2006). The effect of type of organic phase solvents on the particle size of poly(d,l-lactide-co-glycolide) nanoparticles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 276(1), 162–167. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2005.10.064>
- Subhan, M. A., Yalamarty, S. S. K., Filipczak, N., Parveen, F., & Torchilin, V. P. (2021). Recent Advances in Tumor Targeting via EPR Effect for Cancer Treatment. *Journal of Personalized Medicine*, 11(6), 571. <https://doi.org/10.3390/jpm11060571>

- Tasoulis, T., & Isbister, G. (2017). A Review and Database of Snake Venom Proteomes. *Toxins*, 9(9), 290. <https://doi.org/10.3390/toxins9090290>
- Tasoulis, T., & Isbister, G. K. (2022). A current perspective on snake venom composition and constituent protein families. *Archives of Toxicology*. <https://doi.org/10.1007/s00204-022-03420-0>
- Teran-Saavedra, N. G., Sarabia-Sainz, J. A., Velázquez-Contreras, E. F., Ramos-Clamont Montfort, G., Pedroza-Montero, M., & Vazquez-Moreno, L. (2020). Albumin-Albumin/Lactosylated Core-Shell Nanoparticles: Therapy to Treat Hepatocellular Carcinoma for Controlled Delivery of Doxorubicin. *Molecules*, 25(22), Article 22. <https://doi.org/10.3390/molecules25225432>
- Thao, L. Q., Lee, C., Kim, B., Lee, S., Kim, T. H., Kim, J. O., Lee, E. S., Oh, K. T., Choi, H.-G., Yoo, S. D., & Youn, Y. S. (2017). Doxorubicin and paclitaxel co-bound lactosylated albumin nanoparticles having targetability to hepatocellular carcinoma. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 152, 183–191. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.01.017>
- THE REPTILE DATABASE*. (2023). <http://www.reptile-database.org/>
- Tran, S., DeGiovanni, P.-J., Piel, B., & Rai, P. (2017). Cancer nanomedicine: A review of recent success in drug delivery. *Clinical and Translational Medicine*, 6(1), 44. <https://doi.org/10.1186/s40169-017-0175-0>
- Trigos, A. S., Pearson, R. B., Papenfuss, A. T., & Goode, D. L. (2018). How the evolution of multicellularity set the stage for cancer. *British Journal of Cancer*, 118(2), Article 2. <https://doi.org/10.1038/bjc.2017.398>
- World Health Organization*. (2023). <https://www.who.int/westernpacific/health-topics/cancer>

- Yalcin, H. T., Ozen, M. O., Gocmen, B., & Nalbantsoy, A. (2014). Effect of Ottoman Viper (*Montivipera xanthina* (Gray, 1849)) Venom on Various Cancer Cells and on Microorganisms. *Cytotechnology*, 66(1), 87–94. <https://doi.org/10.1007/s10616-013-9540-z>
- Yu, S., Kim, T., Yoo, K. H., & Kang, K. (2017). The T47D cell line is an ideal experimental model to elucidate the progesterone-specific effects of a luminal A subtype of breast cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 486(3), 752–758. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.03.114>

Cytotoxic activity of *Crotalus molossus molossus* snake venom-loaded in chitosan nanoparticles against T-47D breast carcinoma cells

Jorge Jimenez-Canale^{1#}, Daniel Fernández-Quiroz^{2#}, Nayelli G. Teran-Saavedra¹, Kevin R. Diaz-Galvez¹, Amed Gallegos-Tabanico¹, Alexel J. Burgara-Estrella³, Hector M. Sarabia-Sainz⁴, Ana M. Guzman-Partida⁵, Maria del Refugio Robles-Burgueño⁵, Luz Vazquez-Moreno⁵ and Jose A. Sarabia-Sainz^{3✉}

¹Departamento de Investigaciones en Polímeros y Materiales, Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora 83000, México; ²Departamento de Ingeniería Química y Metalurgia, Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora 83000, México; ³Departamento de Investigación en Física, Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora 83000, México; ⁴Departamento de Ciencias del Deporte y Actividad Física, Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora 83000, México; ⁵Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de Proteínas y Glicanos, Centro de Investigaciones en Alimentos y Desarrollo, Hermosillo, Sonora 83304, México

Nanomedicine has led to the development of new biocompatible and biodegradable materials able to improve the pharmaceutical effect of bioactive components, broadening the options of treatment for several diseases, including cancer. Additionally, some snake venom toxins have been reported to present cytotoxic activity in different tumor cell lines, making them an auspicious option to be used as cancer drugs. The present study aims to evaluate the cytotoxic activity of the northern black-tailed rattlesnake (*Crotalus molossus molossus*) venom-loaded chitosan nanoparticles (Cs-Venom NPs) against the T-47D breast carcinoma cell line. To do so, we first identified the significant proteins composing the venom; afterward, hemocompatibility and cytotoxic activity against tumoral cells were evaluated. The venom was then loaded into chitosan nanoparticles through the ionotropic gelation process, obtaining particles of 415.9±21.67 nm and ζ-potential of +28.3±1.17 mV. The Cs-Venom complex delivered the venom into the breast carcinoma cells, inhibiting their viability and inducing morphological changes in the T-47D cells. These features indicate that these nanoparticles are suitable for the potential use of *C. m. molossus* venom toxins entrapped within polymer nanoparticles for the future development and research of cancer drugs.

Keywords: nanomedicine, chitosan nanoparticles, drug delivery system, rattlesnake venom, breast cancer treatment

Received: 22 October, 2021; revised: 16 December, 2021; accepted: 05 January, 2022; available on-line: 11 February, 2022

✉e-mail: andreisrabia@gmail.com

Acknowledgments of Financial Support: Project was partly financially developed by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), Mexico, by scholarship number 494554

[#]These Authors contributed equally

Abbreviations: Cs, chitosan; nanoparticles, NPs; Enhanced Permeability and Retention effect, EPR; sodium tripolyphosphate, TPP; phospholipase A2, PLA2; snake venom metalloproteinase, snake venom serine proteinase, SVSP; L-aminoacid oxidase, LAO; encapsulation efficiency, EE%; Dynamic Light Scattering, DLS; Atomic Force Microscopy, AFM; Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR; fluorescence intensity, FI

INTRODUCTION

Nanomedicine can be defined as nanotechnology applied to health and medicine (Tran *et al.*, 2017). Hence,

nanomedicine involves the use of different materials to achieve a medical benefit. Materials obtained through nanomedicine may enhance the pharmaceutical properties of bioactive agents (Tran *et al.*, 2017; Biswas *et al.*, 2012, 2014; Rizvi & Saleh, 2018; Teran-Saavedra *et al.*, 2019). The properties of these nanomaterials could prevent their rapid degradation, help target specific tissue or control its release in a stable manner (Tran *et al.*, 2017). Throughout recent years, nanomedicines have been approved by the FDA for their clinical use. DoxilTM/CaelyxTM was the first nanomedicine, indicated for Kaposi's sarcoma, to be approved in 1995, and by 2016 more than 50 nanomedicines have been already approved for cancer and other pathologies (Hare *et al.*, 2017). Some nanomedicines consist of liposomal nanoparticles (MyocetTM and DoxyTM), polymeric conjugates (OncasparTM(PEG)), polymeric micelles (Genoxol-PMTM), and polymeric nanoparticles (AccurinTM) (Hare *et al.*, 2017). One of the main advantages of using nanomaterials *vs.* micro or larger particles is the retention of particles smaller than 500 nm in the tumor due to the Enhanced Permeability and Retention effect (EPR) (Tran *et al.*, 2017; Hare *et al.*, 2017; Maeda, 2021; Subhan *et al.*, 2021). By encapsulating poorly soluble drugs within nanocarriers, their bioavailability may be improved and prevent their rapid clearance from the bloodstream (Tran *et al.*, 2017).

Polymers, such as albumin, PLGA (poly(lactic-co-glycolic acid)), alginate, and chitosan have been widely used as vehicles for drug transportation to different sites within an organism (Goycoolea *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2018; Sarmiento *et al.*, 2006; Gallegos-Tabanico *et al.*, 2017; Danhier *et al.*, 2012; Mir *et al.*, 2017), making them encouraging tools for drug delivery. Polymeric nanoparticles (NPs) are of particular interest due to their properties, such as the simplicity of the synthesis method, biocompatibility, and biodegradability (Calvo *et al.*, 1997; Goycoolea *et al.*, 2009; Soares *et al.*, 2018; Carreño-Gómez & Duncan, 1997).

Chitosan (Cs) is a cationic polysaccharide composed of β (1→4) linked units of *N*-acetyl-D-glucosamine and D-glucosamine (Quiñones *et al.*, 2018; Argüelles-Monal *et al.*, 2018). It is obtained by the partial deacetylation of chitin and is also naturally found in some fungi associated with other polysaccharides (Peniche *et al.*, 2008). Chitosan-based NPs have attracted scientific interest in encapsulating and delivering therapeutic biomolecules, such as drugs, genes, and proteins, among others.

Some of the nanoparticles synthesis methods include water-in-oil emulsion (Riegger *et al.*, 2018), nanoprecipitation (Luque-Alcaraz *et al.*, 2016), the self-assembling mechanism (Quiñones *et al.*, 2018), and ionotropic gelation (Goycoolea *et al.*, 2009; Calvo *et al.*, 1997; Fernández-Quiroz *et al.*, 2019). The latter has been used to prepare nanoparticles from polyelectrolytes in the 100–600 nm range (Goycoolea *et al.*, 2009; Soares *et al.*, 2018; Sawtari *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2017) with relatively mild and straightforward procedures (Wu *et al.*, 2017).

The possibility of using Cs for drug delivery has been thoroughly studied (Li *et al.*, 2018a; Rampino *et al.*, 2013; Ahmed & Aljaied, 2016); nevertheless, few studies have been conducted with the association of animal venoms (Soares *et al.*, 2018; Mohammadpourounighi *et al.*, 2010; Naser *et al.*, 2015). The association of some animal venoms toxins and nanoparticles has been reported as an effective way to enhance therapeutical effects (Biswas *et al.*, 2012). Additionally, snake venom toxins pose an incredible source of potential drugs for many types of diseases, including cancer (Calderon *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2018).

Snake venom comprises diverse molecules, such as carbohydrates, lipids, proteins, and isoforms (Tasoulis & Isbister, 2017). Recent advances in genomics, transcriptomics, and proteomics have led to new insights regarding how they are composed. Tasoulis and Isbister reviewed the venoms of 130 different snake species and reported that 63 different protein families were generally found in them (Tasoulis & Isbister, 2017). Amongst those, four major protein families consisting of A_v phospholipases (PLA_v), snake venom metalloproteinases (SVMs), snake venom serine proteases (SVSPs), and three-finger toxins (3FTXs) (Tasoulis & Isbister, 2017). Some of these protein families are responsible for many of the clinical symptoms developed by snakebite envenomation, such as local or systemic hemorrhage, neurotoxicity, and blood clotting anomalies (Masuda *et al.*, 1998; Torii *et al.*, 1997; Suhr & Kim, 1996; Meléndez-Martínez *et al.*, 2017; Chellapandi, 2014; Park *et al.*, 2009; Bénard-Valle *et al.*, 2014; Calderon *et al.*, 2014; Calvete *et al.*, 2009). Interestingly enough, several studies have reported that some of these toxin families have cytotoxic action against tumoral cells (Calderon *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2018b; Hayashi *et al.*, 2012; Kerkis *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2016; Marinovic *et al.*, 2017; Azevedo *et al.*, 2016). Given the biological mechanisms by which they interact with different tissues, cells, and receptors, snake venom toxins can induce apoptosis, inhibit angiogenesis, tumoral growth, and cell migration (Biswas *et al.*, 2012; Calderon *et al.*, 2014; Al-Sadoon *et al.*, 2013; Badr *et al.*, 2013). Additionally, it has been reported that the interaction of some of these toxins with nanoparticles may enhance their therapeutical effects (Gláucia-Silva *et al.*, 2018; Soares *et al.*, 2018; Agarwal *et al.*, 2019; Karpel *et al.*, 2018; H & N, 2009; Biswas *et al.*, 2012).

The purpose of the present study was to characterize the venom of a northern black-tailed rattlesnake (*C. m. molossus*) for protein identification and evaluate it for hemocompatibility in human red blood cells and cytotoxic activity in the T-47D breast carcinoma cell line. Additionally, chitosan nanoparticles were prepared as a matrix to evaluate their ability to entrap the rattlesnake venom, their hemocompatibility, and evaluate if the cytotoxic activity presented in the tumoral cell line stayed unhinged.

MATERIALS AND METHODS

Materials

All the reagents used were analytical grade and, unless specified, purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Low molecular weight chitosan (Cs, Sigma-Aldrich; the degree of deacetylation was certified by the supplier as ~76%, with an M_n of ~95 kDa), pentasodic tripolyphosphate ($\geq 98\%$) (TPP), sodium chloride ($\geq 99\%$) (NaCl), Glycerol ($\geq 99\%$), bovine serum albumin (66.5 kDa and ~96%) (BSA), Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), and [3-(3-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)]. T-47D cells were obtained from the ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA). All the experiments were carried out using Type 2 ultrapure water (0.18 $\mu\text{S}/\text{cm}$).

Ethics Statement

The Research Ethics Committee approved the present study of the Universidad de Sonora. Experiments comply with the principles expressed in the declaration of Helsinki. Blood was drawn from participants who signed informed consent and agreed for their blood to be used in hemolysis assays.

C. m. molossus Venom Extraction

Venom extraction was performed at the Itinerant Wildlife Museum (MIVIA) following the American Society of Ichthyologists and Herpetologists guidelines for the use of live amphibians and reptiles were followed. Secretariat of Agriculture and Livestock (SAGARHPA) issued captive animals, and venom extraction for scientific purposes permit numbers 12/09-00462/15 and DGFF/12/09-1106/18.

Three male adult snakes from the scientific collection of the MIVIA in Hermosillo, Sonora, Mexico, were used for venom extraction. Venom was extracted manually by allowing the snakes to bite sterile 100 mL plastic containers covered with parafilm, obtaining an average of 800 μL per extraction. Afterward, venom was stored at -80°C for 24 h and then lyophilized. For use, the lyophilized venom was resuspended in ultrapure water and centrifuged at $2000\times g$ for 15 minutes for debris removal.

Protein Concentration

The protein concentration of the venom samples and the encapsulation efficiency (EF%) were determined with slight modifications by the Bradford microplate protein quantification method (Bradford). Briefly, different samples of known concentrations of BSA were prepared (1:10, BSA sample: Bradford reagent), and absorption (ABS) was read in a UV-spectrophotometer at 595 nm to obtain a protein calibration curve and equation (Thermo Scientific Multiskan GO). Afterward, samples from *C. m. molossus* venom were quantified by measuring the ABS of the supernatant and comparing the values with the calibration curve previously obtained.

Venom Characterization

SDS-PAGE. Proteins from the venom were analyzed by electrophoresis using reducing and denaturalizing conditions (SDS-PAGE) in a 15% polyacrylamide gel according to Laemmli (Laemmli, 1970). PAGE analysis was done using 10 μg of venom protein and subsequent

ly stained with Coomassie. The molecular weight of the proteins was estimated by comparing them to broad-range molecular weight markers (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Protein Digestion and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Analysis (LC-MS/MS). The three electrophoretic protein bands with the highest intensity were excised from the gel, reduced with 10 mM DTT in 25 mM ammonium bicarbonate, and subsequently alkylated with 55mM iodoacetamide, according to a procedure described by Huerta-Ocampo and others (Huerta-Ocampo *et al.*, 2014). Protein digestion was carried out overnight at 37°C with sequencing-grade trypsin (Promega, Madison, WI, USA). Tryptic peptides were dried by centrifugation in a vacuum, suspended in 0.1% trifluoroacetic acid, and purified using ZipTip (Merck Millipore, Darmstadt, Germany).

Trypsinized peptides were subjected to reverse-phase ultra-performance liquid chromatography using the 1290 Infinity LC System (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) associated with an analytical column ZORBAX 300SB-C8 (5 µm×2.1 mm×150 mm, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), coupled to a Dual AJS ESI ionization source (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Afterward, they were analyzed by tandem mass spectrometry through a data-dependent analysis in the 6530 Accurate-Mass Quadrupole Time-of-Flight (Q-TOF) LC/MS system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) with the chromatographic and MS/MS conditions (Morales-Amparano *et al.*, 2019) using Agilent MassHunter Workstation Software package (Agilent Technologies, Santa Clara, CA).

Protein Identification. The MS/MS raw data of the tryptic digests from the electrophoretic bands were interpreted to determine protein identities and relative abundances using a Spectrum Mill MS Proteomics Workbench software package (Agilent Technologies, Santa Clara, CA), also using PA *Crotalus* + cont.fasta in-home database. Search parameters included carbamidomethylation of cysteines as fixed modification, methionine oxidation as variable modification, 50% minimum matched peak intensity, individual ion scores ≥12, and scored peak intensity (SPI) ≥60 were considered as suitable matches. In contrast, protein score ≥25 and at least two peptides were necessary for confident protein identification. In addition, the MS/MS raw data were converted to .mgf files in the MassHunter Workstation Software Qualitative Analysis and processed in search engine MASCOT free version. The using search parameters including carbamidomethylation of cysteines as fixed modification, methionine oxidation as variable modification, 50% minimum matched peak intensity, 20 ppm and 0.1 Da on precursor tolerance and production masses, respectively, 1 missed tryptic cleavage, and ESI-Q-TOF scoring parameters.

Hemolytic Activity Assays

The Research Ethics Committee approved the present study of the Universidad de Sonora. Experiments comply with the principles expressed in the declaration of Helsinki. Blood was drawn from participants who signed informed consent and agreed for their blood to be used in hemolysis assays. Experiments were performed as described by Diaz-Galvez and others (Diaz-Galvez *et al.*, 2019), with slight modifications. Briefly, these blood samples were drawn and then transferred to clean tubes (BD Vacutainer EDTA anticoagulant); afterward, 15 µL of blood were diluted in 1 mL of PBS. Then, 0.046–

3 mg/mL of snake venom samples were incubated at 37°C for 24 h and then centrifuged at 2000×g×1 minute. Hemolysis was determined by the absorbance of the supernatant at 540 nm, using a spectrophotometer (Thermo Scientific Multiskan GO). Blood diluted in PBS was used as a negative control for hemolysis, and blood diluted in water was used as a positive control. For the Cs NPs, the same procedure was followed, but instead of using *C. m. molossus* venom, concentrations ranging from 0.0046–3 mg/mL of Cs-Blank and Cs-Venom NPs were evaluated.

Cell Viability Assays

The Research Ethics Committee approved the present study of the Universidad de Sonora. Experiments comply with the principles expressed in the declaration of Helsinki. Cell viability assays were performed in the T-47D breast carcinoma cell line, using [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Diaz-Galvez *et al.*, 2019). Briefly, cells were seeded in 48-well plates at a density of 10 000 cells/200 µL per well using DMEM containing 10% FBS. Cells were incubated at 37°C and 5% CO₂ for 24 h. Afterward, the medium was replaced for 0.98–31.25 µg/mL of venom in DMEM for 24 h. The Cytotoxic Concentration₅₀ (IC₅₀) value of the venom in the T-47D breast carcinoma cells was thus determined. For the Cs NPs, the same procedure was followed, but instead of using *C. m. molossus* venom, concentrations ranging from 0.98–31.25 µg/mL of Cs-Blank and Cs-Venom NPs were evaluated.

Venom-loaded Nanoparticle Synthesis

The preparation of Cs NPs was done similarly to what Calvo and others (Calvo *et al.*, 1997) described, with slight modifications. Briefly, chitosan (Cs) was dissolved (2 mg/mL) in 1% acetic (v/v). Afterward, NaCl (0.4% w/v) was added to the Cs solution and stirred for 15 min. A mixture of TPP (4 mg/mL) and snake venom (5 mg/mL) was prepared for the crosslinker solution. Then, the TPP-Venom solution was added dropwise (10:1, Cs: crosslinker solution) to form the Cs-Venom NPs spontaneously.

For blank NPs, the same procedure was done but without adding *C. m. molossus* venom in the TPP solution. Nanoparticles were isolated by centrifugation (13000 rpm for 30 min at 4°C) using a bed of glycerol (20 µL) at the bottom of the vial. The supernatant was carefully removed, and the pellet was resuspended in water for characterization. The venom's encapsulation efficiency (EE%) was determined by the Bradford method; the supernatants of the particles obtained through the isolation process were quantified following the same procedure described in section 2.4. The EE% calculation was determined with equation (1).

$$EE\% = \frac{\text{Total protein} - \text{Supernatant protein}}{\text{total protein}} \times 100$$

Nanoparticle Characterization

Dynamic Light Scattering and ζ-Potential. The particle size (mean particle diameters and size distributions) and ζ-potential of NPs were measured at 25°C using dynamic light scattering (DLS) at a scattering angle of 90° with Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments Ltd, Malvern UK) with a doppler anemometry laser. Samples were diluted in water (0.5:1 mL). All the measurements were done in triplicate.

Fourier Transformed Infrared Spectroscopy. The structural characterization of these nanomaterials was performed by infrared spectra using Agilent Cary 630 FTIR Spectrometer (Agilent, Cary 630 FTIR Spectrometer, Santa Clara, CA, USA) a resolution of 4 cm^{-1} in the range of $650\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ in ATR mode.

Nanoparticle Morphology. The morphology of NPs was characterized by atomic force microscopy (AFM, Alpha 300RA, WiTec, Germany). AFM images were reconstructed in the non-contact mode using nanosensors with a spring constant of 42 N/m and a resonant frequency of 285 kHz . The analyses were performed using $5\times 5\text{ }\mu\text{m}$ scanning images with WiTec project FOUR v4.1 software.

Fluorescence Intensity of Rhodamine 123

T-47D cells were seeded in 48-well plates at a density of 10000 cells/200 μL per well using DMEM containing 10% FBS. After incubation (37°C and 5% CO_2 for 24 h) cells were washed three times with 200 μL of physiological saline solution (PSS). Subsequently, the cells were incubated with PBS containing venom from *C. m. molossus* and NPs (Cs-Blank and Cs-Venom) at a $7.81\text{--}31.25\text{ }\mu\text{L/mL}$ at 37°C for 30 min. Then, they were rinsed three times again with PSS (200 μL). The fluorescence intensity (FI) was measured as follows: the cells were stained with $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ of rhodamine 123 and incubated for 15 min at 37°C . Finally, fluorescence and cell morphology were analyzed under confocal microscopy (Nikon TiEclipse C2+, Japan) with 488 nm lasers. Images were obtained with a 1024×1024 pixels resolution and $20\times$ magnification and analyzed by imaging software NIS-Element.

Statistical Analysis

Two-way ANOVA followed by Sidak's and Tukey's multiple comparison tests were performed in GraphPad Prism 8.0.2 for Windows (GraphPad Software, San Diego, California, USA, www.graphpad.com). *P* values ≤ 0.005 were considered significantly different.

RESULTS AND DISCUSSION

Venom Characterization

When using snake venom, it is imperative to know what toxins or toxin families compose it, which helps to

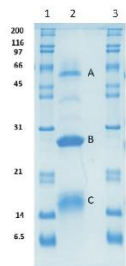


Figure 1. 15% SDS-PAGE gel electrophoresis of *C. m. molossus* venom from Hermosillo, Sonora, Mexico under reducing conditions.

Different bands with molecular masses of $\sim 65\text{ kDa}$, 23 kDa , and 16 kDa (A, B, and C, respectively) were separated from the venom. LC-MS/MS analysis identified these bands as a P-III SVMP and LAAO (band A), a P-I SVMP (band B), and a PLA₂ (band C). $10\text{ }\mu\text{g}$ of venom were loaded in lane 2.

discuss the possible outcomes of any performed analysis and facilitate any experiment replications. Electrophoresis gel analysis was performed in reducing conditions to separate the protein bands in the black-tailed rattlesnake, *C. m. molossus*, venom. Proteins migrated with relative molecular mass from $\sim 65\text{ kDa}$ to $\sim 16\text{ kDa}$. Three major protein bands A, B, and C (Fig. 1) were selected for further analysis.

Intraspecific venom variation has been previously reported for several species of rattlesnakes (Borja *et al.*, 2018; Castro *et al.*, 2013; Tasoulis & Isbister, 2017). The presence of molecular weights in the $50\text{--}75\text{ kDa}$ and $20\text{--}25\text{ kDa}$, as well as the absence of molecular weights under $\sim 10\text{ kDa}$, are similar to the adult Mexican black-tailed rattlesnake (*C. m. nigricens*) venom reported by Borja and others (Borja *et al.*, 2018).

Additionally, the three main protein bands (A, B, and C) were analyzed by LC-MS/MS. Table 1 shows the two identified proteins by MS/MS spectra analysis of the tryptic digest of band A using two search engines (Spectrum Mill and Mascot). These proteins were the Zinc disintegrin-like metalloproteinase (VAP2A) that belongs to the P-III SVMPs toxin family. Also, this band contained more than one protein, L-amino acid oxidase (Apoxin I) was also identified. SVMP HT-2 metalloproteinase that belongs to the P-I SVMPs toxin family with a relative mass of $\sim 30\text{ kDa}$ was identified in the band B. Lastly, a Phospholipase A₂ with a relative mass of $\sim 16\text{ kDa}$ was identified in band C. Borja *et al.* reported that the venoms of 20/27 of the studied specimens of *C. m. nigricens* presented bands with a similar mass to that of the identified PLA₂ (Borja *et al.*, 2018).

In previous reports, it has been found that some of the toxin families found in the *C. m. molossus* venom, like SVMPs and PLA₂s, have cytotoxic effects in different tumoral cell lines (Calderon *et al.*, 2014; Tang *et al.*, 2004; Boldrini-França *et al.*, 2020; Marinovic *et al.*, 2017; Du & Clemetson, 2002; Rivas-Mercado & Garza-Ocañas, 2017). A P-III snake venom metalloproteinase (SVMP) was identified in band A figure 1; this band may contain another protein. VAP2A, also known as vascular apoptosis-inducing protein 2A, is a P-III type SVMP first described by Masuda and others (Masuda *et al.*, 1998). It can induce apoptosis in vascular endothelial tissue (Masuda *et al.*, 1998). It has been previously proposed a possible therapeutic use for this toxin due to its properties to inhibit angiogenesis, a vital process for tumoral cell growth (Masuda *et al.*, 1998). SVMPs usually cause hemorrhagic symptoms in clinical patients through blood coagulation changes or interaction with the extracellular matrix (ECM) components, such as collagen, laminin, and fibronectin (Calderon *et al.*, 2014). The formation of new blood vessels has been reported with the action of matrix metalloproteinases/ADAM proteins and in cell-cell/cell-ECM adhesion (Calderon *et al.*, 2014). Thus, the action of SVMPs takes an exciting role in the possible antitumoral effect by inhibiting tumoral growth, as well as tumoral adhesion. The latter is because some SVMPs have been reported to interact with important receptors that mediate metastasis and cell migration (Calderon *et al.*, 2014; Arvelo & Corte, 2006; Kamiguti *et al.*, 1998; Gutiérrez & Rucavado, 2000). The similarity that the SVMPs and mammalian matrix metalloproteinases (MMPs) have opens the possibility that these snake venom toxins may be used as potential therapeutic targets or agents against cancer (Calderon *et al.*, 2014; Tang *et al.*, 2004; Alaseem *et al.*, 2019).

Apoxin I is an L-amino acid oxidase (LAAO), was also identified in band A Fig. 1. Apoxin I has been de-

Table 1. Venomic analysis of the *C. m. molossus* venom through Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS).

Electrophoretic band	ID Code (UniProt)	Organism	Protein	Toxin Family	Molecular mass (kDa)
A	A4PBQ9	<i>Crotalus atrox</i>	Zinc disintegrin-like metalloproteinase (VA-P2A)	P-III SVMP	65.854
	P56742	<i>Crotalus atrox</i>	L-aminoacid oxidase (Apoxin I)	LAAO	56.737
B	P20897	<i>Crotalus ruber</i>	SVMP HT-2 metalloproteinase (Ruberlysin)	P-I SVMP	23.321
C	ANN23923	<i>Crotalus molossus</i>	Phospholipase A ₂ (Phospholipase A2_2)	PLA ₂	16.251

scribed as an apoptosis-inducing factor, considered one of the causes of hemorrhagic symptoms in rattlesnake-bite patients (Torii *et al.*, 1997). Several biological effects have been attributed to the action of this toxin, such as edematogenic processes, hemolysis, antibacterial and anti-parasitic activity, and regulation of platelet aggregation (Torii *et al.*, 1997, 2000). Although the LAAOs mechanisms' have not been fully comprehended, it has been hypothesized that their interaction with different cell receptors can increase hydrogen peroxidase (H₂O₂) levels in cell membranes. High peroxidase levels due to oxidative processes may induce apoptosis in different cell lines, such as human embryonic cells (293T), human promyelocytic leukemia cells (HL-60), rat lymphocytic leukemia cells (L1210), and human leukemia cells (Torii *et al.*, 1997; Calderon *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2003; Samel *et al.*, 2006; Suhr & Kim, 1996). Apoptosis induction from this toxin is a polemic one within the scientific community. Although it has been reported that it is related to the rise in peroxide levels, reports have shown that it is not the only reason (Calderon *et al.*, 2014; Suhr & Kim, 1996; DiPietrantonio *et al.*, 1999) and thus, further research is necessary.

Ruberlysin, a P-I SVMP, was identified in band B figure 1. It has been reported that ruberlysin induces local hemorrhages by acting within blood vessels' inner walls (Takeya *et al.*, 1990). As has been mentioned before, SVMPs can interfere with components in the ECM (Calderon *et al.*, 2014). Ebrahimian evaluated its capacity to induce apoptosis in Neuro-2a, neuroblastoma cell line, alongside other toxins from the red diamondback rattlesnake (*Crotalus ruber*) (Ebrahimian, 2013).

Finally, A2_2 phospholipase was identified in band C figure 1, as its name suggests it is an A₂ type phospholipase (PLA₂). PLA₂s have a wide diversity of biological effects, such as inducing neurotoxicity and myotoxicity and play essential roles in lipid metabolism (Calderon *et al.*, 2014). PLA₂s activity is highly related to the metabolism of cell membranes. Different types of PLA₂s, such as basic and acidic, have shown antitumoral and antiangiogenic activity *in vitro* and *in vivo*, suggesting a new approach for developing antitumoral agents (Calderon *et al.*, 2014). Modahl and Mackessy (Modahl & Mackessy, 2016) described in their extensive study that the *C. molossus* venom presented three different isoforms of PLA₂s. Amongst those different isoforms, they reported sequences belonging to neurotoxic and myotoxic PLA₂s. For example, Crotoxin B is a ~14 kDa PLA₂ neurotoxin that binds and activates cell receptors in the cell membrane, thus interfering with the epidermal growth factor, inhibiting tumoral growth (Calderon *et al.*, 2014; Corin *et al.*, 1993). Borja and others (Borja *et al.*, 2018) reported more presence of crotoxin-like toxins in the venom from young Mexican black-tailed rattlesnakes, *C. m. nigrescens* (Borja *et al.*, 2018). These crotoxin-like toxins had an average molecular mass of ~10 kDa (Borja *et al.*, 2018a). In our study, the smallest toxin observed in the

electrophoretic gel had a relative mass of ~16 kDa, associated with PLA₂s. In this case, more studies and research are needed for the complete profiling of the *C. m. molossus* in the northwestern region.

Hemolytic Activity of *C. m. molossus* venom. The red blood cells (RBCs) are the most abundant in the blood and are in continuous contact with exogenous compounds; therefore, the HA of the venom of *C. m. molossus* was evaluated. Values obtained below 10% hemolysis can be considered non-hemolytic, while those equal to or higher to 25% are hemolytic (Amin & Dannenfelser, 2006). The snake venom was slightly hemolytic at the higher concentrations evaluated (0.75–3 mg/mL) and non-hemolytic below those (Fig. 2). Water-treated RBCs were used as the positive control and PBS as the negative one for hemolysis.

Some of the clinical symptoms of rattlesnake bite envenomation include proteolytic activity such as fibrinolysis, hemolysis, or platelet aggregation (Meléndez-Martínez *et al.*, 2017). As observed in the black-tailed rattlesnake venom HA assay (Fig. 2), *C. m. molossus* venom was not hemolytic at concentrations below 0.75 mg/mL. Contrary to what we observed, Macías-Rodríguez and others (Macías-Rodríguez *et al.*, 2014) compared the HA of the venom of two subspecies of *C. molossus*, *C. m. nigrescens* and *C. m. molossus*, and reported that both presented HA. Borja and others (Borja *et al.*, 2018a) reported ontogenetic differences in the venom composition of *C. m. nigrescens*, where juvenile specimens had a more neurotoxic-like venom, and adults had a more hemorrhagic-like one. The snakes used in this study were adults, and it is noteworthy to consider the last since different ages between these snakes could provide different venom compositions,

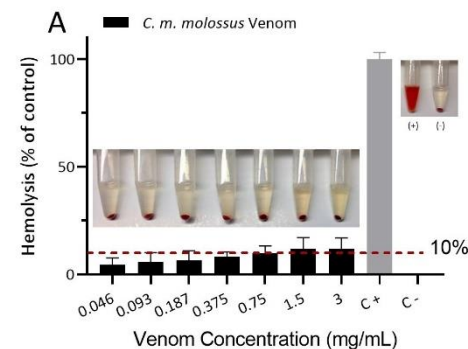


Figure 2. Hemolytic activity (HA) of the *C. m. molossus* venom. Lower tested concentrations of the venom were slightly hemolytic, while higher ones tested were hemolytic. Water treated RBCs were used as the positive control; data represents means and \pm standard deviation from triplicates.

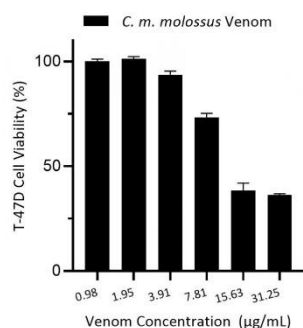


Figure 3. MTT cell viability assay was performed with different concentrations of *C. m. molossus* venom.

An IC_{50} value of 15.45 µg/mL was determined. Cell viability was lowered by >60% at 31.25 µg/mL; data represents means and \pm standard deviation from triplicates.

thus, different results in these types of assays. Thus, having a < 0.75 mg/mL venom concentration could help avoid the HA observed at higher concentrations. Additionally, the black-tailed rattlesnake venom was evaluated for cytotoxic activity against the T-47D breast carcinoma cell line.

***C. m. molossus* Venom Tumoral Cytotoxic Activity.** MTT assays were performed to determine the cytotoxic activity of the black-tailed rattlesnake venom in the T-47D breast carcinoma cell line. We observed a significant diminish of T-47D cells viability provoked by the snake venom toxins (Fig. 3). The IC_{50} of the venom was 15.45 ± 0.93 µg/mL. As expected, the lowest tumoral cell viability, ~36%, was observed at the highest venom concentration used, 31.25 µg/mL, well below the HA concentrations shown in figure 2. Thus, we confirmed that the venom of the black-tailed rattlesnake (*C. m. molossus*) presents cytotoxic activity in the T-47D breast carcinoma cell line.

Tasoulis and Isbister (Tasoulis & Isbister, 2017) reviewed different snake venoms contents from the world's prominent medically necessary snake families. They concluded that three main toxin families (SVMPs, SVSPs, and PLA₂) are found in the Viperinae snake sub-family venoms, where the genus *Crotalus* is located. Meléndez-Martínez and others (Meléndez-Martínez *et al.*, 2017) reported that *C. molossus* venom contained several different toxin families, including the aforementioned. In their review, Calderon and others (Calderon *et al.*, 2014) described the different mechanisms by which many snake venom toxins present tumoral cytotoxic effects. A lower T-47D breast carcinoma cell viability was observed at higher concentrations of *C. m. molossus* venom. Our study shows an IC_{50} value of 15.45 µg/mL (Fig. 3). Different venom compositions could change the outcome of these types of tests, and said compositional changes might happen due to ontogenetic changes (Borja *et al.*, 2018a), geographical range (Borja *et al.*, 2018a; Borja *et al.*, 2018b) and, not as common as the aforementioned, sex (Borja *et al.*, 2018a; Furtado *et al.*, 2006).

Considering the identified toxins (Table 1), we infer that the cytotoxic activity observed in the MTT assays is due to the action of the different SVMPs, LAAO and PLA₂ found. As mentioned before, SVMPs can interact with components of the ECM and produce apoptosis in vascular endothelial cells (Masuda *et al.*, 1998; Calderon *et al.*, 2014; Takeya *et al.*, 1990; Chellapandi,

2014), thus, inhibiting tumoral proliferation and reducing angiogenesis. On the other hand, LAAOs have been reported to produce high concentrations of H₂O₂, hydrogen peroxide by interacting with different cell membrane receptors (Calderon *et al.*, 2014; Torii *et al.*, 1997). LAAOs from different rattlesnake species like *C. adamanteus* and *C. atrox* have been reported to act specifically with mammalian endothelial cells (Calderon *et al.*, 2014; Suhr & Kim, 1996; Du & Clemetson, 2002) as it was mentioned above. PLA₂s have been reported with antitumoral and antiangiogenic activity. Commonly, their interactions with different cell membrane receptors in membrane lipids have shown inhibition in tumoral growth and cell adhesion (Calderon *et al.*, 2014; Chwetzoff *et al.*, 1989). Additionally, the observed IC_{50} of the snake venom was 15.45 ± 0.93 µg/mL, a much lower concentration than that of the recommended use in section 3.1.2. More studies are required to observe how these toxins interact with the T-47D breast carcinoma cells. Once the venom was characterized and evaluated, venom-loaded polymeric nanoparticles were obtained and evaluated.

Cs-Venom Nanoparticles

In this research, the black-tailed rattlesnake venom was entrapped into a Cs nanoparticle system using TPP as a crosslinking agent by ionotropic gelation.

Formation of Nanoparticles. Cs-Venom NPs were obtained spontaneously by the addition of the TPP-Venom solution to the Cs solution. It is known that the mechanism of Cs-TPP ionotropic gelation is driven by the process of intra- and intermolecular linkages, which is promoted by amine groups of chitosan and the negatively charged species of TPP (Calvo *et al.*, 1997; Pedroso-Santana & Fleitas-Salazar, 2020; Rampino *et al.*, 2013; Fernández-Quiroz *et al.*, 2019).

Results for different formulations are shown in Table 2. Cs-Blank NPs were obtained with a hydrodynamic size (D_H) of 506 nm. These values are slightly higher than those reported for similar nanoparticle systems (Goycoolea *et al.*, 2009). These results may be due to the molecular characteristics of the polysaccharides, such as molecular weight and degree of deacetylation of Cs.

Table 2. Different formulations of Cs NPs with and without venom.

	Cs-Blank NPs	Cs-Venom NPs
D_H (nm)	506.4±14.05	415.9±21.67
PDI	0.47±0.01	0.44±0.03
ζ -potential	27.3±1.65	28.3±1.17

Data are means and \pm standard deviation for triplicate.

Cs-Venom NPs exhibited a positive ζ -potential, which suggests the presence of a shell of chitosan in the formulations. The formulation exhibited a D_H of ~415 nm and a ζ -potential of ~28 mV (Table 2). The decrease in the size of venom-loaded NPs concerning the blank NPs is shown. The electrostatic forces between the venom extract and chitosan are the dominant interaction in this system. The venom extract used for the preparation of nanoparticles may provide the presence of a polypeptide mixture, which may lead to additional intra- or inter-molecular interactions. Hence the decrease in particle size.

The encapsulation efficiency (EE%) of the venom entrapped in the Cs-Venom-NPs was determined

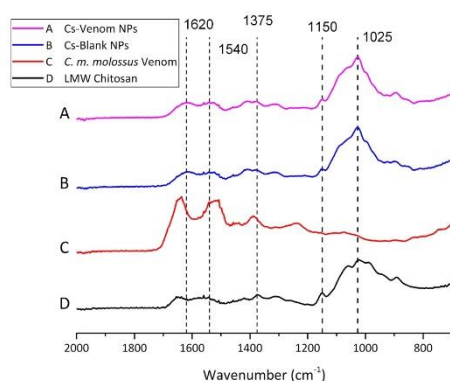


Figure 4. FTIR analysis of venom-loaded (A) and blank (B) NPs, as well as their main individual components, (C) *C. m. molossus* venom, (D) LMW Chitosan.

through a Bradford protein stain microplate protocol. The EE% was $48.29 \pm 3.84\%$. Soares and others (Soares *et al.*, 2018) entrapped the snake venom of two different viperids, *Bothrops erythromelas* and *B. jararaca*, achieving an EE% of over 65% of both venoms with a Cs-TPP NP system. Goycoolea and others (Goycoolea *et al.*, 2009) were able to achieve an EE% of up to 41–52% for insulin, using a hybrid Cs-ALG NP system, they suggested that the electrostatic interactions given between the Cs and insulin were the most dominant, nevertheless, other interactions should also be considered.

ATR-FTIR Analysis. FTIR analysis was performed to evaluate the molecular composition of the obtained products. Figure 4 shows the spectra of Cs-Venom NPs (A) as well as Cs-Blank NPs (B) and their main individual components, *C. m. molossus* venom (C) and LMW Cs (D). There are apparent differences between the spectra obtained from the NPs and their main individual components. The signals observed at 1540 cm^{-1} and 1620 cm^{-1} in the venom-loaded and blank NPs (A and B) spectra correspond to the Amide I and Amide II bands of chitosan (Soares *et al.*, 2018), respectively. A slight shift from a small peak at 1640 cm^{-1} from LMW chitosan (D) to 1620 cm^{-1} (A and B) is observed. Additionally, LMW chitosan and both NPs show the characteristic 1375 cm^{-1}

corresponding to $-\text{CH}_3$ symmetrical deformation vibration of chitosan.

Soares and others (Soares *et al.*, 2018) reported the FTIR spectra of Cs-TPP NPs entrapping the snake venom of *B. erythromelas* and *B. jararaca*. They mentioned how the interaction between the NP components and the snake venom might result in band shifts and separation of the absorption bands. They observed a shift in the C=O primary (1540 cm^{-1}) and secondary (1640 cm^{-1}) protein bands. In contrast with our results, there was no apparent shift in said bands (A and B), but a slight shift from 1640 cm^{-1} to 1620 cm^{-1} is noticed. Additionally, the peaks corresponding to the C-N stretches of chitosan's primary and secondary amines can be observed at 1025 cm^{-1} and 1150 cm^{-1} , respectively, in A, B, and D (Coates, 2000). These results confirm the Cs-TPP conjugation (Mohammadpourounighi *et al.*, 2010). There was no difference between the spectra of blank and venom-loaded NPs (A and B) in our study. The last could be attributed to the relatively low penetration capacity of the ATR mode used. There are noticeable differences between the pristine components (C) and the obtained NPs (A and B).

NPs Morphology. The morphology of the venom-loaded and blank NPs was observed through atomic force microscopy (AFM) (Fig. 5). Figure 5A, Cs-Blank NPs presented a smooth surface, semi-spherical shape, and $\sim 500 \text{ nm}$ of size. Similarly, in Figure 5B, Cs-Venom NPs showed a smooth surface, a semi-spherical shape, and an estimated size of $\sim 400 \text{ nm}$.

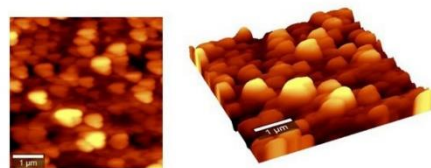
Similar to other studies that also entrapped snake venom within Cs NPs, our venom-loaded NPs presented a smooth surface and semi-spherical shaped morphology (Fig. 5 A and B) (Soares *et al.*, 2018). Naser and others (Naser *et al.*, 2015) observed that the interaction of scorpion venom with the Cs chains could increase the NP size, although no increase in size was observed with our NPs, as confirmed by the DLS data in Table 2.

Hemolytic Activity of Venom-loaded NPs

HA assays were performed with Cs-Venom NPs to study their behavior with RBC. It can be observed (Fig. 6) that, similarly to the HA observed in Fig. 2, the higher concentrations ($0.75\text{--}3 \text{ mg/mL}$) were slightly hemolytic, whereas the lower ones were not. The entrapment of the venom within the Cs matrix may protect the RBCs; hence, further studies are required.

Zhou and others (Zhou *et al.*, 2015) studied the hemocompatibility of Cs dendrimers and Cs alone, and they reported that at 50 and $100 \text{ }\mu\text{g/mL}$, the Cs dendrimers induced higher hemolysis than Cs alone. Their study

A. Cs-Blank NPs



B. Cs-Venom NPs

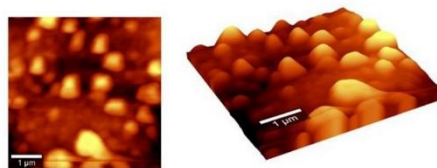


Figure 5. 2D and 3D AFM images of blank and venom-loaded NPs.

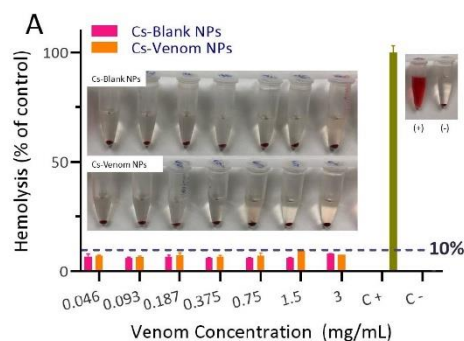


Figure 6. Hemolytic activity (HA) venom-loaded and blank NPs. Cs-Venom NPs were not hemolytic, specially at lower concentrations <0.187 mg/mL. PBS and water were used as (-) and (+) control, respectively. Data are means and \pm standard deviation for triplicate.

reported a 2%<HA<5% indicating that they were non-hemolytic. In the present work, the results show that the Cs-Venom NPs were slightly hemolytic (HA>10%) at high concentrations (Fig. 6). In the same way, the Cs-Blank NPs were slightly hemolytic (HA>10%) at high concentrations (Fig. 6). The venom from the black-tailed rattlesnake, *C. molossus*, has been previously reported as more hemolytic than the western diamondback rattlesnake, *C. atrox*, or the tiger rattlesnake, *C. tigris*, due to its capacity to degrade fibrinogens and collagen (Meléndez-Martínez *et al.*, 2017). Although the venom of *C. molossus* has been previously studied, even more studies are required to establish isolated toxins or whole venom to be used as possible pharmaceutical agents. Although the venom-loaded NPs have toxins that may interact with RBC membranes or components of the ECM, there was not enough decrease in the RBC viability to be labeled as hemolytic (HA>10%). Hence, the latter suggests that

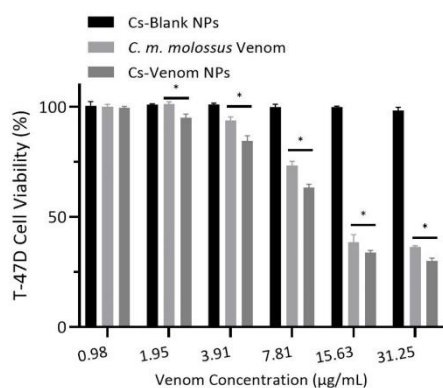


Figure 7. MTT assays were performed with Cs-Blank and Cs-Venom NPs. *C. m. molossus* venom and Cs-Venom NPs were both able to lower the cell viability of the T-47D breast carcinoma cells by >60% at 31.25 μ g/mL. *Are shown for statistical differences ($p < 0.005$).

the evaluated concentrations of NPs formulations do not produce hemolysis.

Venom-Loaded NPs Tumor Cytotoxic Activity.

The tumoral cytotoxic activity was analyzed through MTT assays. As observed (Fig. 7), the Cs-Venom NPs inhibit the cell viability, down to $\sim 30\%$. Additionally, the Cs-Blank NPs did not inhibit the cell viability of the T-47D breast carcinoma cell line. Significant differences were found between the snake venom *vs.* Cs-Venom NPs' cytotoxic effect in a 2-way ANOVA followed by Sidak's multiple comparison test.

Cs has been firmly established as a biocompatible and low toxic polymer (Calvo *et al.*, 1997; Goycoolea *et al.*, 2009; Soares *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2017); nevertheless, Carreño-Gómez and Duncan (Carreño-Gómez & Duncan, 1997) reported cytotoxic activity of different Cs salts, being time and exposed concentration the most important factors for it. In another study by Zaki and others (Omar Zaki *et al.*, 2015), it was reported that for Cs-TPP NPs, size and concentrations were determinant factors in the obtention of cytotoxic activity *in vitro*. Our results show, as expected, no apparent cytotoxic activity from the Cs-Blank NPs, having average cell viability of $100.08 \pm 0.99\%$ for all analyzed concentrations. The Cs-Venom NPs could decrease the cell viability of the T-47D breast carcinoma cell line (Fig. 7). A decrease to $30.03 \pm 1.27\%$ viability was obtained at the highest Cs-Venom NP concentration (31.25 μ g/mL). It is noteworthy that all the concentrations used with the Cs-Venom NPs were significantly different and lower than the cell viability obtained by the whole venom. The last indicates a possible potentiating effect of the polymer matrix, similar to what was reported for other pharmaceuticals (Tran *et al.*, 2017; Aftab *et al.*, 2018). Biswas and others (Biswas *et al.*, 2012) and Al-Sadoon and others (Al-Sadoon *et al.*, 2013) had already reported the possible use of combined nanostructure alongside snake venom for pharmaceutical use. As reported elsewhere, the toxins herein identified (SVMPs, LAAO, and PLA₂) have been previously described as potential pharmaceutical agents, inhibiting tumoral growth and inducing apoptosis (Calderon *et al.*, 2014; Suhr & Kim, 1996; Chellapandi, 2014; Al-Sadoon *et al.*, 2013; Badr *et al.*, 2013; Park *et al.*, 2009). Our results indicate a potentiating effect of the snake venom entrapped within the Cs NPs, hence lower cell viability. As indicated before, snake venoms have been reported as exciting and promising tools for pharmaceutical research (Calderon *et al.*, 2014; Park *et al.*, 2009; Azevedo *et al.*, 2016; Chwetzoff *et al.*, 1989; Mohammadpourounighi *et al.*, 2010), and, we were also able to confirm that the cytotoxic effect was produced by the entrapped venom and not the Cs NPs by themselves (Fig. 7). More studies are required to confirm any possible effect between the proteins encapsulated within the matrix and evaluate the safety of their use on *in vivo* models.

Fluorescence Intensity Assays

Fluorescence intensity (FI) assays were performed to observe the effects of the free *C. m. molossus* venom and the Cs-Venom NPs, in the T-47D breast carcinoma cells. The venom of the *C. m. molossus* and Cs-Venom NPs (Fig. 8) lowered the FI of rhodamine 123, generally associated with cell death due to a compromised cell membrane (Darzynkiewicz *et al.*, 1982). Additionally, there were significant differences be-

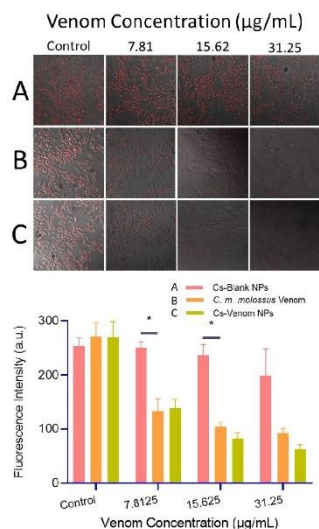


Figure 8. Fluorescence intensity assays were performed with the black-tailed rattlesnake (*C. m. molossus*) venom, Cs-Venom NPs, and Cs-Blank NPs stained with Rhodamine.

A decrease in fluorescence intensity indicates the death of cells. *Are shown for statistical differences ($p < 0.005$). No significant differences were observed between the snake venom and Cs-Venom NPs.

tween the FI of the Cs-Blank NPs and snake venom and Cs-Venom NPs.

Several studies have shown how some snake venom toxins have specific interactions at cell membranes. Suhr and Kim (Suhr & Kim, 1996) reported how some LAAOs presented specificity, and thus, they observed different cytotoxic levels for different cell lines. It can be observed in Fig. 8, that the venom significantly affects cell morphology, and as reported elsewhere, this could be due to the specific action of certain toxins like SVMs, LAAOs, and PLA_s, like the ones in Table 1. Park and others (Park *et al.*, 2009) reported the morphology changes and apoptosis induction in SK-N-MC and SK-N-SH, neuroblastoma cells, after *Vipera lebetina* snake venom internalization. These changes were probably caused by reactive oxygen species (ROS), due to rupture in the cell's membrane potential (Park *et al.*, 2009) or pore formation due to PLA_s (Chwetzoff *et al.*, 1989; Cummings, 2007; Gutiérrez & Lomonte, 1995). Our results show clear and noticeable morphological changes consistent with the MTT cytotoxicity assays, where cell viability of ~30% was observed at a venom concentration of 31.25 µg/mL (Figs 3 and 7).

In contrast with the Cs-Blank NPs (Fig. 8), no distinctive morphology changes were observed. The data obtained through the MTT assay of said NPs (Fig. 7) shows no apparent cytotoxic effect of the blank NPs. The FI assay shows that the Cs-Venom NPs could deliver the venom of *C. m. molossus* inside them. This study has contributed to the development of new potential anti-cancer drugs. The use of snake venom against tumor cells could be a viable option to treat this type of disease, as supported by the presented data.

CONCLUSIONS

It was demonstrated that the northern black-tailed rattlesnake (*C. m. molossus*) venom (formed majorly by VAP2A, Ruberlysin, Aproxin I, and Phospholipase A₂) maintains cytotoxic activity against the T-47D breast carcinoma cell line after a chitosan NPs synthesis process. Cs-Venom (EE% of 48.29%) NPs presented a smooth and semi-spherical morphology with an average size of ~415 nm and ζ -potential of +28 mV. Cs-Venom NPs did not have hemolytic activity in human RBC (HA < 10%), especially at lower concentrations [0.187 mg/mL]. FI assays showed that the snake venom and Cs-Venom NPs both induced changes in cell morphology by compromising the cell mitochondria membrane potential. Although more research and data are required, for our results, the black-tailed rattlesnake (*C. m. molossus*) venom-loaded in the chitosan polymeric NPs appears to be a promising candidate to be researched for cancer pharmaceuticals.

Conflicts of interest

Authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgments

We would like to thank the director of the Museo Itinerante de Vida Animal (MIVIA) from Hermosillo, Sonora, Mexico; Gerardo Lorenzo Acosta-Campaña, for the exhaustive and never-ending support with snake venom extractions. We would like to thank Dr. José Ángel Huerta Ocampo and Dr. Sergio Gerardo Hernández-León for all the technical support and knowledge, as well as the students in the Laboratorio de Física Médica from the University of Sonora for their technical support and advice. We would also like to thank the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) for supporting the scholarship grant to the postgraduate student J.J.-C. (No. 494554). We also thank the Centro de Investigación en Alimentos y Desarrollo, A. C., and Universidad de Sonora for the provided facilities.

REFERENCES

- Aftab S, Shah A, Nadhman A, Kurbanoglu S, Aysel Ozkan S, Dionysiou DD, Shukla SS, Aminabhavi TM (2018) Nanomedicine: An effective tool in cancer therapy. *Int J Pharmaceutics* **540**: 132-149. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.02.007>
- Agarwal S, Mohamed MS, Mizuki T, Maekawa T, Kumar DS (2019) Chlorotoxin modified morusin-PLGA nanoparticles for targeted glioblastoma therapy. *J Mater Chem B* **7**: 5896-5919. <https://doi.org/10.1039/C9TB01131E>
- Ahmed TA, Aljaeid BM (2016) Preparation, characterization, and potential application of chitosan, chitosan derivatives, and chitosan metal nanoparticles in pharmaceutical drug delivery. *Drug Des Del Ther* **10**: 483-507. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S99651>
- Alaseem A, Alhazzani K, Dondapatu P, Alobid S, Bishayee A, Rathinavelu A (2019) Matrix Metalloproteinases: A challenging paradigm of cancer management. *Seminars Cancer Biol* **56**: 100-115. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2017.11.008>
- Al-Sadoon MK, Rabah DM, Badr G (2013) Enhanced anticancer efficacy of snake venom combined with silica nanoparticles in a murine model of multiple human myelomas: Molecular targets for cell cycle arrest and apoptosis induction. *Cell Immunol* **284**: 129-138. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2013.07.016>
- Amin K, Dannenfelser R M (2006) In vitro hemolysis: Guidance for the pharmaceutical scientist. *J Pharm Sci* **95**: 1173-1176. <https://doi.org/10.1002/jps.20627>
- Argüelles-Monal WM, Lizardi-Mendoza J, Fernández-Quiroz D, Recillas-Mota MT, Montiel-Herrera M (2018) Chitosan derivatives: introducing new functionalities with a controlled molecular architecture for innovative materials. *Polymers* **10**: 342. <https://doi.org/10.3390/polym10030342>
- Arvelo F, Cotte C (2006) Metalloproteinases in tumor progression. *Review. Invest Clin* **47**: 185-205

El potencial farmacológico de venenos de serpientes de Sonora, México

The Pharmaceutical Potential of Snakes Venoms Sonora, Mexico

EPISTEMUS
ISSN: 2007-8196 (electrónico)

Jorge Jiménez Canale¹
Enrique Fernando Velázquez Contreras²
José Andrei Sarabia Sainz³

Recibido: 25 / 05 / 2022
Aceptado: 7 / 10 / 2022
Publicado: 24 / 11 / 2022
DOI: <https://doi.org/10.36790/epistemus.v16i33.226>

Autor de Correspondencia:
José Andrei Sarabia Sainz
Correo: jose.sarabia@unison.mx

Resumen

Los venenos son mezclas complejas de biomoléculas producidos en glándulas especializadas en diversas plantas o animales. Se ha reportado que los componentes mayoritarios de dichos venenos son péptidos y proteínas; los cuales son principales causantes de los síntomas clínicos derivados de un piquete/mordedura. Adicionalmente, por razones culturales y médicas, las serpientes son, probablemente, los animales venenosos más representativos. Entre estos animales, las serpientes de cascabel son altamente temidas y en muchos casos sus venenos han sido poco estudiados. En el estado de Sonora, México se han descrito 12 especies de serpientes de cascabel, todas consideradas altamente venenosas ya que su mordedura requiere atención médica. En ese sentido, se ha reportado que componentes del veneno de estas especies presentan actividad antibacteriana, anticancerígena, entre otras. En este artículo describimos brevemente que los venenos de algunas serpientes sonorenses contienen prometedores componentes de alta importancia farmacéutica y biotecnológica y por qué deberíamos prestarles atención.

Palabras clave: serpientes, Venenos, Farmacología, Nanotecnología, Nanomedicina .

Abstract

Venoms are complex biomolecules mixtures that are produced in specialized glands in several plants or animals. It has been reported that peptides and proteins are the venoms' major components and are responsible for most of the clinical symptoms derived from a sting/bite. Additionally, snakes are probably the most representative venomous animals, due to cultural and medicinal reasons. Among these, rattlesnakes are highly feared, and in many cases, their venoms have been poorly studied. In the state of Sonora, Mexico, 12 species of rattlesnakes have been described, all considered as highly venomous since their bite requires medical attention. It has been reported that some of these species venoms' components present antibacterial and anticancer activity, among many others. In the present work, we briefly describe how some of these venom components found in the venoms of Sonoran rattlesnakes, are of high pharmaceutical and biotechnological importance and should be paid attention.

Keywords: snakes, Venoms, Pharmacology, Nanotechnology, Nanomedicine.

¹ Dr, Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales, Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora, México, jorgejimzc@gmail.com, 0000-0001-8430-763X.
² Dr, Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales, Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora, México, enrique.velazquez@unison.mx, 0000-0001-6023-0180.
³ Dr, Departamento de Investigación en Física, Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora, México, jose.sarabia@unison.mx, 0000-0003-0800-4754.

INTRODUCCIÓN

Existen distintos organismos capaces de producir sustancias nocivas o tóxicas a la salud que conocemos comúnmente como venenos. Un veneno se define como una mezcla compleja, compuesta en su mayoría por péptidos y proteínas [1], la cual es producida en una glándula especializada. Algunos arácnidos (escorpiones y arañas), ciertos insectos como abejas y avispas, y algunas especies de serpientes son capaces de producir venenos [2].

En México, las serpientes son animales sumamente estigmatizados por múltiples razones, entre ellas religiosas y culturales. De manera similar, un mal manejo de su información y percepción en medios de comunicación ha influido en una percepción negativa hacia ellas [3]. Por otro lado, las serpientes en México también son animales emblemáticos. Forman una parte importante de la mitología mexicana y, también del Escudo Nacional y Bandera de México. Adicionalmente, el país ocupa el primer lugar a nivel mundial en diversidad de serpientes, ya que alberga más de 400 especies. Ello representa una cifra muy importante considerando que se han descrito poco menos de 4000 especies en todo el mundo [4].

México es el segundo país con mayor número de especies de serpientes de importancia médica (su mordedura requiere atención médica). Estas se distribuyen en 2 familias, Viperidae con 76 y Elapidae, con 17 especies respectivamente [4]. En ese sentido, dentro de la familia Viperidae encontramos a las serpientes de cascabel con 47 especies descritas en el país, 45 del género *Crotalus* spp., y 2 *Sistrurus* spp.

En México y Centroamérica, la familia de serpientes de mayor importancia médica, por la cantidad de accidentes que causan y la pronta acción de su veneno, es la familia Viperidae. En la figura 1 se muestra una adaptación evolutiva sumamente peculiar de especímenes de la familia Viperidae: la foseta loreal, estructura termosensora que les

ayuda a identificar a sus presas. Adicionalmente, los vipéridos cuentan con glándulas productoras de veneno y colmillos hipodérmicos conectados a ellas. Por otro lado, las serpientes de cascabel se diferencian fácilmente de otros vipéridos por la presencia de un apéndice queratinoso sonoro localizado al final de la cola, la cual se conoce coloquialmente como un "cascabel" [5].

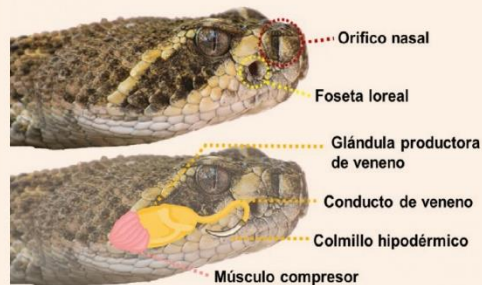


Figura 1. Imagen de cabeza de serpiente de la familia Viperidae donde se señalan el orificio nasal, foseta loreal y glándula productora de veneno. Fotografías por Jorge Jiménez Canale.

serpientes en sonora

En Sonora sobresale la presencia de las serpientes de cascabel. De las 75 especies de serpientes reportadas en el estado, solamente 16 especies se consideran de importancia médica, 12 de las cuales son serpientes de cascabel (*Crotalus* spp, familia Viperidae). Las otras especies son *Agkistrodon* sp.(familia Viperidae) y *Micruroides euryxanthus*, *Micrurus distans* e *Hydrophis platurus* (familia Elapidae). En la figura 2, se observan algunas especies de serpientes de cascabel que se encuentran en el estado de Sonora [6].





Figura 2. Serpientes de cascabel presentes en el Estado de Sonora: A. Serpiente de cascabel diamante del Oeste (*C. atrox*) B. Serpiente de cascabel cola negra (*C. molossus*) C. Serpiente de cascabel de cuernitos (*C. cerastes*) D. Serpiente de cascabel de Mojave/Altiplano (*C. scutulatus*) E. Serpiente de cascabel tigre (*C. tigris*). Fotografías por Jorge Jiménez Canale.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que al año ocurren ~5.4 millones de mordeduras de serpientes, las cuales llegan a causar de 80 000 a 137 000 muertes [7]. El panorama en México es un poco distinto, registrándose ~4000 mordeduras, con una tasa de fatalidad del 0.5%. Específicamente para el caso del Estado de Sonora suelen reportarse ~100 mordeduras al año [8]. En ese sentido, científicos han buscado desarrollar antivenenos más baratos, eficaces y accesibles. Para ello, es de trascendental importancia conocer la composición y propiedades de los venenos de las serpientes [9], [10].

Estudios recientes han demostrado que los venenos de especies de serpientes, incluyendo las mexicanas, comparten la presencia de familias de toxinas [11]. En la figura 3 se muestra una representación de la abundancia de las familias de toxinas en serpientes de cascabel del género *Crotalus* spp. Entre estas toxinas destacan como familias dominantes las fosfolipasas A2 (PLA₂s), metaloproteasas (SVMPs) y serinoproteasas (SVSPs). Asimismo, proteínas secretoras ricas en cisteína (CRiSPs), L-aminoácido oxidasas (LAAOs), lectinas de tipo C (CTLs/snaclecs), disintegrinas (DIS) y péptidos natriuréticos (NPs) [1].

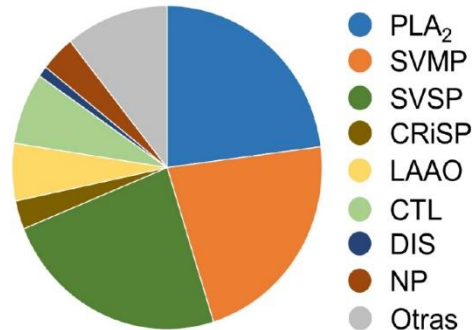


Figura 3. Composición venómica de serpientes de cascabel (*Crotalus* spp.). Imagen modificada de Tasoulis & Isbister, 2017 [1].

Se presume que esta representación va a cambiar rápidamente conforme se avance en el estudio de los venenos de las distintas especies. Los avances en las investigaciones sobre las propiedades tóxicas de las sustancias que se encuentran en los venenos de serpientes han permitido descubrir que, utilizadas en cantidades y formas definidas, pueden tener usos terapéuticos contra diversas enfermedades, incluidos diversos tipos de cáncer [12]. Dada la abundancia de las serpientes de cascabel en el Estado de Sonora, resulta de especial interés estudiar la composición y propiedades de sus venenos, así como su posible aplicación como agentes terapéuticos. Por tal motivo, en el presente artículo nos enfocaremos en los avances que se han realizado en la caracterización de los venenos de serpientes de cascabel sonorenses, enfatizando los estudios para el desarrollo de fármacos.

Composición de venenos de serpientes de cascabel sonorenses

Como se mencionó anteriormente, en el estado de Sonora, México se han descrito 13 especies de vipéridos, de las cuales 12 de ellas son serpientes de cascabel (*Crotalus* spp.). En la tabla 1, se enlistan dichas especies y algunas familias de toxinas que se han reportado se encuentran en sus venenos. En la figura 4 se muestra de manera general el proceso habitual de extracción de veneno de una serpiente, el cual es necesario para el estudio de sus venenos. De forma breve, las serpientes se introducen dentro de un tubo de plástico para evitar movimientos bruscos y controlar la zona de la cabeza de donde son sujetadas, esto reduce el riesgo que la serpiente sufra alguna lesión y otorga seguridad al personal. Posteriormente, se permite que la serpiente muerda un contenedor estéril cubierto con Parafilm, para asemejar tejido. Una vez extraído el veneno, se puede realizar un proceso de liofilización con lo cual el veneno se podrá usar para estudios pertinentes.

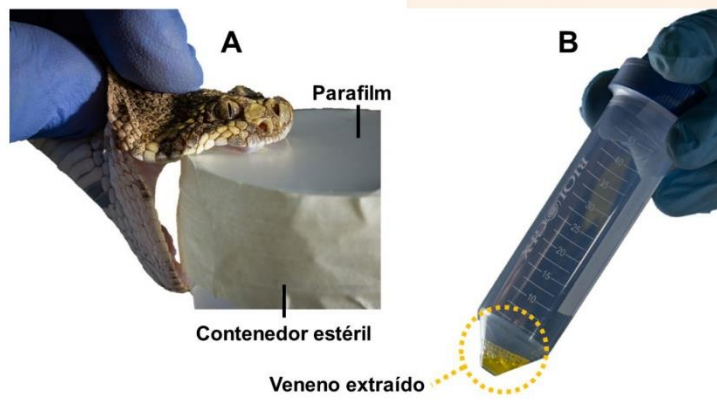


Figura 4. Imágenes de extracción de veneno a serpiente de cascabel en Sonora, México. Fotografías por Rodolfo Vega Littlewood.

Tabla 1. Lista de especies de serpientes de cascabel (*Crotalus* spp.) en Sonora, México [6], [11].

Especie	Familias de toxinas	Referencias
Serpiente de cascabel Diamante del Oeste (<i>C. atrox</i>)	BIPs, BPPs, CNP, CRISP, Dis, Hya, LAAO, CTL, PLA ₂ , SVMP P-I/III, SVSP, VEGF	[11], [13]
Serpiente de cascabel del Pacífico (<i>C. basiliscus</i>)	PP, CRISP, CTL, Dis, LAAO, PLA ₂ (CRTX, non-CRTX), SVMP P-I/II/III, inhibidor de SVMP, SVSP	[11], [14]
Serpiente de cascabel de cuernitos (<i>C. cerastes</i>)	3FTx, 5' NT, BPP, CRISP, CTL, Dis, Hya, Kun, LAAO, MYO, NGF, PDE, PLA ₂ , SVMP P-II/III, SVSP, VEGF, WAP	[11], [15], [16]
Serpiente de cascabel de Isla San Esteban (<i>C. estebanensis</i>)	N/D	N/A
Serpiente de cascabel gris (<i>C. lepidus</i>)	5' NT, CRISP, CTL, Dis, LAAO, PDE, PLA ₂ , SVMP P-I/III, SVSP (TLE)	[11], [17], [18]
Serpiente de cascabel cola negra (<i>C. molossus</i>)	Dis, LAAO, MYO, PLA ₂ , SVMP P-I/III, SVSP (TLE)	[11], [19], [20]
Serpiente de cascabel de manchas gemelas (<i>C. pricei</i>)	N/D	N/A
Serpiente de cascabel moteada (<i>C. pyrrhus</i>)	LAAO, SVSP, PLA ₂ (CRTX/MTX)	[11], [21]
Serpiente de cascabel de Mojave (<i>C. scutulatus</i>)	5' NT, APase, BPPs, CRISP, CTL, Dis, Hya, Kun, LAAO, MYO, NGF, PDE, PLA ₂ (MTX, no-CRTX), SVMP P-I/II/III, SVSP, VEGF	[11], [22], [23]
Serpiente de cascabel tigre (<i>C. tigris</i>)	CRISP, Dis, PLA ₂ (MTX), SVMP P-III, SVSP, VEGF	[11], [24]
Serpiente de cascabel de praderas (<i>C. viridis</i>)	5' NT, APase, BPP, CRISP, CTL, Dis, GC, LAAO, MYO, OHA, PDE, PLA ₂ (CRTX, no-CRTX), PLB, SVMP inhibitor, SVMP P-I/II/III, SVSP (TLE)	[11], [25], [26]
Serpiente de cascabel de nariz surcada (<i>C. willardi</i>)	CRISP, CTL, Dis, LAAO, PDE, PLA ₂ , SVMP P-I/III, SVSP (TLE)	[11], [27]



Notas: Toxinas de 3 dedos (3-FTX), 5'-nucleotidasa (5'-NT), acetilcolinesterasa (achase), péptido natriurético tipo A (ANP), péptido natriurético tipo B (BNP), péptido natriurético tipo C (CNP), adenosina trifosfatasa (ATPase), péptido inhibidor de bradiquinina (BIP), péptido potenciador de bradiquinina (BPP), lectinas de tipo C (CTL), cisteína proteasa (CysProt), proteína secretora rica en cisteína (CRISP), crotoxina (CRTX), disintegrina (Dis), factor de crecimiento epidermal (EGF), factor de crecimiento de fibroblasto (FGF), guanilil ciclasa (GC), hialuronidasa (Hya), inhibidor tipo kazal (Kazal), inhibidor tipo kunitz (Kun), L-aminoácido oxidasa (LAO), Mojave toxina (MTX), miotoxina (MYO), factor de crecimiento nervioso (NGF), ohanina (OHA), fosfodiesterasa (PDE), factor de crecimiento derivado de plaqueta (PDGF), fosfolipasa A2 (PLA2), fosfolipasa B (PLB), fosfolipasa D (PLD), metaloproteasa de veneno de serpiente (SVMP), serinoproteasa de veneno de serpiente (SVSP), enzima tipo trombina (TLE), factor de crecimiento endotelial (VEGF), waparina (WAP), N/D (no determinado).

Algunas familias de toxinas como las SVMPs y SVSPs se asocian al desarrollo de coagulopatías en pacientes [12], mientras que otras como la MTX y CRTX se asocian a problemas asociados al funcionamiento neuromuscular y neurotoxicidad [28]. En ese sentido, la gran variedad de familias de toxinas que se han reportado en los venenos de serpientes de cascabel promueve el estudio de los mismos para la búsqueda de posibles agentes farmacológicos [29]. Adicionalmente, una de las ventajas de utilizar componentes proteicos para el desarrollo de medicinas, es la alta afinidad que tienen con receptores celulares, descartando en ocasiones actividades no deseadas en el organismo por interacción en otras zonas [12].

Potencial farmacéutico de familias de toxinas

La utilización de péptidos y/o proteínas provenientes de venenos de serpientes para desarrollo de medicamentos no es un concepto nuevo. Entre algunas de las desventajas encontramos una baja distribución en el cuerpo cuando son administrados vía oral gracias a la digestión en el estómago. De manera similar, estas moléculas son eliminadas rápidamente del torrente sanguíneo si se administran vía intravenosa, y pueden causar reacciones inmunogénicas. Por otro lado, algunas claras ventajas son la alta especificidad que presentan en ciertos tejidos y células, acción en procesos metabólicos, y actividad anticancerígena mediante diferentes mecanismos. Con base en esta idea, nuestro equipo de investigación ha reportado el potencial uso del veneno de serpientes de cascabel (*C. molossus*), al integrarlo a estructuras nanométricas como nanopartículas contra células de carcinoma mamario (T-47D) [19]. A continuación, describiremos brevemente sobre el potencial uso de toxinas aisladas y familias de toxinas presentes en diferentes venenos de serpientes de cascabel sonorenses, específicamente en enfermedades como cáncer.



Fosfolipasas A2 (PLA2s)

Las fosfolipasas son enzimas de gran interés biotecnológico y farmacológico, esto debido a que están involucradas en diversas enfermedades inflamatorias en humanos, así como en el envenenamiento de venenos de serpientes [30]. Su mecanismo de acción está dirigido al metabolismo de lípidos membranales y, entre sus productos de hidrólisis se genera ácido araquidónico, precursor importante de compuestos como prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos, entre otros [12]. Una de las características de muchas células cancerosas es una biosíntesis y lipogénesis

atípica, por lo que estos componentes del veneno pudieran ser utilizadas contra ellas. Se ha reportado que diversas PLA2s tienen actividad antiproliferativa en modelos tanto *in vitro* como *in vivo*, mediante mecanismos como inductores de apoptosis, inhibición de migración celular y angiogénesis [12].

Metaloproteasas (SVMPs)

También conocidas como zinc-metaloproteasas, son proteínas de masa molecular variable y multi dominio, las cuales mediante procesos autoproteolíticos pueden generar agentes bioactivos. Se asocia su acción al desarrollo de hemorragias y cambios en el proceso de coagulación. Se ha reportado que su principal mecanismo de acción es sobre componentes de la matriz extracelular (colágeno, laminina, fibronectina, entre otros) [31]. Dependiendo de su estructura se pueden clasificar en P-I, P-II, P-III y P-IV SVMPs, las cuales hacen referencia a solo el dominio de SVMP, SVMP + DIS, SVMP + DIS + dominio rico en cisteína y SVMP heterodiméricas, respectivamente. Se ha reportado algunos de sus mecanismos de acción antiproliferativa se basan en la acción que presentan inhibiendo procesos adhesión celular (al actuar sobre receptores de integrinas), reduciendo la probabilidad de iniciar un proceso metastásico [12].

Serinoproteasas (SVSPs)

Las serinoproteasas son enzimas que se ha reportado se encuentran en diversos organismos, tanto de plantas como en animales. Aunque han sido relativamente menos estudiadas que otros componentes del veneno de serpientes de cascabel, sabemos que afectan diversas etapas de la cascada de coagulación [32]. Específicamente se reporta que algunos de sus mecanismos de acción están involucrados en la inhibición de agregación plaquetaria, coagulación y fibrinólisis. Si bien, la mayoría de los estudios referentes a estas toxinas están enfocados en desórdenes de coagulación, algunos reportes han indicado que pueden inhibir metástasis en líneas cancerosas de pulmón mediante un proceso de defibrinogénesis [33].

L-aminoácido oxidasas (LAAOs)

Estas glicoproteínas se encuentran presentes en organismos como bacterias, plantas y animales. Catalizan una deaminación oxidativa de L-aminoácidos dando productos como ácidos alfa-keto, amoniaco y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) [12]. En ese sentido, se ha demostrado que su interacción con receptores de membranas celulares produce altos niveles de H₂O₂. Lo anterior puede ayudar a inducir un proceso de hipotensión, y curiosamente, se ha observado que esto ocurre de manera específica en células endoteliales de mamíferos. Algunos estudios reportaron que la interacción de estas enzimas en membranas celulares produce un aumento significativo local de H₂O₂ y de esta manera induce apoptosis, sin embargo, también se reportó que este proceso de apoptosis era diferente al



inducido solo por H₂O₂ [34]. Asimismo, se ha reportado que la acción de las LAAOs también está ligada a caspasas (proteasas comunes como marcadores apoptóticos). En este contexto, estas enzimas resultan ser sumamente interesantes, pero hace falta determinar sus mecanismos de acción y seguridad de aplicación.

Lectinas de tipo C de serpientes (CTL)

Las lectinas son proteínas que reconocen y se unen de manera específica a ciertos carbohidratos. Actualmente se han estudiado diversos tipos de lectinas para el desarrollo de agentes antitumorales [35]. Asimismo, se ha reportado que algunas CTLs son capaces de inhibir crecimiento tumoral derivado de las interacciones con las membranas de diversas líneas cancerosas. Estas toxinas pueden adherirse a los receptores de integrinas compitiendo con receptores de la matriz extracelular, los cuales son importantes en el desarrollo celular y tumoral, promoviendo su uso como potenciales agentes antiproliferativos [12], [36].

Desintegrinas (DIS)

Las desintegrinas representan una familia de péptidos no enzimáticos y no tóxicos de relativamente baja masa molecular (< 10 kDa) [37], [38]. Se ha demostrado que ciertas integrinas como las $\alpha\beta$ y subtipos, son receptores sumamente importantes en la adhesión celular de células cancerosas. De manera general, el mecanismo de acción de estas toxinas como inhibidores de crecimiento tumoral y metástasis se basan en el impedimento de la unión de receptores de integrinas tumorales en la matriz extracelular [12]. Algo relevante es que ya se han aprobado medicamentos antiplaquetarios como Tirofiban [39] y Eptifibatida [40], basados en desintegrinas.

En la figura 5 se muestran los componentes que se han caracterizado en los venenos de serpientes de cascabel que ocurren en Sonora. Se anticipa que esta gráfica puede cambiar conforme se profundicen los estudios en especímenes nativos del estado, así como comparándolos con especímenes juveniles y adultos.

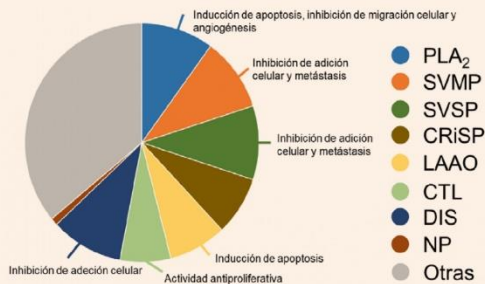


Figura 5. Composición venómica de serpientes de cascabel (Crotalus spp.) que ocurren en Sonora, México. Imagen modificada según datos de Deshwal et al. (2021) [11].

Es importante aclarar que existe una falta de estudios con respecto a venenos de serpientes sonorenses. Hace falta caracterizar de manera más profunda sus contenidos, así como sus funciones en el cuerpo. En ese sentido, se debe considerar que pueden existir cambios interespecíficos derivado de diferencias geográficas, y también ontogénicos [41], por lo que comparar el veneno de serpientes adultas y juveniles brindará información valiosa.

Las toxinas provenientes de serpientes venenosas representan oportunidades para la investigación y desarrollo de medicamentos, como el cáncer. En la tabla 2 se observa una lista de medicamentos aprobados por la FDA basados en toxinas de serpientes.



Tabla 2. Lista de medicamentos aprobados por la FDA basados en toxinas de serpientes [42].

Fase	Fármaco	Origen	Indicación
Aprobado por la FDA	Captopril	<i>Bothrops jararaca</i>	Hipertensión
	Tirofibán	<i>Echis carinatus</i>	Ataques al corazón
	Eptifibatida	<i>Sistrurus miliaris</i>	Síndrome coronario agudo
	Batroxibina	<i>Bothrops moojeni</i>	Infarto cerebral, embolia pulmonar, trombosis venosa profunda, infarto a miocardio
	Hemocoagulasa	<i>Bothrops atrox</i>	Cirugía plástica, cirugía abdominal, vitrectomía
Fase clínica	Alfimeprasa	<i>Agkistrodon contortix</i>	Oclusión arterial periférica aguda
	Viprinex	<i>Agkistrodon rhodostoma</i>	Infarto cerebral isquémico agudo

El potencial farmacológico que las toxinas provenientes de serpientes venenosas presentan es enorme. En ese sentido, recomendamos aumentar el esfuerzo en los estudios que se les realizan, con la confianza en que lo anterior brindará frutos. Si bien la realidad de poder obtener un producto farmacéutico aprobado por agencias reguladoras es difícil, no es imposible y no debemos permitir que eso frene a futuras investigaciones.

CONCLUSIONES

Sonora es un estado sumamente biodiverso donde ocurren distintas serpientes de cascabel. Estas serpientes venenosas también cumplen roles importantes en el ambiente, como controladores de roedores. Adicionalmente, los venenos de estas serpientes son fuentes de compuestos con un gran potencial farmacéutico para diversas enfermedades, tales como diabetes, cardiovasculares y cáncer. En un futuro cercano sus venenos podrán salvar un número mayor de vidas que las muertes que ocasionan. Diversos componentes mayoritarios del veneno de serpientes de cascabel (PLA₂s, SVMPs, SVSPs, LAAOs, DISs, CTLs, entre otros) ya se han estudiado previamente, y análisis han reportado actividad anticancerígena. Debido a lo anterior, el estudio de los venenos de serpientes de cascabel sonorenses ofrece amplias oportunidades para el desarrollo de nuevos y mejores medicamentos. En la Universidad de Sonora, recientemente un grupo multidisciplinario de investigadores inició una línea de investigación en este tema, cuyos resultados iniciales son muy prometedores.



RECONOCIMIENTOS

Agradecemos la ayuda del Museo Itinerante de Vida Animal (MIVIA), y su director general, Gerardo Lorenzo Acosta Campaña, por su apoyo en el desarrollo de este y otros proyectos, así como sus esfuerzos en la promoción de educación ambiental y conservación de animales ponzoñosos como las serpientes. De manera similar, agradecemos al equipo del Dr. Alejandro Alagón Cano y el Dr. Edgar Neri Castro, del Instituto de Biotecnología de la UNAM, por su ayuda en el desarrollo de temas de investigación relacionados al estudio de los venenos de serpientes mexicanas.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] T. Tasoulis and G. Isbister, "A Review and Database of Snake Venom Proteomes," *Toxins*, vol. 9, no. 9, p. 290, Sep. 2017, doi: 10.3390/toxins9090290.
- [2] B. Fry, *Venomous Reptiles and Their Toxins: Evolution, Pathophysiology and Biodiscovery*. Oxford University Press, 2015.
- [3] L. Fernández-Badillo, I. Zuria, J. J. Sigala-Rodríguez, G. Sanchez-Rojas, and G. Castaneda, "Revisión del conflicto humano-serpiente en México.pdf," *Animal Biodiversity and Conservation*, vol. 44, pp. 153–174, May 2021, doi: 10.32800/abc.2021.44.0153.
- [4] "THE REPTILE DATABASE." <http://www.reptile-database.org/> (accessed Feb. 19, 2020).
- [5] J. C. Rorabaugh and J. A. Lemos-Espinal, *A Field Guide to the Amphibians and Reptiles of Sonora*, vol. 1. Rodeo, New Mexico: ECO Herpetological Publishing and Distribution, 2016.
- [6] J. A. Lemos-Espinal, G. R. Smith, and J. C. Rorabaugh, "A conservation checklist of the amphibians and reptiles of Sonora, Mexico, with updated species lists," *ZK*, vol. 829, pp. 131–160, Mar. 2019, doi: 10.3897/zookeys.829.32146.
- [7] "OMS - Mordeduras de serpientes venenosas." <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/snakebite-envenoming> (accessed May 23, 2022).
- [8] "Boletín Epidemiológico Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Sistema Único de Información | Secretaría de Salud | Gobierno | gob.mx." <https://www.gob.mx/salud/documentos/boletinepidemiologico-sistema-nacional-de-vigilancia-epidemiologica-sistema-unico-de-informacion-231750> (accessed Jun. 11, 2020).
- [9] A. Alangode, K. Rajan, and B. G. Nair, "Snake antivenom: Challenges and alternate approaches," *Biochemical Pharmacology*, vol. 181, p. 114135, Nov. 2020, doi: 10.1016/j.bcp.2020.114135.
- [10] M. Sánchez et al., "Toxicological profile of medically relevant *Crotalus* species from Mexico and their neutralization by a *Crotalus basiliscus/Bothrops asper* antivenom," *Toxicon*, vol. 179, pp. 92–100, May 2020, doi: 10.1016/j.toxicon.2020.03.006.
- [11] A. Deshwal, P. Phan, J. Datta, R. Kannan, and S. K. Thallapuram, "A Meta-Analysis of the Protein Components in Rattlesnake Venom," *Toxins*, vol. 13, no. 6, Art. no. 6, Jun. 2021, doi: 10.3390/toxins13060372.
- [12] L. A. Calderon et al., "Antitumoral Activity of Snake Venom Proteins: New Trends in Cancer Therapy," *BioMed Research International*, vol. 2014, pp. 1–19, 2014, doi: 10.1155/2014/203639.
- [13] J. J. Calvete, E. Fasoli, L. Sanz, E. Boschetti, and P. G. Righetti, "Exploring the Venom Proteome of the Western Diamondback Rattlesnake, *Crotalus atrox*, via Snake Venomics and Combinatorial Peptide Ligand Library Approaches," *J. Proteome Res.*, vol. 8, no. 6, pp. 3055–3067, Jun. 2009, doi: 10.1021/pr900249q.
- [14] A. Segura et al., "Proteomic, toxicological and immunogenic characterization of Mexican west-coast rattlesnake (*Crotalus basiliscus*) venom and its immunological relatedness with the venom of Central American rattlesnake (*Crotalus simus*)," *J. Proteomics*, vol. 158, pp. 62–72, Mar. 2017, doi: 10.1016/j.jprot.2017.02.015.
- [15] E. P. Hofmann et al., "Comparative venom-gland transcriptomics and venom proteomics of four Sidewinder Rattlesnake (*Crotalus cerastes*) lineages reveal little differential expression despite individual variation," *Sci Rep*, vol. 8, no. 1, p. 15534, Dec. 2018, doi: 10.1038/s41598-018-33943-5.
- [16] R. M. Rautsaw et al., "Intraspecific sequence and gene expression variation contribute little to venom diversity in sidewinder rattlesnakes (*Crotalus cerastes*)," *Proc Biol Sci*, vol. 286, no. 1906, p. 20190810, Jul. 2019, doi: 10.1098/rspb.2019.0810.
- [17] M. Borja et al., "Morulustatin, A Disintegrin that Inhibits ADP-Induced Platelet Aggregation, Isolated from the Mexican Tamaulipan Rock Rattlesnake (*Crotalus lepidus morulus*)," *Revista científica (Universidad del Zulia. Facultad de Ciencias Veterinarias. Division de Investigacion)*, vol. 26, no. 2, pp. 86–94, 2016.



- [18] "Intra-specific Variation in the Protein Composition and Proteolytic Activity of Venom of *Crotalus lepidus morulus* from the Northeast of Mexico." <https://bioone.org/journals/copeia/volume-2013/issue-4/OT-13-005/Intra-specific-Variation-in-the-Protein-Composition-and-Proteolytic-Activity/10.1643/OT-13-005.full> (accessed May 09, 2022).
- [19] J. Jimenez-Canale et al., "Cytotoxic activity of *Crotalus molossus molossus* snake venom-loaded in chitosan nanoparticles against T-47D breast carcinoma cells," *Acta Biochimica Polonica*, vol. 69, no. 1, Art. no. 1, Feb. 2022, doi: 10.18388/abp.2020_5975.
- [20] M. Borja et al., "Ontogenetic Change in the Venom of Mexican Black-Tailed Rattlesnakes (*Crotalus molossus nigrescens*)," *Toxins*, vol. 10, no. 12, p. 501, Dec. 2018, doi: 10.3390/toxins10120501.
- [21] K. K. Tan, S. G. Ler, J. Gunaratne, B. H. Bay, and G. Ponnampalam, "In vitro cytotoxicity of L-amino acid oxidase from the venom of *Crotalus mitchellii pyrrhus*," *Toxicon*, vol. 139, pp. 20–30, Dec. 2017, doi: 10.1016/j.toxicon.2017.09.012.
- [22] M. Borja et al., "Biological and Proteolytic Variation in the Venom of *Crotalus scutulatus scutulatus* from Mexico," *Toxins*, vol. 10, no. 1, p. 35, Jan. 2018, doi: 10.3390/toxins10010035.
- [23] D. J. Massey et al., "Venom variability and envenoming severity outcomes of the *Crotalus scutulatus scutulatus* (Mojave rattlesnake) from Southern Arizona," *Journal of Proteomics*, vol. 75, no. 9, pp. 2576–2587, May 2012, doi: 10.1016/j.jpro.2012.02.035.
- [24] J. J. Calvete et al., "Snake Venomics of *Crotalus tigris*: The Minimalist Toxin Arsenal of the Deadliest Neartic Rattlesnake Venom" *J Proteome Res*, vol. 11, no. 2, pp. 1382–1390, Feb. 2012, doi: 10.1021/pr201021d.
- [25] C. M. Adade, S. F. Anne Cristine, O. C. Ana Lúcia, R. B. Zingali, and T. Souto-Padrón, "44. Leishmanicidal Effects of a Phospholipase A2 Isolated from *Crotalus viridis viridis* Snake Venom," *Toxicon*, vol. 60, no. 2, p. 117, Aug. 2012, doi: 10.1016/j.toxicon.2012.04.045.
- [26] C. M. Adade, B. L. Cons, P. A. Melo, and T. Souto-Padrón, "Effect of *Crotalus viridis viridis* snake venom on the ultrastructure and intracellular survival of *Trypanosoma cruzi*," *Parasitology*, vol. 138, no. 1, pp. 46–58, Jan. 2011, doi: 10.1017/S003118201000958.
- [27] A. J. Saviola, A. J. Gandara, R. W. Bryson, and S. P. Mackessy, "Venom phenotypes of the Rock Rattlesnake (*Crotalus lepidus*) and the Ridge-nosed Rattlesnake (*Crotalus willardi*) from México and the United States," *Toxicon*, vol. 138, pp. 119–129, Nov. 2017, doi: 10.1016/j.toxicon.2017.08.016.
- [28] J. Dobson et al., "Rattling the border wall: Pathophysiological implications of functional and proteomic venom variation between Mexican and US subspecies of the desert rattlesnake *Crotalus scutulatus*," *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, vol. 205, pp. 62–69, Feb. 2018, doi: 10.1016/j.cbpc.2017.10.008.
- [29] E.-R. M. Redwan, "Animal-Derived Pharmaceutical Proteins," *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*, vol. 30, no. 3, pp. 262–290, Jun. 2009, doi: 10.1080/15321810903084400.
- [30] B. Lomonte, Y. Angulo, M. Sasa, and J. M. Gutierrez, "The Phospholipase A2 Homologues of Snake Venoms: Biological Activities and Their Possible Adaptive Roles," 2009. <https://www.ingentaconnect.com/content/ben/ppl/2009/0000016/0000008/art00003> (accessed Mar. 31, 2020).
- [31] J. M. Gutiérrez and A. Rucavado, "Snake venom metalloproteinases: Their role in the pathogenesis of local tissue damage," *Biochimie*, vol. 82, no. 9, pp. 841–850, Sep. 2000, doi: 10.1016/S0300-9084(00)01163-9.
- [32] J. Boldrini-França et al., "Beyond hemostasis: a snake venom serine protease with potassium channel blocking and potential antitumor activities," *Sci Rep*, vol. 10, no. 1, p. 4476, Mar. 2020, doi: 10.1038/s41598-020-61258-x.
- [33] M. Shibuya et al., "Antimetastatic effect of defibrinogenation with batroxobin depends on the natural killer activity of host in mice," *J Cancer Res Clin Oncol*, vol. 116, no. 2, pp. 168–172, Mar. 1990, doi: 10.1007/BF01612672.
- [34] S.-M. Suhr and D.-S. Kim, "Identification of the Snake Venom Substance That Induces Apoptosis," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 224, no. 1, pp. 134–139, Jul. 1996, doi: 10.1006/bbrc.1996.0996.
- [35] L. Lavín de Juan, V. García Recio, P. Jiménez López, T. Gírbés Juan, M. Córdoba-Díaz, and D. Córdoba-Díaz, "Pharmaceutical applications of lectins," *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, vol. 42, pp. 126–133, Dec. 2017, doi: 10.1016/j.jddst.2017.05.018.
- [36] S. Sarray, N. Srairi, J. Luis, J. Marvaldi, M. E. Ayeb, and N. Marrakchi, "Lebecetin, a C-Lectin Protein from the Venom of *Macrovipera lebetina* That Inhibits Platelet Aggregation and Adhesion of Cancerous Cells," *PHT*, vol. 31, no. 3–6, pp. 173–176, 2001, doi: 10.1159/000048060.
- [37] E. Rivas Mercado et al., "Disintegrins extracted from totonacan rattlesnake (*Crotalus totonacus*) venom and their anti-adhesive and anti-migration effects on MDA-MB-231 and HMEC-1 cells," *Toxicology in Vitro*, vol. 65, p. 104809, Jun. 2020, doi: 10.1016/j.tiv.2020.104809.
- [38] B. Akhtar, F. Muhammad, A. Sharif, and M. I. Anwar, "Mechanistic insights of snake venom disintegrins in cancer treatment," *European Journal of Pharmacology*, vol. 899, p. 174022, May 2021, doi: 10.1016/j.ejphar.2021.174022.
- [39] K. J. McClellan and K. L. Goa, "Tirofiban," *Drugs*, vol. 56, no. 6, pp. 1067–1080, Dec. 1998, doi: 10.2165/00003495-199856060-00017.
- [40] R. M. Scarborough, "Development of eptifibatid," *American Heart Journal*, vol. 138, no. 6, pp. 1093–1104, Dec. 1999, doi: 10.1016/S0002-8703(99)70075-X.
- [41] E. N. Castro et al., "Serpientes Venenosas en México: Una Revisión al Estudio de los Venenos, los Antivenenos y la Epidemiología," *Revista Latinoamericana de Herpetología*, vol. 3, no. 2, Art. no. 2, Nov. 2020, doi: 10.22201/fc.25942158e.2020.2.205.
- [42] T. Mohamed Abd El-Aziz, A. G. Soares, and J. D. Stockand, "Snake Venoms in Drug Discovery: Valuable Therapeutic Tools for Life Saving," *Toxins*, vol. 11, no. 10, Art. no. 10, Oct. 2019, doi: 10.3390/toxins11100564.

Cómo citar este artículo:

Jimenez Canale, J., Velazquez Contreras, E. F., & Sarabia Sainz, A.- i. (2022). El potencial farmacológico de venenos de serpientes de Sonora, México. *EPISTEMUS*, 16(33). <https://doi.org/10.36790/epistemus.v16i33.226>

Communication

Development of an Electrochemical Sensor Conjugated with Molecularly Imprinted Polymers for the Detection of Enrofloxacin

Amed Gallegos-Tabanico¹, Jorge Jimenez-Canale¹, Sergio G. Hernandez-Leon², Alexel J. Burgara-Estrella³, Jose Carmelo Encinas-Encinas¹ and Jose A. Sarabia-Sainz^{3,*}

¹ Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales, Universidad de Sonora, Boulevard Luis Encinas y Rosales s/n, Colonia Centro, Hermosillo C.P. 83000, Sonora, Mexico

² Coordinación de Ciencia de los Alimentos, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Hermosillo C.P. 83304, Sonora, Mexico

³ Departamento de Investigación en Física, Universidad de Sonora, Boulevard Luis Encinas y Rosales s/n, Colonia Centro, Hermosillo C.P. 83000, Sonora, Mexico

* Correspondence: jose.sarabia@unison.mx

Abstract: An electrochemical sensor was fabricated for the rapid and simple detection of enrofloxacin (EF). Modification of screen-printed gold electrodes (SPE) with molecularly imprinted polymers (MIPs) allowed the detection of enrofloxacin by square wave voltammetry (SWV), measuring the oxidation peak at +0.9 V. The detection principle of molecularly imprinted polymers (MIPs) is based on the formation of binding sites with affinities and specificities comparable with those of natural antibodies. The detection of enrofloxacin showed a linear range of 0.01–0.1 mM with a detection limit LOD of 0.02 mM. The development of a non-imprinted polymer (NIP) control sensor allowed for better and more efficient detection. In addition, the sensor is portable, having the advantage of analyzing and detecting molecules of interest without the need to take the sample to a laboratory.

Keywords: electrochemical; sensor; molecularly imprinted polymers; enrofloxacin; SPE



Citation: Gallegos-Tabanico, A.; Jimenez-Canale, J.; Hernandez-Leon, S.G.; Burgara-Estrella, A.J.; Encinas-Encinas, J.C.; Sarabia-Sainz, J.A. Development of an Electrochemical Sensor Conjugated with Molecularly Imprinted Polymers for the Detection of Enrofloxacin. *Chemosensors* **2022**, *10*, 448. <https://doi.org/10.3390/chemosensors10110448>

Received: 20 September 2022

Accepted: 26 October 2022

Published: 28 October 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

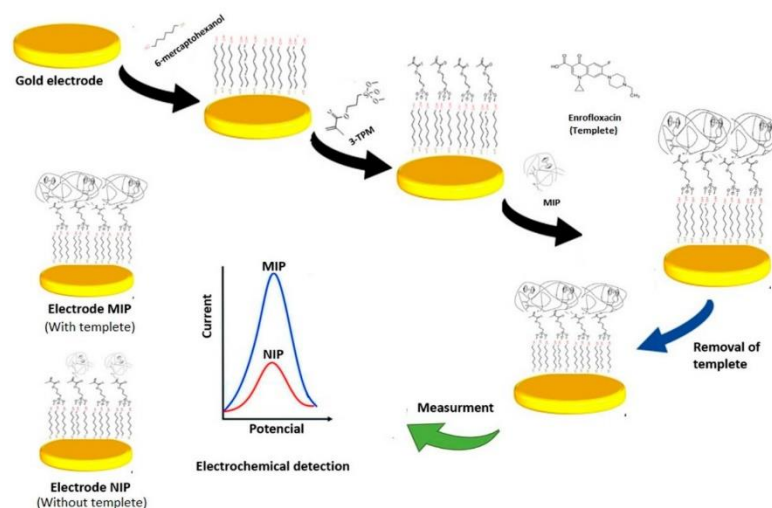
The development of new devices and analytical techniques with high selectivity and precision are of great importance in different areas—for example, environmental, food, pharmaceutical, among others—to determine organic compounds [1]. Electrochemical techniques have gained special interest due to their advantages such as low cost, fast response, and portability compared with conventional methods [2,3]. Electrochemical sensors have analytical applications as chemosensors converting physical, chemical, and/or biological signals into a quantifiable electrochemical signal. Voltammetry, amperometry conductivity, and capacitance or impedance properties can be used to determine an analyte [3]. Improvements to sensitivity and selectivity in substance detection processes and modifications of electrodes with molecularly imprinted polymers (MIP's) are currently being investigated [4,5]. The use of MIPs has become a very important tool for the detection of chemical substances and biological compounds for environmental and food monitoring. In addition, MIPs have been used as new molecular recognition materials for applications in the detection and removal of chemical and biological contaminants [6,7].

Molecular imprinting is a tool relying on the principles of molecular recognition of biological processes to generate artificial macromolecular receptors [8,9] with a target molecule acting as a template. Functional monomers interact around it, and subsequently, the monomers cross-link them to copolymerize and form a shell-like structure [9]. After polymerization and removal of the template, the binding sites are exposed in such a way that they are complementary to the template in size, shape, and position for their functional groups held in place in the newly formed cross-linked structure [10].

Electrode modification with MIPs represents an advantageous alternative, including recognition properties, low cost, and the possibility of a comfortable and simple design. For these reasons, electrochemical sensors have drawn much attention for the detection of organic compounds, such as emerging contaminants [11,12].

Enrofloxacin, a member of the fluoroquinolone family, is an antimicrobial approved by the Food and Drug Administration (FDA) for exclusive use in veterinary applications with proven efficacy in the treatment of bacterial diseases derived from aquaculture farms [13]. The advantage of enrofloxacin relies on its wide spectrum of antibacterial activity, for example, strong bactericidal power, fast action, and wide distribution in the body [14]. One of the main problems generated by the mishandling of enrofloxacin in aquaculture uses is their association with environmental issues and health problems. Specifically, the accumulation of enrofloxacin residues in shrimp tissues derived from improper practices have caused potential problems to human health [15,16]. Therefore, it is important to evaluate the presence of antibiotic residues in food. The agrifood sector has been carefully monitored to verify compliance with the maximum levels of EF permitted by the FDA (0.1 mg/kg) for toxic residues and contaminants in food products [17].

In this work, we describe the development of an electrochemical sensor based on the use of screen-printed gold electrodes (SPE) modified with molecularly imprinted polymers for the detection of enrofloxacin by electrochemical techniques (Scheme 1).



Scheme 1. Graphical representation of an electrochemical sensor.

2. Materials and Methods

2.1. Materials and Reagents

Acetonitrile (ACN), 6-mercaptopentanol, potassium hexacyanoferrate (III) $K_3 [Fe(CN)_6]$, sulfuric acid, 3-trimethoxylpropyl methacrylate (3-TPM), enrofloxacin (EF), methacrylic acid (MAA), ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA), ferrocenylmethyl methacrylate, and ammonium persulfate (APS) was obtained from Sigma Aldrich, U.S.A. All the reagents used were of analytical grade. Additionally, screen-printed gold electrodes and a portable potentiostat, Sensit Smart (PalmSens, Houten, The Netherlands), using the PStouch software were used for all electrochemical studies.

2.2. Electrode Preparation

Screen-printed gold electrodes were subjected to washing and activation processes using a Sensit Smart potentiostat. The process consisted of 80 cycles in a cyclic voltammetry (CV) with a potential window from -0.7 to 1.2 V at a scanning rate of 50 mV, placing a drop of a 0.1 M H_2SO_4 solution and subsequent washings with H_2O every 20 cycles.

2.3. Chemical Modification of the Screen-Printed Electrode

After washing and activating the gold electrode, it was chemically modified by adding 10 μL of the 6-mercaptohexanol monomer to the working electrode, dried at room temperature for 24 h, and washed with water to remove monomer excess. A second modification was performed by adding 15 μL of 3-TPM to the electrode surface and allowing it to dry at room temperature for 24 h. Finally, a wash with water was carried out to eliminate the excess or residues of unreacted monomer, and it was stored for the following modifications.

2.4. Synthesis of Molecularly Imprinted Polymers

The synthesis of MIPs was carried out on the surface of the electrode previously modified with the 3-TPM monomer. In a round bottom flask, 100 mL of acetonitrile containing 52.1 mg of enrofloxacin as template, 100 μL of methacrylic acid as functional monomer, and 1.09 mL of ethylene glycol dimethacrylate as cross-linking monomer were added. The solution was subjected to an ultrasonic bath for 30 min. A total 20 mg of ferrocenylmethyl methacrylate was added and the solution was kept under constant stirring in a nitrogen environment to purge the oxygen present in the solution. The gold electrode was suspended in the solution and 11.5 mg of ammonium persulfate were added to initiate polymerization on the electrode under a nitrogen environment for 24 h at room temperature.

Once MIPs were polymerized on the surface of the electrode, they were washed with methanol and acetic acid at a 9:1 ratio and kept under vigorous magnetic stirring overnight to remove the template from the MIPs. Finally, additional washes were carried out with 80% methanol. Additionally, the synthesis of an NIP control sample was performed under the same conditions without the enrofloxacin template.

2.5. Sample Preparation

A stock sample of 0.01 M enrofloxacin was prepared by weighing 36.70 mg dissolved in 10 mL of H_2SO_4 0.1 M. To evaluate the optimal working pH, samples of 3 mM enrofloxacin at pH 3 to pH 6 were analyzed. A total 15 μL of solution was placed on the bare gold electrode and analyzed using the square wave voltammetry (SWV) technique.

2.6. Morphological Characterization

A morphological characterization of the screen-printed electrodes was carried out to observe the modification on the surface of the electrodes with MIPs. This characterization was carried out by atomic force spectroscopy (AFM) using the AFM model Alpha300RA (WiTec, Ulm, Germany).

2.7. Electrochemical Characterization

As part of the characterization of the modified gold electrode, cyclic voltammetry and impedance spectroscopy (EIS) techniques were used to study the degree of modification of the electrode surface. Additionally, atomic force microscopy (AFM) was used to analyze the modification in the electrode. A CV study was performed using a 2 mM $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ in 0.1 M H_2SO_4 solution, where a 15 μL drop from the solution was placed on the working electrode and a CV scan was then performed with a potential window from -0.7 to 0.7 V at a scan rate of 50 mV. For the EIS study, a drop of $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ solution was placed and analyzed using a frequency of 20 kHz. Additionally, a control sample of 0.5 mM enrofloxacin was taken and a 15 μL drop of the solution was placed on the electrode modified with MIPs and another drop on the control electrode with NIPs. The analysis was

carried out using the SWV technique with a potential window from 0–1.1 V at a scan rate of 0.08 v/s to observe a current signal corresponding to the drug concentration.

2.8. Determination of the Enrofloxacin

For the determination of enrofloxacin using gold electrodes modified with MIPs, a study using the square wave voltammetry (SWV) technique was carried out. Enrofloxacin samples were prepared at different concentrations from 0.01 to 0.1 mM using pH 3 acetate buffer. A 15 μ L drop of each solution was taken and placed on the MIPs-electrode; the analysis was carried out using the SWV technique with a potential window from 0–1.1 V at a scan rate of 0.08 v/s to observe a current signal corresponding to the drug concentration.

3. Results and Discussion

3.1. Morphological Characterization

Electrode surface modification was observed by atomic force microscopy, as indicated in Figure 1. The bare electrode in Figure 1a represents a reference electrode without chemical modifications. The material surface is observed as smooth fields with small protuberances typical of electrodes. In Figure 1b,c, the images clearly show that the polymers are coated on the bare electrode. Figure 1b represents our control NIP sample not molecularly imprinted due to the absence of template and minimal changes that occurred. However, it is possible to observe a disorganized morphology. Figure 1c shows the Au electrode modified with the MIP; it shows great adherence on the surface of the electrode, forming clusters with ordered arrangement of hemispherical structures with approximate size of 1 micrometer corresponding to the molecularly imprinted polymer.

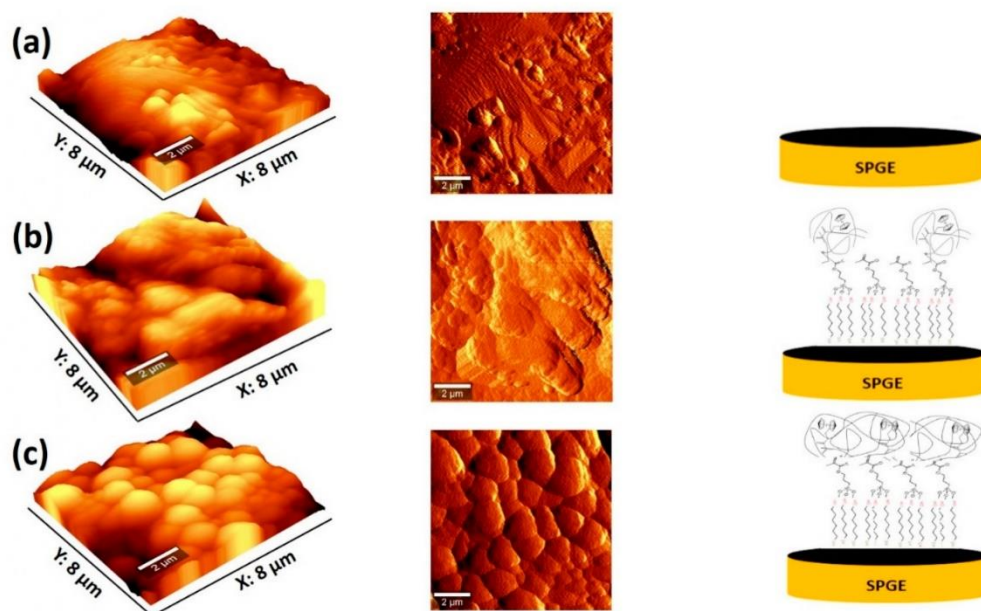


Figure 1. Atomic force microscopy. Bare electrode (a), NIP-modified electrode (b), MIP-modified electrode (c).

3.2. Electrochemical Characterization

Electrochemical studies based on the oxidation of organic substances are promising techniques for analytical purposes. Here, studies were first carried out to determine the electrochemical oxidation behavior of gold electrodes on each polymeric modification step. This electrochemical study was performed by cyclic voltammetry with a potential window from -0.7 to 0.7 V at a scan rate of 50 mV. Figure 2 shows the results obtained from the CV analysis of the electrodes, where the oxidation and reduction peaks for $K_3[Fe(CN)_6]$ can be observed. As expected, with the modification of the electrodes, the cyclic voltammograms also changed. A shift in the oxide-reduction peaks is shown and a decrease in the intensity of the current peaks as the modification of the electrode is achieved. From here, we can deduce that the degree of modification is related to the corresponding change in the $K_3[Fe(CN)_6]$ signal, as also shown by O'Sullivan et al., 2021 and Menon et al., 2018 [18,19].

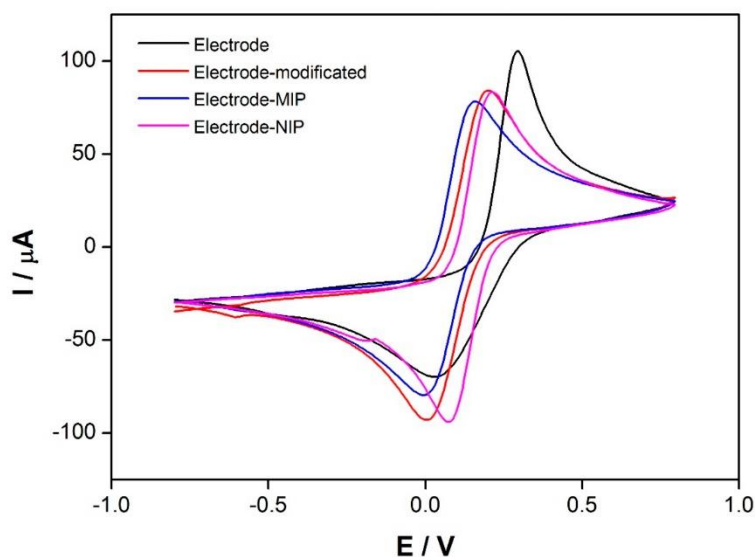


Figure 2. Characterization by CV of screen-printed gold electrodes in solution of 2 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ in H_2SO_4 . Bare gold electrode (black), 6-mercaptohexanol-modified gold electrode (red), NIP-electrode (pink), and MIP-electrode (blue).

We noticed that the oxidation and reduction peaks of $K_3[Fe(CN)_6]$ of the modified and non-modified electrodes were not significantly different; therefore, to complement the analysis of the modified electrodes, an electrochemical impedance spectroscopy study was performed. Modified electrode spectra showed a characteristic Nyquist semicircle, indicating an increase in resistance. Figure 3 shows the first chemical modification of the electrodes with 6-mercaptohexanol and shows a small Nyquist semicircle referring to a lower resistance for electron flow compared with the unmodified electrode, as presented by Laschuk et al., 2021 [20] in their research. We would expect similar behaviors for MIP and NIP since there would be no chemical difference. However, in our experimental conditions, a considerable difference in charge transfer was observed in the MIP and NIP electrodes attributed to a difference in the distribution of the polymer network on the electrode due to the cavities formed by molecular imprinting of enrofloxacin. These results confirm the successful modification of the electrode.

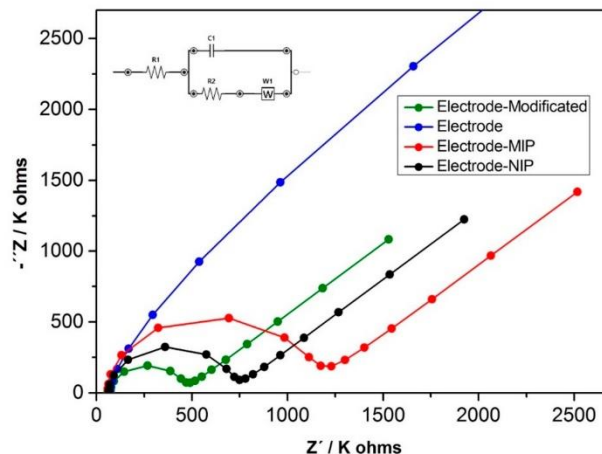


Figure 3. Electrochemical impedance spectroscopy (EIS) to screen-printed electrodes. Bare Gold Electrode (Blue), MIP-Electrode (Red), NIP-electrode (Black), and electrode chemically modified with monomer (green).

3.3. Influence of pH and Supporting Electrolyte

After electrochemical characterization of modified electrodes, we analyzed the enrofloxacin response on the non-modified electrodes. For this, square wave voltammetry was used as the electroanalytical technique for enrofloxacin determination. The analysis was performed to evaluate the influence of pH to obtain the best enrofloxacin peak with sufficient current response for further quantitative analysis. The buffers used were in the pH range from 3 to 6. Figure 4 shows that as the pH value of the solution increases, the oxidation peak corresponding to the EF decreases. The maximum current intensity peak and a shift in the window potential occurs for each pH of the solution. These results correspond to the ones reported by Hernandez et al., 2021 [21]. The characteristic peak of oxidation of enrofloxacin appears at 0.9 V, corresponding to the peak shown in the solution with pH 3. Based on these results, we decided that the optimal working conditions for further experiments were at pH 3. The following study consisted in obtaining a calibration curve of the current response versus EF concentrations. Figure 5 shows a linearity current peak proportional to EF concentrations with a coefficient of determination (R^2) of 0.9947. This study is important to understand the nature of the chemical and physical processes involved in the electroanalytical procedure.

3.4. SWV Response of Electrodes to Enrofloxacin Detection

To compare the electrochemical response of the modified electrode with the molecularly imprinted enrofloxacin, SWV analysis was performed for the MIP, NIP, and bare electrodes in the presence of enrofloxacin. Figure 6 shows the well-defined oxidation peak of enrofloxacin at the window potential of 0.9 v for the electrode modified with MIP. It was also observed in the current peak shown in Figure 5 at a concentration of 1 mM. Likewise, a small oxidation peak was observed for the NIP control electrode attributed to non-specific interactions or small unmodified areas in the electrode, which was also observed for the bare electrode presenting a small signal corresponding to the oxidation of enrofloxacin at pH 3, as shown in Figure 4. However, when compared with the corresponding signal from the MIP-electrode, the current peak is much higher due to the modification of the electrodes with the MIPs, concentrating in a greater proportion the analyte sample in the

cavities of the MIP polymer, as also reported by Seguro et al., 2022 [22]. Therefore, this system may be used for the detection of enrofloxacin.

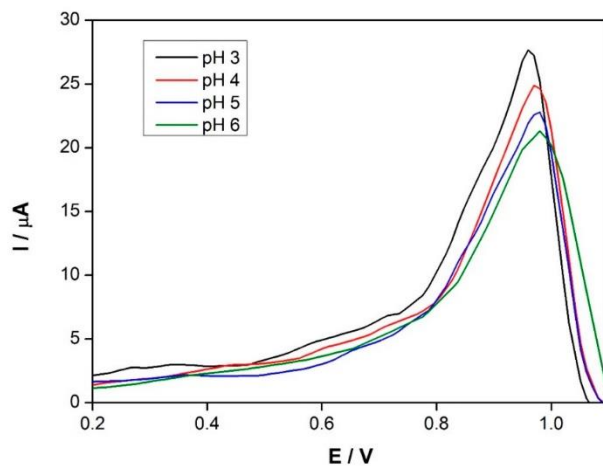


Figure 4. Square wave voltammetry (SWV). Enrofloxacin samples prepared at 3 mM concentration in different pH buffer solutions.

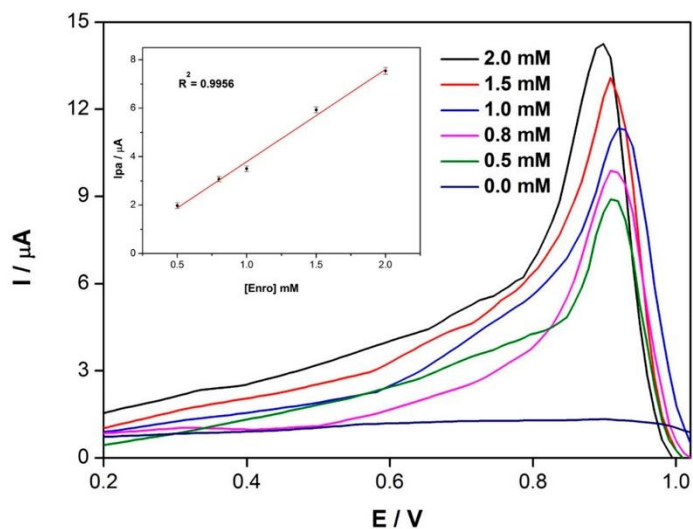


Figure 5. Square wave voltammetry (SWV). Enrofloxacin samples prepared at pH 3 at different concentrations.

3.5. Detection of Enrofloxacin

As part of the results obtained from the determination of enrofloxacin, Figure 7 shows the analysis by SWV using MIP-electrode and different concentrations of enrofloxacin prepared in buffer pH 3. The study was carried out at different concentrations of enrofloxacin,

detecting a linear range of concentrations from 0.01 to 0.1 mM with a detection limit (LOD) of 0.02 mM; these concentrations of enrofloxacin are below the levels of 0.1 to 0.3 mM allowed by regulatory commissions. In this sense, the development of biosensors from molecular imprinted polymers for the detection of enrofloxacin presents great characteristics comparable with the detection of conventional equipment such as HPLC or ELISA. The main advantages of this detection system are its low cost and the ability to detect and quantify analytes without having to take samples to a laboratory (portability).

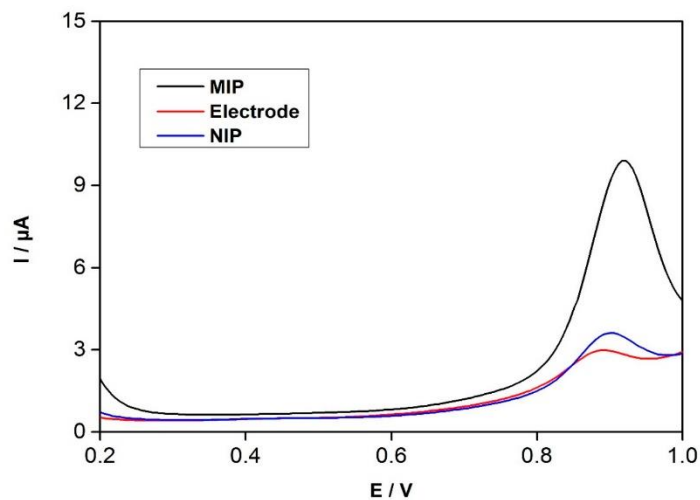


Figure 6. Square wave voltammetry (SWV) to modified gold electrodes in the presence of a sample of enrofloxacin at 1 mM in a pH 3 buffer solution.

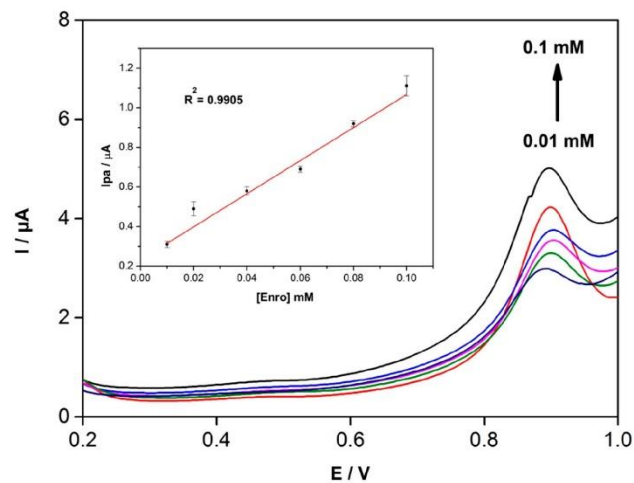


Figure 7. Square wave voltammetry (SWV) to MIP-electrode in the presence of enrofloxacin at different concentrations in buffer solution pH 3.

4. Conclusions

In summary, a new electrochemical sensor was developed from the modification of screen-printed electrodes with molecularly imprinted polymers for the detection of enrofloxacin. This easy and practical sensor can detect concentration levels of enrofloxacin, performing comparably with conventional methods such as HPLC. Additionally, since it is portable, it also has the advantage of being able to detect analytes in the field in around ~5 min, without taking the sample to a laboratory. Finally, these modified screen-printed electrodes are reusable, making them highly interesting while considering their expense, especially when comparing our method to more conventional methods as mentioned before.

Author Contributions: Conceptualization, A.G.-T. and J.A.S.-S.; methodology, A.G.-T.; software, A.G.-T. and A.J.B.-E.; formal analysis, A.G.-T. and A.J.B.-E.; investigation, A.G.-T. and J.A.S.-S.; resources, J.J.-C. and S.G.H.-L.; writing—original draft preparation, A.G.-T. and J.J.-C.; supervision, J.A.S.-S. and J.C.E.-E.; project administration, J.A.S.-S. and J.C.E.-E. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data are available from the authors under reasonable request.

Acknowledgments: We are grateful to the CONACYT for financial support, under projects CB-CONACYT No. A1-A-41029. We would also like to thank the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) for supporting the scholarship grant to the postgraduate students G.T.-A (No. 664874) and J.J.-C. (No. 494554).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Tarley, C.R.T.; Sotomayor, M.D.P.T.; Kubota, L.T. Polímeros biomiméticos em química analítica. Parte 2: Aplicações de MIP ("Molecularly Imprinted Polymers") no desenvolvimento de sensores químicos. *Química Nova* **2005**, *28*, 1087–1101. [[CrossRef](#)]
2. Abera, B.D.; Ortiz-Gómez, I.; Shkodra, B.; Romero, F.J.; Cantarella, G.; Petti, L.; Salinas-Castillo, A.; Lugli, P.; Rivadeneyra, A. Laser-Induced Graphene Electrodes Modified with a Molecularly Imprinted Polymer for Detection of Tetracycline in Milk and Meat. *Sensors* **2022**, *22*, 269. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Lowinsohn, D.; Bertotti, M. Sensores eletroquímicos: Considerações sobre mecanismos de funcionamento e aplicações no monitoramento de espécies químicas em ambientes microscópicos. *Química Nova* **2006**, *29*, 1318–1325. [[CrossRef](#)]
4. Chu, H.; Wei, X.; Wu, M.; Yan, J.; Tu, Y. An electrochemiluminescent biosensor based on polypyrrole immobilized uricase for ultrasensitive uric acid detection. *Sens. Actuators B Chem.* **2012**, *163*, 247–252. [[CrossRef](#)]
5. Pereira, A.C.; Aguiar, M.R.; Kisner, A.; Macedo, D.V.; Kubota, L.T. Amperometric biosensor for lactate based on lactate dehydrogenase and Meldola Blue coimmobilized on multi-wall carbon-nanotube. *Sens. Actuators B Chem.* **2007**, *124*, 269–276. [[CrossRef](#)]
6. Qian, T.; Yu, C.; Zhou, X.; Ma, P.; Wu, S.; Xu, L.; Shen, J. Ultrasensitive dopamine sensor based on novel molecularly imprinted polypyrrole coated carbon nanotubes. *Biosens. Bioelectron.* **2014**, *58*, 237–241. [[CrossRef](#)]
7. Zhang, X.; Peng, Y.; Bai, J.; Ning, B.; Sun, S.; Hong, X.; Liu, Y.; Liu, Y.; Gao, Z. A novel electrochemical sensor based on electropolymerized molecularly imprinted polymer and gold nanomaterials amplification for estradiol detection. *Sens. Actuators B Chem.* **2014**, *200*, 69–75. [[CrossRef](#)]
8. Blanco-López, M.C.; Lobo-Castañón, M.J.; Miranda-Ordieres, A.J.; Tuñón-Blanco, P. Electrochemical sensors based on molecularly imprinted polymers. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2004**, *23*, 36–48. [[CrossRef](#)]
9. Tarley, C.R.T.; Sotomayor, M.D.P.T.; Kubota, L.T. Polímeros biomiméticos em química analítica. Parte 1: Preparo e aplicações de MIP ("Molecularly Imprinted Polymers") em técnicas de extração e separação. *Química Nova* **2005**, *28*, 1076–1086. [[CrossRef](#)]
10. Figueiredo, E.C.; Dias, A.C.B.; Arruda, M.A.Z. Impressão molecular: Uma estratégia promissora na elaboração de matrizes para a liberação controlada de fármacos. *Rev. Bras. Cienc. Farm.* **2008**, *44*, 361–375. [[CrossRef](#)]
11. Aaryashree; Takeda, Y.; Kanai, M.; Hatano, A.; Yoshimi, Y.; Kida, M. A "Single-Use" Ceramic-Based Electrochemical Sensor Chip Using Molecularly Imprinted Carbon Paste Electrode. *Sensors* **2020**, *20*, 5847. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Liu, R.; Poma, A.; Sacchetti, A. Advances in Molecularly Imprinted Polymers as Drug Delivery Systems. *Molecules* **2021**, *26*, 3589. [[CrossRef](#)]

13. Shen, Y.; Jia, F.; Liang, A.; He, Y.; Peng, Y.; Dai, H.; Fu, Y.; Wang, J.; Li, Y. Monovalent Antigen-Induced Aggregation (MAA) Biosensors Using Immunomagnetic Beads in Both Sample Separation and Signal Generation for Label-Free Detection of Enrofloxacin. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2022**, *14*, 8816–8823. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Trouchon, T.; Lefebvre, S. A Review of Enrofloxacin for Veterinary Use. *Open J. Vet. Med.* **2016**, *6*, 40–58. [[CrossRef](#)]
15. Chen, H.; Liu, S.; Xu, X.-R.; Diao, Z.-H.; Sun, K.-F.; Hao, Q.-W.; Liu, S.-S.; Ying, G.-G. Tissue distribution, bioaccumulation characteristics and health risk of antibiotics in cultured fish from a typical aquaculture area. *J. Hazard. Mater.* **2018**, *343*, 140–148. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Ahmad, A.; Kurniawan, S.B.; Abdullah, S.R.S.; Othman, A.R.; Abu Hasan, H. Contaminants of emerging concern (CECs) in aquaculture effluent: Insight into breeding and rearing activities, alarming impacts, regulations, performance of wastewater treatment unit and future approaches. *Chemosphere* **2021**, *290*, 133319. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Lebelo, K.; Malebo, N.; Mochane, M.; Masinde, M. Chemical Contamination Pathways and the Food Safety Implications along the Various Stages of Food Production: A Review. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2021**, *18*, 5795. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. O'Sullivan, B.; Patella, B.; Daly, R.; Seymour, I.; Robinson, C.; Lovera, P.; Rohan, J.; Inguanta, R.; O'Riordan, A. A simulation and experimental study of electrochemical pH control at gold interdigitated electrode arrays. *Electrochim. Acta* **2021**, *395*, 139113. [[CrossRef](#)]
19. Menon, S.; Jesny, S.; Kumar, K.G. A voltammetric sensor for acetaminophen based on electropolymerized-molecularly imprinted poly(o-aminophenol) modified gold electrode. *Talanta* **2018**, *179*, 668–675. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Laschuk, N.O.; Easton, E.B.; Zenkina, O.V. Reducing the resistance for the use of electrochemical impedance spectroscopy analysis in materials chemistry. *RSC Adv.* **2021**, *11*, 27925–27936. [[CrossRef](#)]
21. Hernández, P.; Aguilar-Lira, G.Y.; Islas, G.; Rodríguez, J.A. Development of a New Voltammetric Methodology for the Determination of Ciprofloxacin in Beef Samples Using a Carbon Paste Electrode Modified with Nafion and Fullerenes. *Electroanalysis* **2021**, *33*, 1539–1546. [[CrossRef](#)]
22. Seguro, I.; Rebelo, P.; Pacheco, J.G.; Delerue-Matos, C. Electropolymerized, Molecularly Imprinted Polymer on a Screen-Printed Electrode—A Simple, Fast, and Disposable Voltammetric Sensor for Trazodone. *Sensors* **2022**, *22*, 2819. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Presentaciones en Congresos

- **Herpetology Seminar Series**, Septiembre 2020

“Fighting Fire with Fire: The Potential use of Mexican Snake Venoms Against Tumors”.

- **27th Meeting of the French Society of Toxinology (SFTET)**, Diciembre 2021

“Nano-rattlers Against Cancer: Snake-Venom loaded Nanoparticles Against Tumoral Cell lines”

- **XXX International Materials Research Congress**, Agosto 2022

“Cytotoxic Activity of the Black-tailed Rattlesnake Venom-loaded Chitosan Nanoparticles Against Breast Cancer Cells”

- **Pathogens and Natural Toxins e-Conference**, Agosto 2022

“Rattling Cancer Away: Rattlesnake Venom-loaded Nanoparticles Against Tumoral Cell lines”