

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**  
**FACULTAD DE QUÍMICA**  
**PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS**  
**QUÍMICO BIOLÓGICAS**

**Evaluación del efecto de compuestos inhibidores de hialuronidasas sobre la toxicidad inducida por el veneno de *Poecilotheria regalis*.**

**TESIS**

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS**

**PRESENTA:**

L. en B. VALERIE ANAHID TINOCO LAZCANO

**DIRIGIDA POR:**

DR. JOSE ALEJANDRO GARCÍA ARREDONDO

QUERÉTARO  
ENERO 2023  
MÉXICO



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales de  
Información



Evaluación del efecto de compuestos inhibidores de  
hialuronidasas sobre la toxicidad inducida por el veneno  
de *Poecilotheria regalos*.

**por**

Valerie Anahid Tinoco Lazcano

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons  
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional](#).

**Clave RI:** FQMAC-300255-0223-223



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO  
FACULTAD DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

Evaluación del efecto de compuestos inhibidores de hialuronidasas sobre la toxicidad inducida por el veneno de *Poecilotheria regalis*.

TESIS

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

PRESENTA:

L. en B. VALERIE ANAHID TINOCO LAZCANO

DIRIGIDA POR:

DR. JOSE ALEJANDRO GARCÍA ARREDONDO

COMITÉ TUTORAL

Dr. Jose Alejandro García Arredondo

Presidente

Dr. Mamadou Moustapha Bah

Secretario

Dra. Juana Isela Rojas Molina

Vocal

Dr. Octavio Roldán Padrón

Suplente

M. en C. Luis Humberto Rodríguez Ríos

Suplente

\_\_\_\_\_  
Dra. Silvia Lorena Amaya Llano  
Directora de la Facultad de Ciencias Químicas

\_\_\_\_\_  
Dra. Guadalupe Flavia Loarca Piña  
Directora de Investigación y Posgrado

Centro Universitario  
Santiago de Querétaro  
Enero 2023

## **DEDICATORIA**

Este trabajo se lo dedico a mi hija, quien quiero que siempre crea en sí misma, que jamás se rinda y cumpla todos sus propósitos en la vida.

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer primeramente a mis padres, hermanos, hija y pareja por todo su amor y soporte durante el desarrollo de esta tesis, por siempre brindarme tiempo y siempre recordarme lo valioso y gratificante que es terminar una meta.

A mi director de tesis por siempre apoyarme, brindarme ideas, aclarar mis dudas que con mucha paciencia y claridad me resolvía. A mis sinodales por leer mis escritos, escuchar mis presentaciones y siempre brindarme una crítica constructiva para mejorar como profesionista. A la Doctora Alejandra Rojas por ser muy firme y enseñarme que el camino de la ciencia es duro, pero siempre te da satisfacción lograr un mérito profesional. A mis compañeros de clase por desarrollar un nuevo nivel de competitividad profesional en mí y darme sus críticas en todas mis presentaciones. Al programa de Beca CONACYT. Finalmente, a mí misma por no desistir de esta labor y crecer como persona y profesionista.

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras. Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.



**L. en B. Valerie Anahid Tinoco Lazcano**

# ÍNDICE

	Página
RESUMEN	11
ABSTRACT	12
1. INTRODUCCIÓN	13
2. ANTECEDENTES	16
2.1 Animales venenosos: los terafósidos	16
2.2 Tarántula arbórea <i>Poecilotheria regalis</i> Pocock (1899)	18
2.2.1 Efectos fisiológicos de la mordedura de <i>Poecilotheria</i>	19
2.2.2 Composición del veneno de <i>Poecilotheria</i>	20
2.3 Especificaciones de las hialuronidasas	23
2.4 Matriz extracelular	28
2.4.1 Generalidades del ácido hialurónico	29
2.5. Inhibidores de hialuronidasas	30
2.6. Plantas consideradas en este estudio para la búsqueda de actividad anti-hialuronidasa	32
2.6.1 <i>Lantana camara</i> L.	32
2.6.2 <i>Fumaria officinalis</i> L.	35
2.6.3 <i>Ceiba speciosa</i> (A. St.-Hil.) Ravenna	36
2.6.4. Género <i>Ipomoea</i>	37
2.6.5. <i>Prunus serotina</i> Ehrh.	39
2.6.6. <i>Myrtillocactus geometrizans</i> (Martyr. Ex Pfeiff.) Console.	40
3. JUSTIFICACIÓN	42
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	44
5. HIPÓTESIS	45
6. OBJETIVOS	46
6.1 Objetivo General	46
6.2 Objetivos específicos	46
7. MATERIALES Y MÉTODOS	47
7.1 Obtención de los organismos de <i>Poecilotheria regalis</i>	47
7.2 Animales de experimentación	47
7.3 Extracción del veneno	48

7.4 Cuantificación de proteínas	48
7.5 Recolección del material vegetal y obtención de los extractos	49
7.6 Evaluación de la inhibición de la actividad de tipo hialuronidasa	50
7.7 Ensayo de toxicidad en grillos	51
7.8. Ensayo de toxicidad en ratones	52
7.9. Análisis estadístico	52
8. RESULTADOS	53
8.1 Especificidad de las enzimas de tipo hialuronidasa del veneno de <i>P. regalis</i>	53
8.2. Acción inhibitoria de los compuestos bioactivos sobre la actividad de hialuronidasa del veneno de <i>P. regalis</i>	55
8.3 Acción inhibitoria de los extractos etanólicos de las especies vegetales sobre la actividad de hialuronidasa del veneno de <i>P. regalis</i>	60
8.4. Efecto de los extractos sobre la toxicidad del veneno de <i>P. regalis</i> en grillos	67
8.5. Efecto de los extractos sobre la toxicidad del veneno de <i>P. regalis</i> en ratones	67
9. DISCUSIÓN	71
10. CONCLUSIÓN	76
11. REFERENCIAS	77



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Función fisiológica de las cadenas cortas de ácido hialurónico.....	25
Tabla 2. Hialuronidasas clasificadas por tipo y subtipo.....	26

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Partes de una tarántula ejemplificadas en un organismo del género <i>Brachypelma</i> .....	17
Figura 2. Fotografías de la parte ventral y dorsal de un organismo hembra de <i>Poecilotheria regalis</i> .....	19
Figura 3. Representación de las familias de toxinas con complejo ICK encontradas en el veneno de cuatro especies de arácnidos no emparentados entre sí.....	22
Figura 4. Actividad de tipo hialuronidasa de venenos de diferentes especies de tarántula. ....	23
Figura 5. Estructura de monosacáridos de los glicosaminoglicanos presentes en la matriz extracelular. ....	24
Figura 6. Conformación tipo barril de hialuronidasas de <i>Tityus serrulatos</i> (a) y <i>Apis mellifera</i> (b).....	28
Figura 7. Estructura del ácido hialurónico .....	30
Figura 8. Fotografía de un arbusto de <i>Lantana cámara</i> L. ....	34
Figura 9. Fotografía de la planta <i>Fumaria officinalis</i> L .....	35
Figura 10. Fotografía de un árbol de <i>Ceiba speciosa</i> (A. St.-Hil.) Ravenna.....	37
Figura 11. Fotografía de un árbol de <i>Ipomoea murucoides</i> . Roem. y Schult. ....	39
Figura 12. Fotografía de fruto de <i>Prunus serotina</i> Ehrh.....	40
Figura 13. Fotografía de fruto de <i>Myrtillocactus geometrizans</i> (Martyr. Ex Pfeiff.) Console. ....	41
Figura 14. Especificidad de las enzimas tipo hialuronidasa presentes en el veneno de <i>P. regalis</i> .....	54
Figura 15. Actividad de hialuronidasa del veneno de <i>P. regalis</i> (Prv, 20 µg/ml) en presencia de diferentes concentraciones (100, 200 y 300 µM) de ácido aristolóquico (A), ácido nordihidroguaiarético (B), catequina (C) y curcumina (D). *Presentó diferencia significativamente menor con respecto al control (Prv) (P < 0.05).....	56
Figura 16. Actividad de hialuronidasa del veneno de <i>P. regalis</i> (Prv, 20 µg/ml) en presencia de diferentes concentraciones (100, 200 y 300 µM) de indometacina (A), quercetina (B) y naringenina (C). *Presentó diferencia significativamente menor con respecto al control (Prv) (P < 0.05).....	57
Figura 17. Actividad de la hialuronidasa de testículo bovino (HAasa, 20 µg/ml) en presencia de diferentes concentraciones (100, 200 y 300 µM) de ácido aristolóquico (A), ácido nordihidroguaiarético (B), catequina (C) y curcumina (D). *Presentó diferencia significativamente menor con respecto al control (Prv) (P < 0.05).....	58
Figura 18. Actividad de la hialuronidasa de testículo bovino (HAasa, 20 µg/ml) en presencia de diferentes concentraciones (100, 200 y 300 µM) de indometacina (A), quercetina (B) y naringenina (C).....	59
Figura 19. Actividad de hialuronidasa del veneno de <i>P. regalis</i> (Prv, 20 µg/ml) en presencia de diferentes concentraciones (100, 200, 500 y 1000 µg/ml) de los extractos etanólicos de <i>Lantana camara</i> L. (A), <i>Fumaria officinalis</i> L. (B), <i>Ceiba speciosa</i> (A. St.-Hil.)	

Ravenna (C) y del extracto metanólico de tallo de <i>Croton ciliatoglandulifer</i> Ortega (D).	
*Presentó diferencia significativamente menor con respecto al control (Prv) ( $P < 0.05$ )....	61
Figura 20. Actividad de hialuronidasa del veneno de <i>P. regalis</i> (Prv, 20 $\mu\text{g/ml}$ ) en presencia de diferentes concentraciones (100, 200, 500 y 1000 $\mu\text{g/ml}$ ) de los extractos etanólicos de <i>Ipomoea murucoides</i> Roem. y Schult (A), <i>Ipomoea stans</i> Cav. (B), <i>Ipomoea purpúrea</i> (L.) Roth (C) e <i>Ipomoea cairica</i> (L.) Sweet (D).....	62
Figura 21. Actividad de hialuronidasa del veneno de <i>P. regalis</i> (Prv, 20 $\mu\text{g/ml}$ ) en presencia de diferentes concentraciones (100, 200, 500 y 1000 $\mu\text{g/ml}$ ) de los extractos etanólicos de <i>Ipomoea cardiophylla</i> A. Gray (A), <i>Prunus serotina</i> Ehrh. (B), <i>Myrtillocactus geometrizans</i> (Martr. Ex Pfeiff.) Console (C) y del extracto metanólico de raíz de <i>Croton ciliatoglandulifer</i> Ortega (D). .....	63
Figura .22 Actividad de la hialuronidasa de testículo bovino (HAasa, 20 $\mu\text{g/ml}$ ) en presencia de diferentes concentraciones (100, 200, 500 y 1000 $\mu\text{g/ml}$ ) de los extractos etanólicos de <i>Lantana camara</i> L. (A), <i>Fumaria officinalis</i> L. (B), <i>Ceiba speciosa</i> (A. St.-Hil.) Ravenna (C) y del extracto metanólico de tallo de <i>Croton ciliatoglandulifer</i> Ortega (D).	
*Presentó diferencia significativamente menor con respecto al control (Prv) ( $P < 0.05$ )....	64
Figura 23. Actividad de la hialuronidasa de testículo bovino (HAasa, 20 $\mu\text{g/ml}$ ) en presencia de diferentes concentraciones (100, 200, 500 y 1000 $\mu\text{g/ml}$ ) de los extractos etanólicos de <i>Ipomoea murucoides</i> Roem. y Schult (A), <i>Ipomoea stans</i> Cav. (B), <i>Ipomoea purpurea</i> (L.) Roth (C) e <i>Ipomoea cairica</i> (L.) Sweet (D).....	65
Figura 24. Actividad de la hialuronidasa de testículo bovino (HAasa, 20 $\mu\text{g/ml}$ ) en presencia de diferentes concentraciones (100, 200, 500 y 1000 $\mu\text{g/ml}$ ) de los extractos etanólicos de <i>Ipomoea cardiophylla</i> A. Gray (A), <i>Prunus serotina</i> Ehrh. (B), <i>Myrtillocactus geometrizans</i> (Martr. Ex Pfeiff.) Console (C) y del extracto metanólico de raíz de <i>Croton ciliatoglandulifer</i> Ortega (D). .....	66
Figura .25 Toxicidad del veneno de <i>P. regalis</i> (dos veces la $DL_{50}$ ) en grillos.....	68
Figura 26. Toxicidad del veneno de <i>P. regalis</i> (dos veces la $DL_{50}$ ) en grillos.. .....	69
Figura 27. Toxicidad del veneno de <i>P. regalis</i> (dos veces la $DL_{50}$ ) en grillos.....	70

## RESUMEN

Las tarántulas poseen venenos que están constituidos por mezclas complejas de compuestos que actúan en conjunto para paralizar a sus presas o ahuyentar depredadores. La gran mayoría de las tarántulas no representan un peligro significativo para el ser humano. Sin embargo, las especies pertenecientes al género *Poecilotheria* son consideradas de importancia clínica por los síntomas que provocan. Se estima que en el 58% de los casos clínicos registrados por mordedura de *Poecilotheria*, se presentan calambres musculares fuertes que pueden durar varios días, dolor intenso, aumento de la frecuencia cardíaca e incluso pérdida de conciencia. Las enzimas de tipo hialuronidasa son un componente común que se ha encontrado en los venenos de tarántulas. La presencia de estas enzimas en los venenos facilita la distribución de sus componentes entre los tejidos mediante la hidrólisis del ácido hialurónico de la matriz extracelular. En algunas investigaciones con venenos de serpiente y alacrán, se han probado compuestos que actúen como inhibidores de hialuronidasas, mismos que pueden servir como coadyuvantes en el tratamiento del envenenamiento. Sin embargo, no se han realizado estudios para encontrar compuestos que inhiban de manera específica a hialuronidasas de venenos de tarántula y se desconoce si la inhibición de estas enzimas podría funcionar como estrategia para disminuir la toxicidad de los venenos de especies del género *Poecilotheria*. Por lo tanto, el objetivo de esta propuesta fue evaluar el efecto de compuestos inhibidores de hialuronidasa sobre la toxicidad inducida por el veneno de *Poecilotheria regalis*. Para esto, se evaluó la efectividad de compuestos con actividad anti-hialuronidasa previamente comprobada con venenos de serpiente y se buscaron nuevos compuestos anti-hialuronidasa en extractos etanólicos de diversas plantas medicinales. Se empleó un método turbidimétrico para determinar la actividad de hialuronidasa. Los resultados indicaron que la catequina y la indometacina, así como los extractos de *Prunus serotina* y *Myrtillocactus geometrizans* redujeron significativamente la actividad de hialuronidasa del veneno (Prueba de Dunnett,  $P < 0.05$ ). Por otro lado, se encontró que solamente los extractos de *Ipomoea murucoides* y *Ceiba speciosa* redujeron significativamente la toxicidad en grillos provocada por el veneno. Se evaluó la capacidad del extracto de *I. Murocoides* para reducir la toxicidad en ratones, pero no se observaron cambios significativos. Estos resultados sugieren que las especies *Ipomoea murucoides* y *Ceiba speciosa* podrían estar inhibiendo la actividad de otros componentes del veneno.

**Palabras clave:** Hialuronidasas, Veneno de tarántula, *Poecilotheria*, Actividad anti-hialuronidasa

## ABSTRACT

Tarantulas have venoms that are constituted by complex mixtures of compounds that act together to paralyze their prey or keep away predators. It is known that the majority of tarantulas do not represent a significant danger to humans. However, the species belonging to the *Poecilotheria* genus are considered by some authors to be of clinical importance due to the symptoms they cause. It is estimated that in 58% of the recorded clinical cases of *Poecilotheria* bites, strong muscle cramps occur, which can last for several days. In some patients, symptoms such as intense pain, increased heart rate and even loss of consciousness usually occur. Hyaluronidase-type enzymes are a common component that has been found in tarantula venoms. The presence of these enzymes in venoms facilitates the distribution of their components between tissues through hydrolysis of hyaluronic acid in the extracellular matrix. In some investigations with snake and scorpion venoms, the search for compounds that act as hyaluronidase inhibitors has been conducted, which could serve as adjuvants in the treatment of envenomation. However, no studies have been conducted to find compounds that specifically inhibit tarantula venom hyaluronidases, and it is unknown whether the inhibition of these enzymes could work as a strategy to reduce the toxicity of the venoms from species of the genus *Poecilotheria*. Therefore, the objective of this proposal was to evaluate the effect of hyaluronidase inhibitor compounds on the toxicity induced by *Poecilotheria regalis* venom. For this, the effectiveness of compounds with previously proven anti-hyaluronidase activity with snake venom evaluated, and new anti-hyaluronidase compounds searched in ethanolic extracts of various medicinal plants. A turbidimetric method was used to determine the hyaluronidase activity. The results indicated that catechin and indomethacin, as well as extracts from *Prunus serotina* and *Myrtillocactus geometrizans* significantly reduced the hyaluronidase activity of the venom (Dunnnett test,  $P < 0.05$ ). On the other hand, it was found that only those of *Ipomoea murucoides* and *Ceiba speciosa* reduced the toxicity in crickets caused by the poison. The ability of *I. murucoides* extract to reduce the toxicity of the venom in mice was evaluated, but no significant changes were observed. These results suggest that *Ipomoea murucoides* and *Ceiba speciosa* species could be inhibiting the activity of other venom components.

**Key words:** hyaluronidases, tarantula venom, *Poecilotheria*, anti-hyaluronidase activity.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las tarántulas (reino Animal, clase Arachnida, orden Araneae, infraorden Mygalomorphae, familia Theraphosidae), también conocidas como terafósidos, son organismos depredadores obligados que se alimentan de una gran variedad de especies de igual o menor tamaño que ellas, tanto vertebrados como invertebrados. Para esto, poseen venenos que están constituidos por mezclas complejas de compuestos, principalmente neurotóxicos, que actúan en conjunto de manera efectiva para paralizar a sus presas o ahuyentar posibles depredadores (Escoubas y Rash, 2004). Es debido a su gran tamaño, que se facilita la extracción de su veneno en cantidades considerables sin necesidad de sacrificar al animal para extraer su glándula venenosa (Rocha-e-Silva *et al.*, 2009). Además, debido a la diversidad de componentes que presentan sus venenos, las tarántulas son consideradas como una fuente importante de nuevos compuestos bioactivos que podrían ser aprovechados *para* el desarrollo de nuevos prototipos de fármacos, herramientas farmacológicas para investigación y compuestos biotecnológicos con aplicaciones bactericidas, antimicrobianas (Borda *et al.*, 2016) e insecticidas (Ikonomopoulou *et al.*, 2016).

Se sabe que la gran mayoría de las tarántulas no representan un peligro significativo para el ser humano y hasta el momento, no se ha registrado ningún caso de muerte provocado por una mordedura de tarántula (Escoubas y Rash, 2004). Sin embargo, existen algunas especies que han llegado a considerarse como factores de riesgo para la salud por los síntomas que se presentan tras sus mordeduras. Entre estas especies, destacan las pertenecientes al género *Poecilotheria*, constituido por 15 especies de tarántulas arborícolas altamente agresivas y rápidas que habitan en Sri Lanka e India (WSC, 2020), gran parte de las cuales son ampliamente comercializadas como mascotas exóticas en todo el mundo (CITES, 2019). Existen pocos reportes clínicos al respecto, pero se estima que en el 58% de los casos registrados de mordedura de tarántulas del género *Poecilotheria*, se han presentado calambres musculares fuertes como síntoma característico, mismos que pueden durar varios días. Además, en algunos casos, suelen presentarse otros síntomas como dolor intenso, aumento de la frecuencia

cardiaca e incluso pérdida de conciencia (Fuchs *et al.*, 2013). En algunos estudios toxicológicos previos, se reportó que la dosis letal media (DL<sub>50</sub>) del veneno de *Poecilotheria regalis* en grillos (*Acheta domestica*) fue de  $5.23 \pm 3.1 \mu\text{g/g}$ , y en ratones, de  $10.76 \pm 2.038 \mu\text{g}$  (García-Arredondo *et al.*, 2015; Díaz-Peña, 2017); esto implica mayor toxicidad en comparación con la toxicidad de los venenos de otras especies de tarántula (Escoubas y Rash, 2004).

Las enzimas de tipo hialuronidasa son un componente común que se ha encontrado en los venenos de tarántulas. Por ejemplo, se ha reportado la presencia de varias isoformas de enzimas de tipo hialuronidasa en los venenos de algunas especies del género *Poecilotheria* (Rodríguez-Ríos *et al.*, 2017). Se sabe que la presencia de estas enzimas en los venenos facilita la distribución de sus componentes entre los tejidos mediante la hidrólisis del ácido hialurónico de la matriz extracelular (Stern *et al.*, 2006). De manera general, las hialuronidasas, metaloproteasas y algunas miotoxinas, se conocen como factores de dispersión comunes en algunos venenos (Santhosh *et al.*, 2013). Además de estos factores de dispersión, se ha encontrado que algunos componentes de diversos venenos ejercen un efecto vasodilatador local, mismo que incrementa la permeabilidad vascular, ayudando también a la distribución del veneno en los tejidos (Thibeault *et al.*, 2010; Sánchez *et al.*, 2013). Relacionado a esto, se ha reportado que el veneno de *P. regalis* presenta un efecto vasodilatador sobre segmentos de aorta aislada de rata (Díaz-Peña *et al.*, 2019). Por lo tanto, es probable que la presencia de componentes vasodilatadores y enzimas de tipo hialuronidasa en los venenos del género *Poecilotheria* aceleren el proceso de envenenamiento, generando mayor toxicidad que los venenos de tarántulas de otros géneros.

Debido a la importancia que tienen las enzimas de tipo hialuronidasa en la distribución de las toxinas de los venenos de varias especies, en algunas investigaciones se ha planteado la búsqueda de compuestos que actúen como inhibidores de hialuronidasas, mismos que pueden servir como coadyuvantes en el tratamiento del envenenamiento. Actualmente, no existe un tratamiento específico para contrarrestar los síntomas causados por las mordeduras de estas tarántulas, además de que hay poca información sobre el proceso de envenenamiento y la composición del veneno. En algunos estudios, se ha encontrado buena actividad

inhibitoria en extractos polares de plantas medicinales (Girish *et al.*, 2009; Tomohara *et al.*, 2017). Algunos compuestos puros como el ácido aristolóquico, curcumina, quercetina, catequina e indometacina, han mostrado una alta actividad inhibitoria de hialuronidasas de venenos de serpiente (Girish y Kemparaju, 2005). Sin embargo, se desconoce si estos inhibidores, que han mostrado alta actividad inhibitoria sobre isoformas de hialuronidasa de serpiente, pudieran inhibir con la misma efectividad a las hialuronidasas presentes en los venenos de tarántula, ya que hasta el momento no existe un tratamiento específico para atender el envenenamiento causado por especies del género *Poecilotheria*.

En la presente propuesta de investigación, se evaluó la capacidad que tienen algunos compuestos con actividad inhibitoria de hialuronidasas de veneno de serpiente, para inhibir la actividad de hialuronidasa del veneno de la tarántula *P. regalis*. Del mismo modo, se evaluó por primera vez la actividad anti-hialuronidasa sobre el veneno de *P. regalis* de extractos etanólicos de algunas plantas comunes en México, que se recomiendan en la medicina tradicional como tratamiento alternativo para el envenenamiento. Esta información será de utilidad para determinar el uso potencial de las plantas analizadas como fuentes de nuevos inhibidores de hialuronidasa, además de establecer la importancia de las enzimas de tipo hialuronidasa en el proceso de envenenamiento causado por la tarántula *Poecilotheria regalis*. Dicha información ayudará también a establecer nuevas estrategias para el desarrollo de tratamientos adecuados de bajo costo para las mordeduras causadas por estas especies.



## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Animales venenosos: los terafósidos

La capacidad de adaptación y supervivencia de la mayoría de los organismos existentes ha sido posible gracias al desarrollo de estrategias de protección y obtención de alimento, como es el caso de las interacciones presa-depredador, donde se presentan venenos para lograr la supervivencia. Los venenos son una mezcla de toxinas, enzimas, aminoácidos libres, péptidos, sales, entre otros. En su mayoría, el veneno es producido y almacenado en glándulas especiales (Zhang, 2015). Dentro de los animales que presentan veneno, se encuentran los anfibios, reptiles, insectos y arácnidos. Entre los arácnidos, se encuentran las tarántulas, también conocidas como terafósidos porque pertenecen a la familia Theraphosidae (reino Animal, clase Arachnida, orden Araneae, infraorden Mygalomorphae, familia Theraphosidae). Esta familia cuenta con una diversidad de 1005 especies agrupadas en 151 géneros (WSC, 2020). Una característica de las especies de esta familia es que son más grandes que el resto de las arañas. Además, la estrategia de las tarántulas para obtener su alimento, a diferencia de la mayoría de los arácnidos que usan trampas de telaraña, consiste en cacería al acecho (Cuéllar-Balleza *et al.*, 2017).

La morfología de los terafósidos está explicada en 3 partes del cuerpo: el cefalotórax, abdomen y aparatos locomotores (Figura 1 a). El cefalotórax, también llamado prosoma, tiene dos vistas. En la vista dorsal, se aprecian el trocánter, que es la parte quitinosa donde surgen las articulaciones de cada pata para su movilidad (ver Figura 1 c); además se encuentra la coxa, el escudo prosómico y el área ocular y la vista ventral, donde se tiene el esternón y el labio, situados justo debajo de los quelíceros. En el abdomen es donde se ubican todos los órganos internos y superficialmente se ven los estigmas y el ano. Los aparatos locomotores están constituidos por siete segmentos mostrados en la Figura 1 c; cada una está dotada con dos garras y un cojín de pelos adhesivos para trepar y, por último, los pedipalpos, que pueden parecer patas, pero estos no son utilizados para la locomoción, más bien funcionan como sensores para captar a la presa, para

excavar y para reproducirse. Los quelíceros son las partes donde se encuentra el inicio del aparato succionador, los colmillos o dientes y es aquí donde se produce el veneno del animal (Caratozzolo, 2016; CCA, 2017).

Se tienen registrados de al menos 12 géneros de tarántulas con relevancia clínica, ya que, de los géneros restantes, se conoce que su efecto generalmente consiste en dolor leve y enrojecimiento que dura aproximadamente 30 minutos.

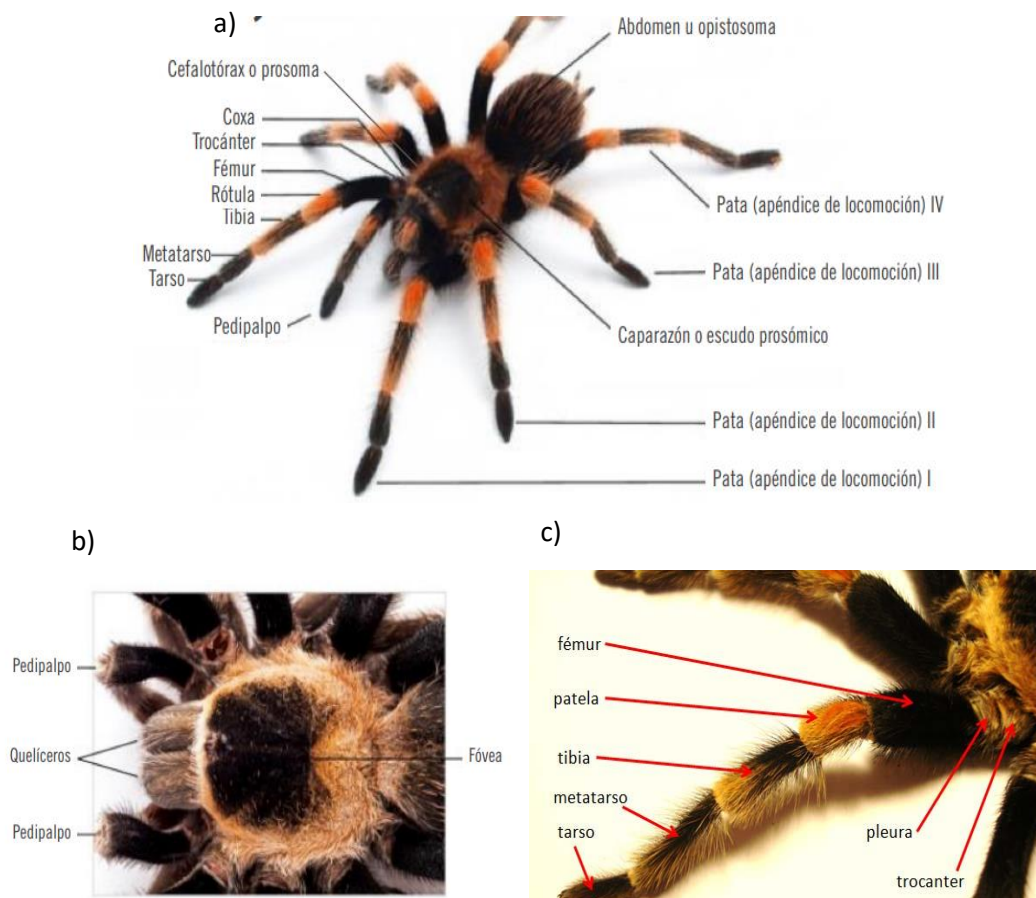


Figura 1. Partes de una tarántula ejemplificadas en un organismo del género *Brachypelma*. Donde: a) cuerpo completo del organismo señalando cefalotórax, abdomen y patas, b) vista dorsal del cefalotórax y c) los artejos de una pata (modificado de Cuéllar-Balleza *et al.*, 2017).

Los géneros con implicaciones médicas en los humanos y animales domésticos son endémicos del Sur de África, India y Australia, donde destacan las mordeduras de las especies del género *Poecilotheria* porque produce síntomas dolorosos como calambres y espasmos que se expanden por todo el cuerpo (Gwaltney-Brant *et al.*, 2018; Fuchs *et al.*, 2013).

## **2.2 Tarántula arbórea *Poecilotheria regalis* Pocock (1899)**

Es comúnmente llamada “tarántula ornamental india” o “araña paracaídas real” (Breene *et al.*, 2003). Su distribución silvestre se encuentra restringida a la India en la zona sur en Maharastra, Karnataka, Andhra Pradesh, Tamil Nady, Kerala y la isla Sri Lanka. Su cuerpo mide entre 6 y 8 cm. Contemplando las patas llega a medir 16 cm, mientras que sus quelíceros tienen un tamaño promedio de 10 mm. El dorso de su cuerpo presenta colores azules, amarillos, blancos y cafés; su seña distintiva es una mancha en forma de hoja en el opistosoma, así como franjas azules y amarillas intercaladas a lo largo de sus artejos por la parte ventral (Figura 2). Los organismos femeninos llegan a vivir de 8-12 años y los masculinos de 2-4 años. *P. regalis* es la especie comúnmente encontrada en ecosistemas arbóreos y plantaciones de teca en India, preferiblemente en los árboles viejos donde se pueden camuflajear con el tronco, musgos y líquenes que le crecen. Se ha visto que su población va en decrecimiento y su hábitat ha presentado grandes pérdidas de área, quedando restringido a zonas más específicas (Fuchs *et al.*, 2013; Molur *et al.*, 2004; CITES, 2019). Sin embargo, aún no se encuentran en la Lista Roja de Especies Amenazadas de la IUCN (Molur y Siliwal, 2008).



Figura 2. Fotografías de la parte ventral y dorsal de un organismo hembra de *Poecilotheria regalis*. (Fuch *et al.*, 2013).

### 2.2.1 Efectos fisiológicos de la mordedura de *Poecilotheria*

Las mordeduras de las especies del género *Poecilotheria* ocasionan síntomas como: calambres, mareos, hinchazón y enrojecimiento de la zona principal dañada, en algunos casos puede presentarse fiebre, respiraciones aceleradas, hiperalgesia o inclusive pérdida de la conciencia (Fuchs *et al.*, 2013). Algunos de estos síntomas podrían estar asociados con la actividad vasodilatadora del veneno (Díaz-Peña *et al.*, 2019). Se ha reportado que el dolor inicial de la mordedura es similar al dolor causado por el piquete de una abeja, con lapsos de sofoco durante las primeras 2 horas después de la mordida, misma que no se muestra muy visible. Unas 10-15 h después de la mordida, se pueden presentar calambres musculares intensos en las extremidades con una probabilidad del 58%, teniendo una duración de 1-7 días o en casos extremos hasta 4 semanas. Las personas afectadas por la mordedura, además, suelen presentar dolor intenso (Fuchs *et al.*, 2013). Los efectos tóxicos de algunas especies de este género también se han observado experimentalmente (Andreev-Andrievskiy *et al.*, 2017). En experimentos con ratones, se observó que

los venenos producen diferentes movimientos musculares como: convulsiones, convulsión única, estereotipia, espasmos y calambres.

Las tarántulas del género *Poecilotheria* se han reportado como unas de las más comercializadas como mascotas, debido a sus colores llamativos y sus altas tasas de mortalidad. A pesar de su actual estatus dentro de la lista roja IUCN (Molur y Siliwal, 2008), se tienen registros alarmantes sobre su importación, siendo más de 22,978 especímenes entre 2016 y 2017 a Estados Unidos y entre 2013 y 2017, fueron registrados 16,519 especímenes exportados de la India (CITES, 2019). Se ha registrado que los dueños de tarántulas suelen estar bien informados de los síntomas de la mordedura de sus mascotas; sin embargo, dada la naturaleza violenta y de acción rápida de estos terafósidos, resulta inevitable que se presenten casos de mordeduras. En estos casos, se han descrito un promedio de dos casos por año. Aunque no se considera un alto índice de casos, los síntomas causados son dolorosos y en algunos casos llegan a persistir durante de 7 días y hasta 4 semanas (Fuchs *et al.*, 2013).

### **2.2.2 Composición del veneno de *Poecilotheria***

Las tarántulas son bien conocidas por su rol de depredador en los ecosistemas, por lo que, con el fin de obtener alimento y defensa, las tarántulas han desarrollado un mecanismo externo y no físico para capturar a sus presas y ahuyentar a sus posibles depredadores. El veneno está compuesto por una variedad de moléculas encargadas de actuar en conjunto para paralizar a sus presas. Se sabe que de un solo individuo se puede obtener de entre 20-50  $\mu$ l de veneno, considerándose necesario y poco invasivo drenar el veneno de un individuo con descanso de 2-5 semanas con un máximo de 5 veces al año (Andreev-Andrievskiy *et al.*, 2017). El veneno de *Poecilotheria* se puede separar en dos fracciones, fracción proteínica y no proteínica (con peso molecular menor a 8 kDa). Dentro de la fracción no proteínica se encuentran sales y otras moléculas orgánicas pequeñas, incluidos algunos péptidos libres, mientras que, para la fracción proteínica, se han determinado proteínas con pesos moleculares de entre 15 y 110 kDa, teniendo mayor expresión de compuestos proteínicos de cerca de los 83 a 114 kDa. Las

proteínas que presentan pesos moleculares de entre 36 y 40 kDa son las que representan las enzimas de tipo hialuronidasa (Rodríguez-Ríos *et al.*, 2017; Díaz-Peña *et al.*, 2019).

En cuanto al mecanismo de acción del veneno, se tienen registros de la acción conjunta que tienen los venenos entre enzimas y péptidos para propagar y accionar el envenenamiento en la presa. Esta acción conjunta consta de la acción enzimática degradando la matriz extracelular para posteriormente dar paso a la acción del resto de los péptidos. Dentro del grupo de las tarántulas terrestres, se ha encontrado que son los componentes proteínicos los más abundantes, en su mayoría son péptidos que presentan ICK (por sus siglas en inglés Inhibitor cystine knot), esto les confiere una estabilidad estructural. Este residuo es de relevancia ya que los péptidos no son muy usados en la terapéutica por la baja estabilidad estructural que tienen, situación que se ha visto controlada en los péptidos de venenos con ICK puestos a prueba como posibles prototipos. En el estudio realizado por Oldrati *et al.*, (2017), encontraron que todos los arácnidos, aunque estén filogenéticamente alejados, presentan entre el 30% y 45% de péptidos con ICK. En la Figura 3 se representan las familias de toxinas que dentro de su estructura presentan ICK de cuatro especies de arácnidos no emparentados *Heteropoda davidbowie*, *Poecilotheria formosa*, *Viridasius fasciatus* y *Latrodectus mactans*, de las cuales solo *Poecilotheria* es de la familia Theraphosidae. El veneno de las tarántulas fue el mayormente concentrado en péptidos y toxinas ICK. Además, en este estudio, encontraron al menos 7 familias de toxinas en los venenos de cuatro especies de arácnidos no emparentados, las cuales corresponden a: huwentoxinas, licotoxinas, superfamilia CSTX (toxinas de *Cupiennius salei*), agatoxinas omega y beta/delta, frixotoxinas, familias Tx (theraphotoxinas) 1, 2 y 3, péptidos ICK. En la Figura 3 se observan todas las familias de toxinas encontradas con complejo ICK en cuatro arácnidos no emparentados, *Heteropoda davidbowie*, *Poecilotheria Formosa*, *Viridasius fasciatus*, *Latrodectus mactans*. En este mismo estudio, se encontró que la especie *P. formosa* presenta 41% de toxinas ICK en su veneno, con una variedad de 52 toxinas, de las cuales 35 son de la familia de las huwentoxinas, 6 son Tx, 1

relacionada con JzTx-56 (toxina identificada en *Chilobrachys jingzhao*) y 10 toxinas ICK no identificadas.

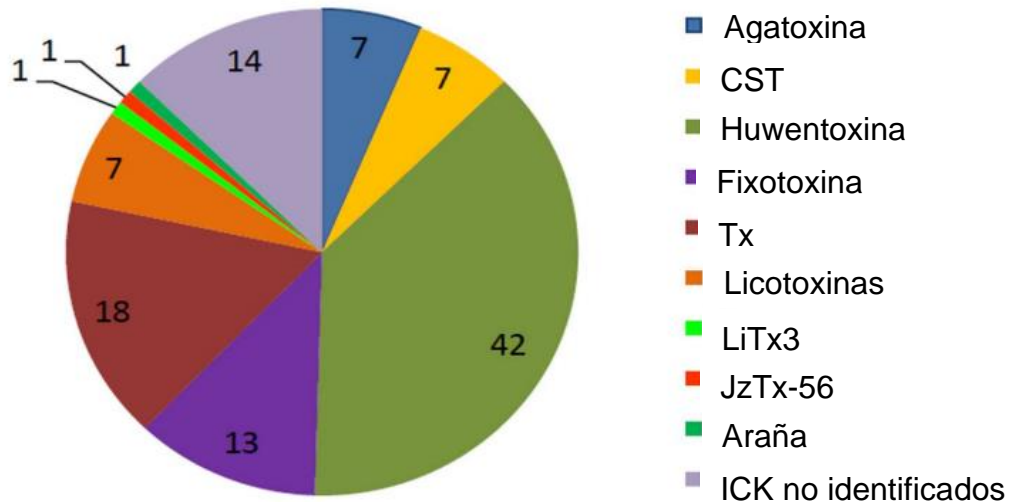


Figura 3. Representación de las familias de toxinas con complejo ICK encontradas en el veneno de cuatro especies de arácnidos no emparentados entre sí (Oldrati *et al.*, 2017).

Las acciones fisiológicas del veneno de *Poecilotheria regalis* engloban neurotoxicidad y miotoxicidad, y edemas. Estas reacciones fisiológicas se deben a la presencia de toxinas homólogas a latrotoxinas y necrotoxinas para acción neurotóxica. La presencia de Tx tipo  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\mu$ ,  $\kappa$  y  $\omega$  está directamente relacionada con la miotoxicidad, dado que estas toxinas actúan en los canales voltaje dependientes de sodio, potasio y calcio (Bala *et al.*, 2017; Díaz-Peña, 2017).

Dentro de la fracción proteica del veneno de las tarántulas, se encuentran las enzimas, mismas que se clasifican en dos grupos, las que actúan sobre la matriz extracelular, como las metaloproteasas y glucuronidasas, y las que actúan en la membrana celular, como las fosfolipasas. Las glucuronidasas son enzimas encargadas de degradar la matriz celular. Por lo tanto, las hialuronidasas están presentes como glucuronidasas en las arañas de la familia Theraphosidae,

Sicariidae, Herididae y Lycosidae, siendo estas enzimas las encargadas de la perfusión y dispersión del veneno, razón por la que se conocen también como “factores de dispersión” (Bordon *et al.*, 2015). En 2017, Rodríguez-Ríos y colaboradores realizaron un estudio de identificación de hialuronidasas en diferentes especies de la familia Theraphosidae, de las cuales resaltaron *Poecilotheria ornata*, *P. rufilata*, *Brachypelma smithi* y *Nhandu chromatus* con mayor actividad de hialuronidasa (Figura 4).

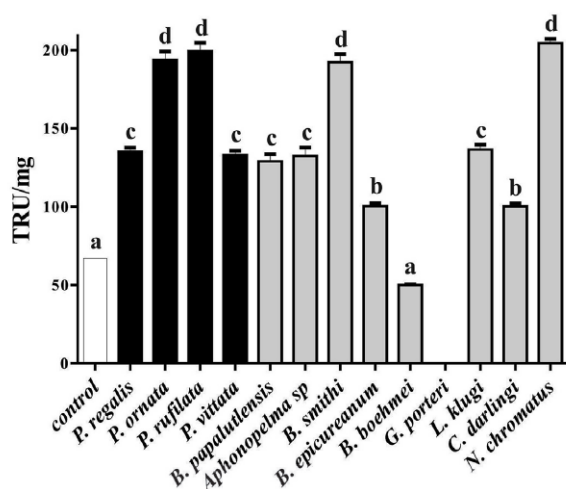


Figura 4. Actividad de tipo hialuronidasa de venenos de diferentes especies de tarántula (Rodríguez-Ríos *et al.*, 2017). La actividad está expresada en unidades turbidimétricas (TRU) por mg de sustrato.

### 2.3 Especificaciones de las hialuronidasas

Las hialuronidasas son las enzimas encargadas de degradar el ácido hialurónico presente en la matriz extracelular. La actividad de las hialuronidasas fue descubierta en 1928 por Duran Reynals. Sin embargo, la presencia de estas moléculas en los venenos de diferentes animales fue reportada hasta 1973. Estas enzimas se encuentran en el cuerpo humano en líquidos corporales como la placenta, lágrimas, sangre y espermatozoides, así como en la piel, bazo, hígado y riñones (Bordon *et al.*, 2015). Las hialuronidasas son un grupo de glucuronidasas que hidrolizan los polisacáridos de la familia de los ácidos glicosaminoglicanos presentes en la matriz extracelular,



como el ácido hialurónico, condroitina, sulfato de condroitina, sulfato de heparina y sulfato de dermatán (ver Figura 5).

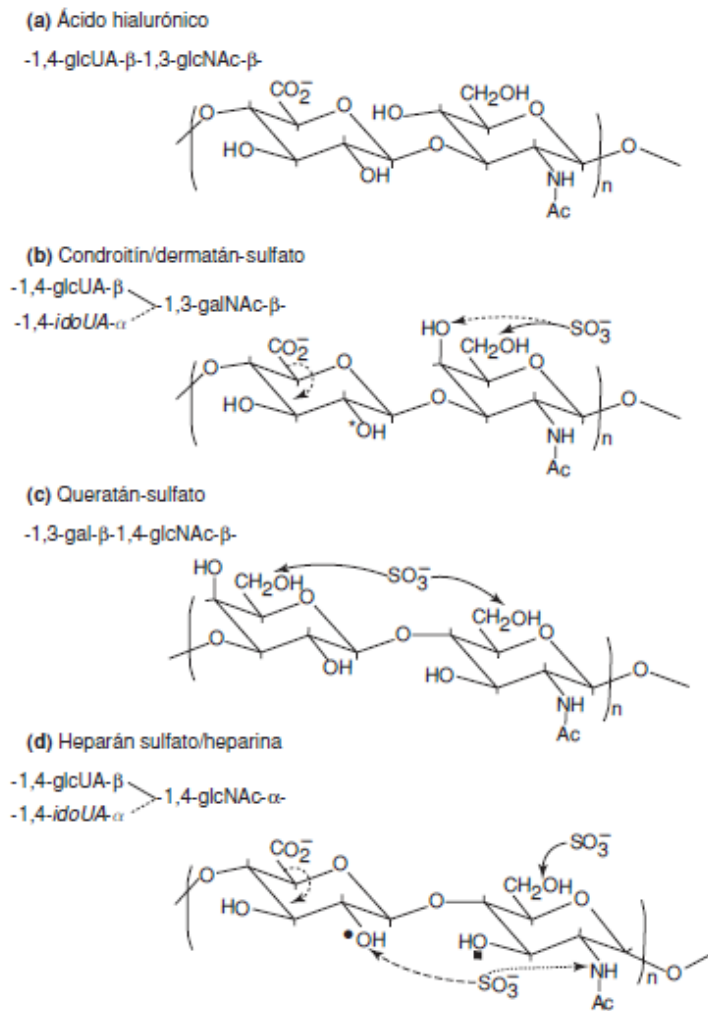


Figura 5. Estructura de monosacáridos de los glicosaminoglicanos presentes en la matriz extracelular (Pardo y Selman, 2003).

Cuando las hialuronidasas degradan el ácido hialurónico, generan oligosacáridos con propiedades antigénicas, proinflamatorias e inmunoestimuladoras, además de impedir la actividad de los minerales presentes en la matriz extracelular del tejido conectivo suave en los canales voltaje dependientes, factores de crecimiento y citosinas. Estas reacciones fisiológicas dependen de la cantidad de moléculas que se presentan como producto en la degradación del ácido hialurónico. Estos

productos tienen receptores específicos, los cuales son el HABP (por sus siglas en inglés hialuronic acid binding protein) y el CD44 (cluster de diferenciación) que es un receptor multifuncional de adhesión a la superficie celular. En la Tabla 1, se presenta un resumen de las acciones específicas que se obtienen por cada cadena de ácido hialurónico como producto de degradación (Girish *et al.*, 2009; Stern *et al.*, 2006; Senbanjo y Chellaiah, 2017; Buhren *et al.*, 2016).

Tabla 1. Función fisiológica de las cadenas cortas de ácido hialurónico (Stern *et al.*, 2006).

<b>Cadenas de ácido hialurónico como producto</b>	Función fisiológica y lugar de unión
4-6	HABP1, CD44 musculo liso y condrocitos, estimulación de citosinas
6-14	Ruptura de CD44, inducción de cáncer ovárico, carcinomas de pulmón (6 supresión de formación de HA articular)
10-40	Inducen citosinas de inflamación
8-32	Promueven angiogénesis

HABP = proteína de unión a ácido hialurónico, CD= cluster de diferenciación.

La degradación del ácido hialurónico en mamíferos se logra tras la incorporación de alguna de las endoglicosidasas para producir un producto de cierto peso que será el sustrato para las exoglicosidasas ( $\beta$ -N-acetilhexosaminadasa y  $\beta$ -glucuronidasas). Existen homólogos en el humano de  $\beta$ -N-acetilhexosaminadasa, que van a estar clasificadas según el tamaño de molécula de ácido hialurónico que fragmentan. Los homólogos son Hial-1, Hial-2 y PH-20 (Tabla 2). Las hialuronidasas de tipo Hial-1 se han detectado en la orina y fluidos corporales. En estudios clínicos, los niveles de esta enzima sirven como un marcador que detecta el cáncer de vejiga, así como la progresión del cáncer de próstata. Las mutaciones inactivas de la Hial-1 se encuentran vinculadas con el trastorno de mucopolisacaridosis IX. Tanto la Hial-1 como la Hial-2 funcionan como receptores para retrovirus de oveja Jaagsiekte.

Resulta interesante que los tres subtipos de hialuronidasa tipo 1 se han encontrado en los venenos de serpientes, escorpiones, abejas, avispa, arañas, orugas, peces y lagartijas, teniendo una función de propagación de toxinas al degradar el ácido hialurónico de la matriz extracelular, colapsando la estructura de este entorno y permitiendo así la propagación sistémica de los demás compuestos del veneno. Finalmente, las hialuronidasas de tipo PH-20 se encargan de la penetración del espermatozoide a través del folículo mediante la degradación del ácido hialurónico presente en el ovocito (Girish *et al.*, 2009).

Tabla 2. Hialuronidasas clasificadas por tipo y subtipo, en donde se menciona la ubicación en el cuerpo humano y la cantidad de residuos de ácido hialurónico que genera (Girish *et al.*, 2009).

<b>Enzima</b>	<b>Subtipo</b>	<b>Actividad</b>	<b>Ubicación</b>	<b>Producto final de HA (cantidad de moléculas de azúcar)</b>
<b><math>\beta</math>-N-acetil hexosa-minadasa</b>	Hial-1	<b>Endoglicosidasas</b>	Líquidos corporales en general	4-6
	Hial-2		Superficie exterior e interior de membrana plasmática	~100
	Hial-3		Testículos, médula ósea	ND
	Hial-4		Pseudogen	ND
	PH-20		Superficie de la membrana del espermatozoide	4-6
	PHYAL1		Pseudogen	ND

Hial = hialuronidasa, ND = no determinado.

En su mayoría, las hialuronidasas se encuentran en los venenos de algunos animales como los arácnidos, himenópteros y serpientes (Rebello *et al.*, 2014). En general, las hialuronidasas de animales venenosos, mamíferos y algunos microbios presentan hasta un 36% de homología entre sí. Se han determinado hialuronidasas en abejas constituidas por 349 aminoácidos y un peso molecular de 40.746 kDa con 7% de su estructura constituida por carbohidratos y 3 sitios de N-glicosilación (Girish *et al.*, 2009). La primera hialuronidasa de venenos en ser estudiada fue de escorpiones en el año 1928. Las hialuronidasas de abejas son el componente más estudiado dentro del veneno. Dentro del grupo de las arañas, las primeras hialuronidasas que fueron aisladas pertenecían a las especies *Lycosa raptoral* y *Phoneutria nigriventer*. Todas las hialuronidasas presentan una topología clásica  $(\beta/\alpha)_n$ , esto indica que la cantidad de hélices  $\beta$  y  $\alpha$  se encuentran en igual proporción y la n indica la cantidad de repeticiones por sección. Estas enzimas se acomodan en forma de barril TIM (triosa fosfato isomerasa), donde se encuentra el mismo número de hélices alfa y láminas beta. Dependiendo de la especie, se cuenta con un número específico de n; en el caso del escorpión *Tityus serrulatus*, este tiene una n de 9 (Figura 6a), mientras que la abeja, *Apis mellifera*, tiene una n de 7 (Figura 6b). En la Figura 6 se muestra la forma de barril de estas dos especies; además, se indican los residuos donde se encuentra el sitio activo de la enzima, que, para el caso de ambos ejemplos, son residuos de tipo ácido aspártico (D), ácido glutámico (E) y tirosina (Y). También se ha encontrado que, dentro del sitio catalítico de la hialuronidasa, se encuentran puentes disulfuro que servirán como refuerzo en el sitio catalítico, en donde la cantidad de estos dependerá del género o clase de la que provenga el veneno. En el caso de los arácnidos, se han encontrado seis puentes disulfuro en los aminoácidos Cys172 - Cys215, mientras que, en los

insectos, se han encontrado dos puentes disulfuro (Bordon *et al.*, 2015; Horta *et al.*, 2014; Marković-Housley *et al.*, 2000).

## 2.4 Matriz extracelular

La matriz extracelular es un conjunto de moléculas fibrosas secretadas por las células para comunicarse, mantenerse unidas y con humedad. Está constituida por agua, proteínas adherentes, una glucocálix compuesta de proteoglicanos y fibras (colágeno, elásticas y fibras reticulares). Las proteínas adherentes tienen la función de unir el tejido conectivo con las fibras de la matriz, mientras que la glucocálix atrapa el agua conforme se unen entre sí. La abundancia de polisacáridos presentes en la matriz extracelular es la que determina la consistencia gélida de este. Otros tipos de glicosaminoglicanos son el dermatán sulfato, que se encuentra en los vasos sanguíneos, cerebro y piel; el queratán sulfato y la heparina (Figura 6). El ácido hialurónico en comparación con otros glicosaminoglicanos no está sulfurado y se une a proteínas centrales, esta propiedad le permite actuar como pegamento para retener proteínas y monómeros de agregano para proporcionar así volumen y soporte a la matriz extracelular (Pardo y Selman, 2003).

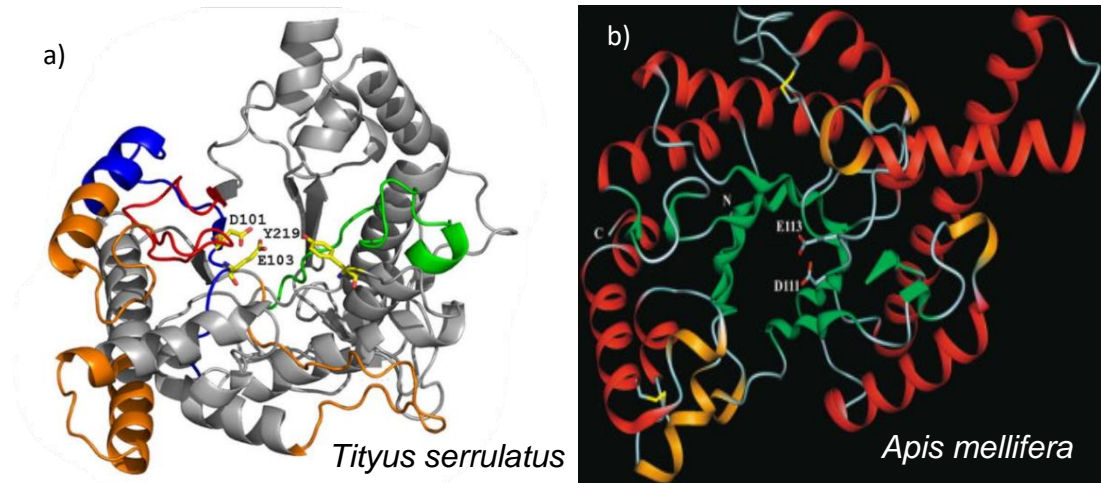


Figura 6. Conformación tipo barril de hialuronidasas de *Tityus serrulatus* (a) y *Apis mellifera* (b)

### 2.4.1 Generalidades del ácido hialurónico

El ácido hialurónico, también llamado hialuronano, es una cadena lineal y repetida de N-acetil- $\beta$ -D-glucosamina (GlcNAc) y ácido  $\beta$ -D-glucurónico (GlcUA) unidos con enlaces glicosídicos  $\beta$ -1,3 y  $\beta$ -1,4, como se muestra en la Figura 7. Es una molécula con carga negativa y peso molecular de más de  $2 \times 10^4$  kDa. Forma parte de la familia de los glicosaminoglicanos y se encuentra en la matriz extracelular de los tejidos conectivos suaves. Como se mencionó anteriormente, en comparación con otros glicosaminoglicanos, el ácido hialurónico no está sulfurado y se une a proteínas centrales. Esta propiedad le permite actuar como pegamento para retener proteínas y monómeros de proteoglicanos para proporcionar así volumen y soporte a la matriz extracelular (Bordon *et al.*, 2015; Stern *et al.*, 2006).

Entre las funciones del ácido hialurónico se encuentra la de brindar volumen y soporte a la matriz extracelular, también mantiene la interacción célula-matriz extracelular y la comunicación célula-célula. A diferencia de otros proteoglicanos, el ácido hialurónico es sintetizado por la parte interna de la membrana plasmática y no en el aparato de Golgi. Son las glicosiltransferasas transmembranales las encargadas de regular la síntesis del ácido hialurónico. Como actividad cementante, las moléculas de ácido hialurónico se unen para formar hialectinas como el agrecano, neurocano, versicano y brevicano. La estructura de las hialectinas presenta receptores de ácido hialurónico que funcionarían como mediadores de movilidad, entre estos receptores se encuentran las glicoproteínas CD44 y RHAMM, los receptores-1 hialuronano del vaso linfático (LYVE-1) y el factor de necrosis tumoral estimulado por el gen 6. Sus funciones fisiológicas están determinadas por las circunstancias en las que éste sea sintetizado, pueden ejercer funciones en el desarrollo embrionario, migración, adhesión, inflamación, cicatrización, angiogénesis, viscosidad, resistencia a multi-fármacos y tumores (Girish *et al.*, 2009).

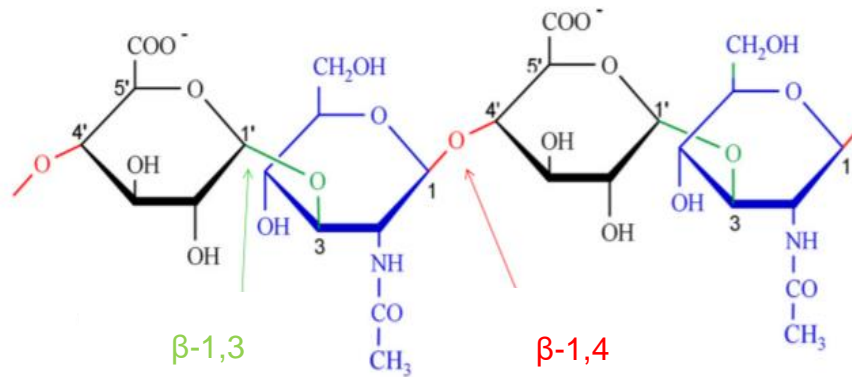


Figura 7. Estructura del ácido hialurónico En forma lineal con presencia de N acetil- $\beta$ -D-glucosamina (GlcNAc) mostrado en color azul, y ácido  $\beta$ -D-glucurónico (GlcUA) mostrado en color negro. Resaltando en verde los enlaces glicosídicos  $\beta$ -1,3 y en rojo los  $\beta$ -1,4 (Bordon *et al.*, 2015).

## 2.5. Inhibidores de hialuronidasas

La degradación del ácido hialurónico por parte de las hialuronidasas produce oligosacáridos con un amplio rango de pesos moleculares que incluso tienen propiedades angiogénicas, proinflamatorias e inmunoestimuladoras. Es por esto que los inhibidores de hialuronidasa no solamente tienen aplicaciones potenciales como anti-venenos, sino que también tienen muchos usos médicos y cosméticos, desde su aplicación como anticonceptivo, su uso anti-inflamatorio y anti-edad, y su posible aplicación en enfermedades como el cáncer y osteoartritis. Por ejemplo, ácido hialurónico O-sulfatado (Has), la heparina y recientemente el ácido glicerricínico de la raíz de regaliz presentan características inhibitorias en las hialuronidasas testiculares, además el poli estireno-4-sulfonato (PSS) de alto peso molecular y el sulfato de celulosa sódica se están probando como anticonceptivos vaginales al inhibir las hialuronidasas bacterianas que provocan enfermedades de transmisión sexual sin dañar el microbiota vaginal normal. También se ha estudiado el aurotiomalato de sodio para reducir daño tisular, siendo la primera reacción de las enzimas tipo hialuronidasa (Isoyama *et al.*, 2006).

Considerando la importancia de la búsqueda de inhibidores de hialuronidasas como alternativas potenciales en el tratamiento de envenenamiento Girish y Kemparaju (2005) compararon 19 compuestos con actividad inhibitoria de hialuronidasas en veneno de cobra *Naja naja*, destacando a: el ácido aristolóquico, que mostró 100% de inhibición a una concentración de 50  $\mu\text{M}$ ; la quercetina con 100% de inhibición a 100  $\mu\text{M}$ ; el ácido nordihidroguaiarético, curcumina e indometacina presentaron 78, 94 y 90% de actividad inhibitoria, respectivamente, a una concentración de 200  $\mu\text{M}$ . El ácido aristolóquico es un alcaloide que presenta un grupo O-metoxi en el carbono 8 (Anger *et al.*, 2020), la quercetina es un flavonoide que se ha utilizado como inhibidor de hialuronidasas presentes en el veneno de serpientes, abejas y escorpiones, su actividad se ha estudiado por el efecto que se produce tras el equilibrio dinámico entre radicales libres, donde una vez generados los radicales libres el  $\text{O}_2$  se transforma rápidamente en  $\text{H}_2\text{O}_2$  por acción de la superóxido dismutasa, dentro de la actividad enzimática, son los grupo hidroxilo presentes en la molécula de quercetina los que estarán uniéndose a los aminoácidos de los sitios activos de las enzimas (Xu *et al.*, 2019).

Se ha encontrado que la actividad de hialuronidasa se lleva a cabo en medios con agentes reactivos de oxígeno, obteniendo una mayor inhibición de la enzima con compuestos antioxidantes y fenoles, como se explicó en la quercetina (Sunitha *et al.*, 2013). Para la curcumina se ha observado que puede modificar y unirse a proteínas y enzimas por la presencia de sus dos sistemas  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturados que son aceptores Michael para -SH, los dos grupos fenólicos son susceptibles a transformaciones redox y el 1,3 dicarbonilo es un quelante para iones metálicos y tiene actividad antiespasmódica.

Santosh *et al.*, (2013) realizaron una recolección de bibliografía en la que se han puesto a prueba compuestos bioactivos para disminuir el envenenamiento de serpientes, entre las que se destacan para inhibir fosfolipasa  $\text{A}_2$  el ácido aristolóquico en *Vipera russelli* y la curcumina en *Naja naja*, *Vipera russelli* y *Crotalus atrox*. Para inhibir las metaloproteasas en *Bothrops jararacussu* y *Bothrops neuwiedi* se tiene la actividad de la catequina. Además mencionan la interacción de



las enzimas con átomos de  $Zn^{2+}$  para realizar su actividad, átomos que se encuentran presentes en los extractos de plantas.

## **2.6. Plantas consideradas en este estudio para la búsqueda de actividad anti-hialuronidasa**

Desde la antigüedad, se han utilizado plantas como ungüentos o infusiones para tratar los síntomas de las mordeduras y picaduras de los animales, que en su mayoría se ha visto que tienen relación con las plantas utilizadas para tratar enfermedades inflamatorias y que presentan actividad antioxidante. Bajo ese conocimiento de la medicina alternativa se han puesto a prueba extractos de una gran variedad de plantas. Por ejemplo, *Lythrum salicaria* también llamada frailecito, tiene una flor que presentó taninos, en su mayoría, con inhibición de actividad hialuronidasa de manera dosis dependiente y una concentración inhibitoria media ( $CI_{50}$ ) de  $10.1 \pm 1.2 \mu\text{g/mL}$ . *Oenothera biennis L.* es una planta muy estudiada por su actividad antiinflamatoria, por su alto contenido fenólico y por ser cosmopolita, presentando una  $CI_{50}$  de  $62.1 \pm 7.5 \mu\text{g/mL}$  (Scotti *et al.*, 2016).

Varios autores han registrado la relación entre la inhibición de actividad hialuronidasa con la presencia de compuestos fenólicos, como es el caso del estudio realizado por Nile *et al.*, (2017) donde tras realizar un estudio fitoquímico a 10 plantas, encontraron que aquellas con mejor actividad antioxidante como consecuencia de la presencia de fenoles, tienen mayor inhibición de actividad enzimática, poniendo a prueba enzimas como  $\beta$ -lucuronidasa, lipoxidasa,  $\alpha$ -amilasa, acetilcolinesterasa y hialuronidasa (Nile y Keum (2017).

Algunas plantas distribuidas en México también han sido estudiadas para afecciones infamatorias y como antioxidantes, las cuales pueden tener inhibición de la actividad hialuronidasa o de otros componentes del veneno.

### **2.6.1 *Lantana camara L.***

La especie *Lantana cámara L.* es una planta arbustiva que florece durante todo el año (Figura 8), sus hojas son opuestas y con presencia de pelos, tiene inflorescencias racimosas con flores de 4cm, presentan corolas rojas o anaranjadas

y sus frutos son drupas que al madurar son negras. En México es conocida como morita, sonora roja, gobernadora, frutilla, cinco negritos, entre otros nombres. Se encuentra ampliamente distribuida en la república, en lugares comunes como jardineras, caminos, pastizales. En la medicina tradicional es conocida por sus efectos tóxicos en el ganado por la presencia de lantánina, en humanos es utilizado para tratar afecciones estomacales como vómito y diarrea causadas por amebas, dolor de muelas y también para tratar los calambres, epilepsia y úlceras cutáneas, aunque, mayoritariamente su uso es ornamental (CONABIO, 2009). Para el tratamiento contra mordedura de víbora, se recurre a cortar y chupar la herida y después aplicar las hojas masticadas o ingerir una infusión de la misma planta; también se menciona su uso contra picadura de alacrán e insectos (BDMTM, 2009).

En cuanto a la composición fitoquímica de esta especie, Mansoori et.al. (2020) describen un alto contenido de alcaloides, taninos, fenoles y cumarina en las hojas, además de presentar actividad enzimática antioxidante como polifenol oxidasa y peroxidasa, esta actividad permite la disminución de ROS (por sus siglas en inglés Reactive Oxygen Species). También se ha encontrado la presencia de 13 glicósidos feniletanólicos, que han demostrado tener actividad en la inhibición de la oxidación de lípidos, siendo una actividad similar a la antioxidante (Ezzat et.al., 2020). Se ha reportado la presencia de triterpenoides con actividad antiinflamatoria en ensayos *in vitro* e *in vivo* (Wu *et al.*, 2020). En otro estudio, se encontró que los extractos etanólicos de las hojas de *L. officinalis* presentaron un efecto anti-edad en las moscas de la fruta *Drosophila melanogaster*, sugiriendo que su consumo puede ser seguro y recomendable en la medicina tradicional a concentraciones moderadas (1135 mg/10 dieta), el análisis de la composición del extracto etanólico reveló la presencia de alcaloides, flavonoides, fenoles, esteroides, glicósidos cardiogénicos y carbohidratos (Etuh *et al.*, 2021).



Figura 8. Fotografía de un arbusto de *Lantana cámara* L.

### 2.6.2 *Fumaria officinalis* L.

*Fumaria officinalis* L. es una planta herbácea anual que se conoce comúnmente como palomilla o sangre de Cristo. Cuenta con hojas pinnaticompuestas con los últimos folículos casi lineales, forma inflorescencias en racimos terminales de entre 10 a 25 flores zigomorfas (Figura 9). Es una especie originaria de Europa e introducida en Norteamérica, se considera de distribución cosmopolita. En la medicina tradicional asiática, esta planta se ha utilizado en diversos padecimientos inflamatorios y en el tratamiento del dolor, por ejemplo, en conjuntivitis y reumatismo. También es utilizada para tratar afecciones de la piel como acné, eczema y lepra; además de usarse como infusión para enfermedades neurológicas como la depresión (Tobyn *et al.*, 2011; Raafat y El-Zahaby, 2020). En un estudio se encontró la fracción rica en alcaloides fue la más activa en ensayos de inflamación y neuropatías, conteniendo mayormente estilopina (48.3% y sanguinarina (51.6%). En otros estudios farmacológicos se ha encontrado un amplio espectro de utilidades para las plantas del género *Fumaria*, entre las que destacan actividades hepatoprotectoras, anti-inflamatorias, antimicrobianas, antioxidantes y antitumorales, por lo que se consideran como fuentes potenciales de compuestos con actividades farmacológicas prometedoras (Zhang *et al.*, 2020). En este estudio, se seleccionó a esta planta debido a su uso para afecciones de la piel y sus efectos anti-inflamatorios, además de que está considerada dentro de un grupo de plantas medicinales prometedoras por su amplia gama de actividades farmacológicas.



Figura 9. Fotografía de la planta *Fumaria officinalis* L.

### 2.6.3 *Ceiba speciosa* (A. St.-Hil.) Ravenna

Esta especie vegetal es un árbol conocido como palo borracho o árbol del puente es nativo de la selva tropical de Sudamérica. Puede medir de 10 a 20 metros de altura, el tronco se caracteriza por estar provisto de espinas gruesas. Las hojas están agrupadas en cinco a siete folios cerrados, cuenta con flores rosas formadas con cinco pétalos (Figura 10). Se cultiva como especie ornamental con distribución en varios países, pero se encuentra de manera nativa en el noroeste de Brasil y parte de Uruguay. En la medicina tradicional se tienen registros del uso de las cortezas y flores para tratar afecciones cardíacas, hipertensión y diabetes. Se han realizado pocos estudios farmacológicos con extractos de esta especie; por ejemplo, en un estudio se encontró que el extracto acuoso de la corteza de *C. speciosa* presentó baja toxicidad y actividad potencial contra la toxicidad causada por glucosa en el nemátodo de *Caenorhabditis elegans* (Bianchin dos Santos *et al.*, 2020). En otro estudio, se encontró que el extracto acuoso de la corteza de esta especie presentó una alta actividad antioxidante y una gran cantidad de compuestos fenólicos (Dörr *et al.*, 2019).

En México, la especie nativa *Ceiba aesculifolia* se recomienda en la medicina tradicional en el tratamiento de debilidad, dermatitis y mordeduras de víbora (Orozco *et al.*, 2013; Catálogo Fotográfico de Biodiversidad, 2016; Suastegui-Baylón *et al.*, 2021), además de presentar también alta actividad antioxidante asociada a compuestos fenólicos (Suastegui-Baylón *et al.*, 2021). Considerando la similitud de estas especies y la accesibilidad, en este estudio se consideró a la especie *C. speciosa*.



Figura 10. Fotografía de un árbol de *Ceiba speciosa* (A. St.-Hil.) Ravenna

#### **2.6.4. Género *Ipomoea***

Este género comprende una gran variedad de especies vegetales, en su mayoría enredaderas, conocidas por su toxicidad tras su ingesta en ganadería, en los casos bien estudiados de *I. murucoides*, *I. pauciflora* (Mila-Arango *et al.*, 2014). Algunas otras son utilizadas en la medicina tradicional para afecciones como insomnio, dolor de cabeza, presión alta, diabetes, como antiepiléptico y antiinflamatorio, como es el caso de la enredadera gloria de la mañana *I. aquatica*, la cual se ha reportado con alto contenido de vitamina C y gran cantidad de compuestos fenólicos (Malakar y

Choudhury, 2015). En México, es conocido el uso etnobotánico de *I. aquatica* en rituales como alucinógeno por su alto contenido de alcaloides. Otras especies como *I. batata* es conocido su uso para controlar la diabetes, *I. stans* es utilizada para controlar epilepsia, espasmos musculares, parálisis y es usada como agente sedante.

El uso de algunas especies del género *Ipomoea* para contrarrestar el envenenamiento causado por algunos animales venenosos también se ha reportado en la literatura. Por ejemplo, *I. murucoides* es una especie endémica de México, conocida comúnmente como cazahuate, se utilizan sus hojas en la medicina tradicional para tratar las picaduras de alacrán (Meira *et al.*, 2012; Uka *et al.*, 2020). Sin embargo, no hay estudios farmacológicos que comprueben dicha actividad. *I. murucoides* es un árbol de hasta 8 metros de altura con flores blancas en forma de campana (Figura 11). Se seleccionó a esta especie debido a su amplia distribución en el centro de México, incluyendo Querétaro y Guanajuato.

Se ha demostrado clínicamente que la especie *I. pes-caprae* es efectiva contra la dermatitis causada por el envenenamiento por medusas marinas. El extracto de esta especie puede inhibir la acción hemolítica y proteolítica de varios extractos de medusas marinas (da Silva Barth *et al.*, 2017; Pongprayoon *et al.*, 1991). De hecho, se ha demostrado que esta especie del género *Ipomoea* tiene propiedades medicinales útiles en el tratamiento de inflamación, heridas en la piel, picaduras de insectos y dolor reumático; además se encontró en un estudio que una formulación tópica preparada con un extracto de hojas de esta especie, rica en compuestos fenólicos, es efectiva para tratar el edema causado por la serpiente venenosa *Bothrops erythromelas* (Xavier-Santos *et al.*, 2022). Por otro lado, también se ha demostrado que el extracto acuoso de *I. asarifolia* neutraliza la actividad inflamatoria provocada por el veneno del escorpión *Tityus serrulatus* (Lima *et al.*, 2014). Considerando los antecedentes mencionados, en este estudio se seleccionaron algunas especies de *Ipomoea*, como *I. murucoides*, *I. stans*, *I. purpurea* e *I. cardiophylla*.



Figura 11. Fotografía de un árbol de *Ipomoea murucoides*. Roem. y Schult.

#### **2.6.5. *Prunus serotina* Ehrh.**

Es un árbol nativo de América que ha sido propuesto y utilizado como árbol forestal por sus beneficios tanto biológicos a la tierra como ambientales (Guzmán *et al.*, 2020). Este árbol presenta una temporada frutal que empieza en mayo y termina en agosto, estos frutos son circulares, con tonalidades desde rojizos hasta azulados y en el centro presentan una única semilla. Generalmente, son consumidos en crudo y son conocidos por su alto contenido en antioxidantes. En cuanto a los usos tradicionales de los frutos, está limitado como antiinflamatorio y antiespasmódico, con una mezcla de hojas (Castillo, 2009). Dentro de su bioquímica presenta retinol, tiamina, riboflavina, niacina, ácido ascórbico y antocianinas (Ocaña y Tadeo, 2018).





Figura 12. Fotografía de fruto de *Prunus serotina* Ehrh

#### **2.6.6. *Myrtillocactus geometrizans* (Martyr. Ex Pfeiff.) Console.**

Es una cactácea endémica de México con amplia distribución en todo el país, en su mayoría zonas áridas y selva baja (Islas-Barrios *et al.*, 2020). Su fruto es esférico y con colores variados, desde azul a rojo que crecen los ápices de las espinas y es comestible se observa su crecimiento en la Figura 13. Se ha reportado su alto contenido de antioxidantes y es utilizado comúnmente como antiinflamatorio en sus usos tradicionales (Guía-García *et al.*, 2021). Dentro de su composición química, el fruto contiene gran cantidad de fenoles y actividad antioxidante, sin embargo, la cantidad de antioxidantes disminuye según la madures del fruto (López-Palestina, 2019). Adicionalmente, se sabe que en extractos con solventes orgánicos se obtiene gran cantidad de flavonoides, glucósidos cardiacos, terpenoides, taninos y fenoles, en comparación con los extractos acuosos. Su capacidad antioxidante es de 51.1%

de captación de radicales libres DPPH, 40 mg de fenoles totales y 3.1 mg de taninos condensados (Solís y García-Vieyra, 2017).



Figura 13. Fotografía de fruto de *Myrtillocactus geometrizans* (Martyr. Ex Pfeiff.) Console.

### 3. JUSTIFICACIÓN

Las tarántulas del género *Poecilotheria* son consideradas por algunos autores como de importancia médica. Se estima que en el 58% de los casos de mordeduras de tarántulas pertenecientes a este género, en humanos se presentan calambres musculares acompañados de dolor intenso. Estos síntomas pueden durar algunos días o incluso semanas. En algunos casos, se han registrado otros síntomas como fiebre, dolor muscular, dificultad respiratoria e incremento de la frecuencia cardíaca. (Fuchs *et al.*, 2013). Las tarántulas de este género se comercializan ampliamente como mascotas exóticas, debido a sus colores llamativos y a su dificultad de manipulación, lo que hace que sean buscadas y popularizadas entre coleccionistas. Estas especies están enlistadas en la lista roja de especies amenazadas IUCN desde el 2008, aunque aún no están protegidas bajo las listas de Wildlife Protection Act (1972). Se estima que entre 2006 y 2007, se importaron más de 22,978 especímenes a Estados Unidos, mientras que entre 2013 y 2017, fueron registrados 16,519 especímenes exportados (CITES, 2019). Además, estas especies pueden ser criadas en cautiverio, lo que aumenta su comercialización en todo el mundo. Generalmente, los coleccionistas de tarántulas suelen estar informados de los síntomas generales provocados por las tarántulas del género *Poecilotheria*. Sin embargo, dada la naturaleza violenta y de acción rápida de estas especies, resulta inevitable que se presenten casos de mordeduras. Actualmente, no existe un tratamiento específico para contrarrestar los síntomas causados por las mordeduras de estas tarántulas, además de que hay poca información sobre el proceso de envenenamiento y la composición de los venenos. Una estrategia alternativa para establecer posibles tratamientos y generar información sobre el proceso de envenenamiento es investigar la importancia de las enzimas de tipo hialuronidasa en el proceso de envenenamiento de estas especies. De este modo, la búsqueda de compuestos inhibidores de hialuronidasa con alta especificidad sobre las isoformas presentes en los venenos de estas especies de tarántulas será de utilidad para conocer el papel de las hialuronidasas en el proceso de envenenamiento y establecer si un tratamiento basado en la inhibición de estas enzimas puede ser el adecuado.

Finalmente, debe considerarse que la búsqueda de nuevos compuestos con actividad inhibitoria de enzimas de tipo hialuronidasa ha aumentado en los últimos años debido a que estas enzimas participan en diversos procesos fisiopatológicos, de manera que pueden tener aplicaciones como agentes anti-inflamatorios, anti-angiogénicos y antimicrobianos (Girish *et al.*, 2009).

#### 4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es el efecto que tiene la inhibición de la actividad de las enzimas de tipo hialuronidasa, reconocida para venenos diferentes a *Poecilotheria* con compuestos puros y extractos etanólicos, sobre la toxicidad inducida por el veneno de la tarántula *Poecilotheria regalis* en grillos y ratones?

## 5. HIPÓTESIS

La inhibición de las enzimas de tipo hialuronidasa inducida por compuestos puros y extractos etanólicos, reconocidos para venenos de especies diferentes a *Poecilotheria*, reducen significativamente la toxicidad inducida por el veneno de la tarántula *Poecilotheria regalis* en grillos y ratones a través de la reducción del componente disgregante.

## 6. OBJETIVOS

### 6.1 Objetivo General

Evaluar el efecto de siete compuestos puros inhibidores de hialuronidasa y de los extractos etanólicos de seis especies vegetales sobre la toxicidad inducida por el veneno de *Poecilotheria regalis* en grillos y ratones.

### 6.2 Objetivos específicos

- Determinar la especificidad del veneno sobre los sustratos ácido hialurónico, sulfato de condroitina A y sulfato de condroitina B en un modelo *in vitro*.
- Evaluar el grado de inhibición que producen algunos compuestos puros conocidos como inhibidores de hialuronidasa (ácido aristolóquico, ácido nordihidroguaiarético, curcumina, quercetina, catequina, naringenina e indometacina), sobre la actividad enzimática del veneno de *P. regalis* en un modelo *in vitro*.
- Evaluar el grado de inhibición que producen los extractos etanólicos de las plantas *Lantana camara* L., *Fumaria officinalis* L., *Ceiba speciosa* (A. St.-Hil.) Ravenna, *Ipomoea murucoides* Roem. Y Schult, *Ipomoea stans* Cav., *Ipomoea purpurea* (L.) Roth, *Ipomoea cardiophylla* A. Gray, *Ipomoea cairica* (L.) Sweet y *Croton ciliatoglandulifer* Ortega sobre la actividad hialuronidasa del veneno de *P. regalis* en un modelo *in vitro*.
- Analizar el efecto de los compuestos y extractos con mayor capacidad para reducir el factor de dispersión (hialuronidasas) del veneno, sobre la toxicidad inducida por el veneno de *P. regalis* en grillos y ratones.

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1 Obtención de los organismos de *Poecilotheria regalis*

Para la obtención del veneno, se utilizaron tarántulas adultas hembras criadas en cautiverio, que fueron facilitadas por el Aracnario de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro (Número de registro INE/CITES/DGVS-CR-IN-0619-QRO/00). Todos los organismos obtenidos fueron mantenidos en cajas de polimetilmetacrilato con fibra de coco como sustrato y agua, siendo alimentadas semanalmente con grillos (*Acheta domesticus*) y agua purificada *ad libitum*. El mantenimiento, identificación y determinación del sexo de las especies se realizó por el personal del Aracnario.

### 7.2 Animales de experimentación

Los ratones se obtuvieron en el Bioterio del Instituto de Neurobiología de la UNAM, campus Juriquilla, Querétaro. Los animales se mantuvieron en jaulas de acrílico de 34.5 x 49 x 17 cm (permitiendo un espacio mayor a 78 cm<sup>2</sup>/animal para los ratones) en un espacio ubicado en la planta baja del edificio 2 de la Facultad de Química de la UAQ que cuenta con un equipo de control de ambiente adecuado para el mantenimiento de roedores (NOM-062-ZOO-1999, apartado 6.1). Los animales se mantuvieron en condiciones de agua (agua purificada en bebederos de acrílico de 250 y 500 mL) y alimento (alimento ABENE BDL-7100 para animales de laboratorio en fase de mantenimiento) *ad libitum* (NOM-062-ZOO-1999 apartado 5.1). La limpieza de las jaulas se realizó cada 2 días. Una vez concluidos los ensayos, se realizó la eutanasia de los animales mediante un ambiente de isoflurano (NOM-062-ZOO-1999 apartado 9.4).

Los grillos (*Acheta domestica*) se adquirieron en tiendas de mascotas (alimento vivo) y se emplearon 136 grillos adultos de sexo indistinto de aproximadamente 0.4 g de peso. Se mantuvieron en botes de plástico de 1 litro de capacidad con tapa y perforaciones en esta para permitir la ventilación, se mantuvieron en grupos de 5 individuos por bote, cada grupo tenía alimento vegetal y algodón humedecido con agua. Después de cada ensayo biológico, los animales de experimentación fueron sacrificados en un ambiente de bióxido de carbono.



Los Residuos Peligrosos Biológico Infecciosos fueron debidamente etiquetados y almacenados de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-087-SSA-2002, los cadáveres se almacenaron en bolsas amarillas a -20 °C y los punzocortantes en contenedores rojos especiales para este propósito. Esto por un periodo no mayor a 30 días, posteriormente se contrató un servicio especial dedicado al tratamiento y procesamiento de estos residuos. Con respecto a los residuos químicos, estos fueron manejados y almacenados de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-005-stps-1998. Periódicamente, se contrató un servicio especial dedicado a la recolección, tratamiento y procesamiento de los residuos que opera bajo estas normas (Transporte y Recolección Integral de Residuos Peligrosos, S.A. de C.V.).

### **7.3 Extracción del veneno**

La extracción del veneno de las tarántulas se realizó mediante el método de estimulación eléctrica (Rocha-e-Silva *et al.*, 2009) con algunas modificaciones que se describen a continuación. Los especímenes se anestesiaron parcialmente en una atmósfera de isoflurano y se sujetaron en una cama de esponja adecuada para este propósito. Las puntas de los colmillos se colocaron cuidadosamente en tubos para microcentrífuga de 1.5 mL de capacidad previamente pesados, evitando cualquier tipo de contaminación con la saliva de las tarántulas. Con ayuda de dos electrodos humedecidos con solución amortiguadora de corrida se aplicó estimulación eléctrica de 10 V durante 10 a 20 s en los quelíceros utilizando una fuente de poder para electroforesis (Bio-Rad 164-5050). Una vez obtenido el veneno, se aplicó un pulso al microtubo en la microcentrífuga para que éste se quede en el fondo. Inmediatamente se pesó el microtubo que contiene el veneno y se almacenó en un ultracongelador a -70 °C. Se calculó el peso del veneno líquido obtenido en la extracción por diferencia de peso. Se extrajo el veneno de cada tarántula una vez por mes para dar tiempo suficiente para que éste se restablezca en cantidades adecuadas.

### **7.4 Cuantificación de proteínas**

Se realizó un concentrado de veneno proveniente de varias extracciones de diferentes especímenes de *P. regalis* y se determinó la concentración de proteínas totales mediante el método del ácido bicinconínico (QuantiPro BCA Assay Kit,

SIGMA), utilizando una curva estándar preparada con albúmina de suero bovino liofilizado (Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.).

### **7.5 Recolección del material vegetal y obtención de los extractos**

Las especies vegetales contempladas en este estudio fueron identificadas por el Dr. José Alejandro Cabrera Luna de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro. Los vouchers de cada especie fueron depositados en el herbario de Querétaro “Dr. Jerzy Rzedowski” QMEX. Las especies *Lantana camara* L. (vóucher QMEX00015383) e *Ipomoea cairica* (L.) Sweet (voucher QMEX00015385) fueron colectadas en los jardines de la Universidad Autónoma de Querétaro, campus Centro Universitario. Las especies *Ipomoea purpurea* (L.) Roth (voucher QMEX00015388), *Ipomoea cardiophylla* A. Gray (voucher QMEX00015387), *Ipomoea murucoides* Roem. y Schult. (voucher QMEX00015386), *Myrtillocactus geometrizans* (Mart. Ex Pfeiff.) Console (voucher QMEX00015391) fueron colectadas en la Universidad Autónoma de Querétaro campus Juriquilla. La especie *Ceiba speciosa* (A. St.-Hil.) (voucher QMEX00015385) se colectó en la ciudad de Celaya, Guanajuato. Finalmente, la especie *Prunus serotina* Ehrh. (voucher QMEX00015390) fue colectada en el estado de Querétaro. Todas las especies se colectaron en el segundo semestre del año 2021. Además, en este estudio se utilizaron dos especies adquiridas comercialmente, raíz de *Ipomoea stans* Cav. etiquetado como “TUMBAVAQUERO” Tonahuac-Magia Luz Esencia (Hilo-Sonora) (en la etiqueta se indica el uso de la infusión para tratar mordedura de víbora de manera tópica); mientras que la otra especie adquirida comercialmente fue *Fumaria officinalis* L. etiquetada como “Palomina” de Organic Ehya, Ciudad de México, México.

Para la preparación de los extractos se utilizaron hojas, tallos y flores en la mayoría de las especies, solamente en el caso de *Ipomoea stans* Cav. se utilizó la raíz, mientras que en el caso de *Prunus serotina* Ehrh. y *Myrtillocactus geometrizans* (Mart. Ex Pfeiff) Console se utilizaron los frutos. Los materiales vegetales se secaron bajo sombra a 25 °C durante 3 semanas, en el caso de los frutos se realizó el secado por liofilización. Posteriormente, el material seco se trituró en un molino eléctrico con una malla de 0.5 mm de diámetro de poro. Los extractos se prepararon mediante maceración del material vegetal seco en etanol absoluto a temperatura

ambiente durante una semana. Después de este tiempo, el solvente fue removido por filtración y el material vegetal residual se extrajo nuevamente con etanol absoluto por una semana más. Los solventes de ambas extracciones se mezclaron y se evaporarán con un rotavapor (BÜCHI R-114, St. Gallen, Suiza). Los extractos etanólicos secos se almacenaron a 4 °C.

## **7.6 Evaluación de la inhibición de la actividad de tipo hialuronidasa**

La actividad de tipo hialuronidasa del veneno se determinó turbidimétricamente mediante un método estandarizado (Di Ferrante, 1956). Este método se basa en la interacción entre el ácido hialurónico y bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HDTA). Para esto, se obtiene un volumen final de 50 µl de veneno en diferentes concentraciones (1, 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20 y 25 µg/mL), que fueron diluidas en 100 µl de amortiguador (0.2 M de acetato de sodio con 0.15 M de NaCl, pH 6) e incubadas durante 15 minutos a 37 °C en presencia de 100 µL de sustrato. Disolviendo 1 mg de ácido hialurónico (sal de sodio de *Streptococcus equi*, Sigma-Aldrich) en 1 mL de amortiguador de acetato. Después del periodo de incubación, la reacción se detuvo adicionando 1 mL de bromuro de hexadeciltrimetilamonio al 2.5% (diluido en NaOH al 2%), dejando reposar por 10 min. Posteriormente, se midió la absorbancia a 400 nm comparándolo con un tubo control que contenía 0.25 mL de amortiguador (0.2 M de acetato de sodio con 0.15 M de NaCl, pH 6) y 1 mL de HDTA. La reducción de la turbidez se expresó como el porcentaje de ácido hialurónico restante, tomando la absorbancia de un tubo como 100% al que no se le agregó muestra ni enzima, denominado blanco. Una unidad de turbidez (TRU) se expresa como la cantidad de enzima requerida para hidrolizar el 50% del ácido hialurónico. La actividad específica será expresada como TRU/mg de enzima. Se empleó como control una hialuronidasa de testículo bovino (tipo IV-S, Sigma-Aldrich) y una condroitinasa ABC de *Proteus vulgaris* (Sigma-Aldrich).

Para evaluar el efecto neutralizante de los compuestos bioactivos sobre la actividad enzimática del veneno, se realizó el ensayo turbidimétrico con algunas modificaciones tomadas de Girish y Kempaju (2005). Para esto, se incubaron durante 30 min a 37 °C, 5 µg de veneno (correspondiente a la concentración de 20 µg/ml que se usó en la curva de actividad de hialuronidasa) en presencia de cada compuesto bioactivo a concentraciones de 100, 200 y 300 µM en un volumen final

de 0.1 ml de amortiguador. Posteriormente se evaluó la actividad de hialuronidasa del veneno como se mencionó anteriormente. Los compuestos bioactivos considerados en esta propuesta fueron: ácido aristolóquico, ácido nordihidroguaiarético, curcumina, quercetina, catequina e indometacina. El ácido aristolóquico se disolvió en agua destilada, la quercetina, curcumina, el ácido nordihidroguaiarético y la indometacina se disolvieron en etanol a una concentración final de 4%. Se evaluaron controles con estas concentraciones de disolvente. En el caso de los extractos de las especies vegetales, se realizó el ensayo de la misma manera que con los compuestos, pero empleando concentraciones de 100, 200, 500 y 1000 µg/ml, empleando etanol a una concentración final de 4%.

### **7.7 Ensayo de toxicidad en grillos**

En primer término, se evaluó la toxicidad del veneno en grillos (*Acheta domestica*) de aproximadamente 400 mg de peso, siguiendo el método previamente reportado por Herzig *et al.*, (2008). Para esto, se inyectó el veneno a diferentes dosis (1, 3.2, 10, 31.6, 100 y 316 proteína/g de peso) en la zona metatorácica, disueltas en 20 µl de solución salina para insectos (pH 7.2; NaCl 200 mM, KCl 3.1 mM, 2 mM NaHCO<sub>3</sub>, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 5.4 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) con una jeringa de insulina ultrafina de 0.3 mL. Cada dosis de veneno se administró en grupos de cinco grillos por triplicado, después de 24 horas de la administración, se contó el número de muertes en cada grupo de 5 después. La dosis letal media (DL<sub>50</sub>) se determinó mediante un ajuste no lineal de la construcción de la curva dosis-respuesta.

Una vez determinada la DL<sub>50</sub> en este modelo, se evaluó la capacidad de los compuestos bioactivos o extractos para neutralizar la toxicidad del veneno. Para esto, se incubó durante 15 minutos a 37 °C la cantidad de veneno equivalente a dos veces la DL<sub>50</sub> en presencia de cada uno de los extractos, en una proporción de 30 µg de extracto por cada 5 µg de veneno, el volumen final de inyección fue de 20 µl por grillo en solución salina, en grupos de cinco grillos por triplicado. Posteriormente, se registró el número de muertes que ocurrieron en el transcurso de 24 horas y se compararon los valores con grupos controles a los que sólo se les administró el veneno (2 X DL<sub>50</sub>) o el extracto. La concentración final de etanol que se empleó para disolver los extractos fue de 4%.

### **7.8. Ensayo de toxicidad en ratones**

De manera similar al ensayo antes mencionado, primero se determinó la DL<sub>50</sub> en ratones CD-1 de aproximadamente 15 g de peso, de sexo indistinto. Se inyectaron diferentes dosis del veneno (0.2, 1.3, 1.33, 2.0, 6.3 y 20 µg proteína/g de peso) en grupos de 4 ratones por vía intraperitoneal en un volumen final de 100 µl de solución salina estéril (0.15 M NaCl). Se registró el número de muertes que ocurrieron dentro de las primeras 24 horas después de la inyección para estimar el valor de la DL<sub>50</sub> mediante un ajuste no lineal de la construcción de la curva dosis-respuesta.

Para evaluar la capacidad de los extractos que presentaron mayor actividad inhibitoria en el ensayo con grillos, se incubó durante 15 min a 37 °C la cantidad de veneno equivalente a dos valores de la DL<sub>50</sub> en presencia de extracto, en una proporción de 30 µg de extracto por cada 5 µg de veneno. Posteriormente, se administró la mezcla en los ratones (n = 4) considerando un volumen final de 100 µl, empleando solución salina estéril como diluyente. Se registró el número de muertes que ocurrieron en el transcurso de 24 horas y se comparó la letalidad con grupos controles a los que sólo se les administró el veneno (2 X DL<sub>50</sub>) o el extracto (volumen final de etanol 4%).

### **7.9. Análisis estadístico**

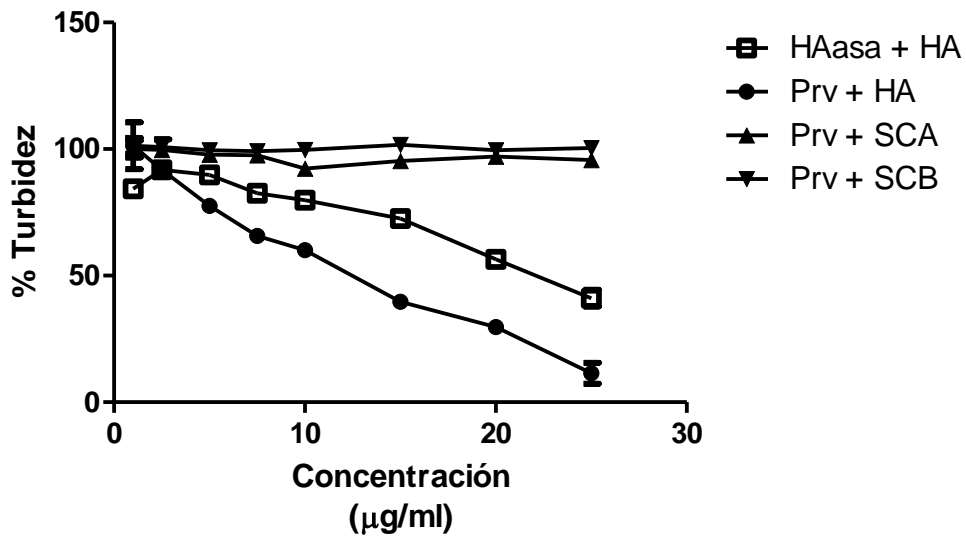
Para los análisis estadísticos se utilizó el programa estadístico GraphPad Prism versión 5.00 para Windows (San Diego California, USA). Los valores de DL<sub>50</sub> se estimaron mediante un ajuste no lineal de las curvas semilogarítmicas dosis-respuesta, dichos valores se reportarán como la media de 3 a 4 repeticiones con sus intervalos de confianza del 95%. El resto de los parámetros se reportaron como la media de 4 repeticiones ± el error estándar. Las comparaciones entre los valores se realizarán mediante un ANOVA de una vía seguidas de un análisis de Dunnet.

## 8. RESULTADOS

### 8.1 Especificidad de las enzimas de tipo hialuronidasa del veneno de *P. regalis*

Con la finalidad de reconocer la especificidad del veneno sobre los sustratos de glicosaminoglicanos, se probaron tres sustratos encontrados en la matriz extracelular como proteoglicanos: ácido hialurónico (HA), sulfato de condroitina A (SCA) y sulfato de condroitina B (SCB). En la Figura 14-A se muestra la actividad de la enzima hialuronidasa de testículo bovino (tipo IV-S, Sigma-Aldrich, cada mg de sólido equivale a 400 - 1000 unidades), denominada como HAasa, sobre sustrato de ácido hialurónico (sal de sodio de *Streptococcus equi*, Sigma-Aldrich). Se puede observar que la enzima HAasa reduce el 50% de la turbidez a partir de 20 µg de enzima/ml. En la misma gráfica (Figura 14-A) se observa el efecto del veneno (Prv) sobre los sustratos HA, SCA y SCB, indicando que el veneno produjo una mayor disminución de la turbidez que el control de HAasa, alcanzando una reducción del ácido hialurónico a partir de la concentración de 10 µg de veneno/ml. Sin embargo, el veneno no presentó actividad sobre los sustratos SCA y SCB. En la Figura 14-B se muestra la actividad de la enzima control condroitinasa ABC (SCasa) de *Proteus vulgaris* (cada mg de sólido equivale a 0.3 a 3 unidades) sobre los sustratos SCA y SCB, observándose en ambos casos disminución del porcentaje de turbidez por la degradación de los sustratos.

A)



B)

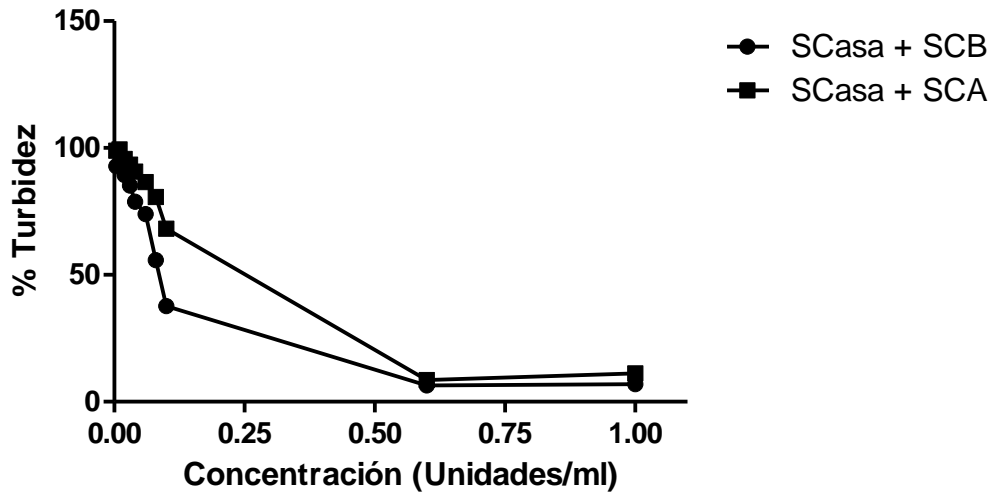


Figura 14. Especificidad de las enzimas tipo hialuronidasa presentes en el veneno de *P. regalis*. HAasa = hialuronidasa control, HA = ácido hialurónico, Prv = veneno de *Poecilotheria regalis*, SCA = sulfato de condroitina A, SCB = sulfato de condroitina B, SCasa = condroitinasa ABC control.

## 8.2. Acción inhibitoria de los compuestos bioactivos sobre la actividad de hialuronidasa del veneno de *P. regalis*

Los compuestos bioactivos, a los que se les ha reportado previamente actividad inhibitoria significativa sobre veneno de serpiente *Naja naja* (Girish y Kemparaju, 2005), fueron puestos a prueba con el veneno de *P. Regalis* y un control con hialuronidasa. En las figuras 15 y 16 se muestra la actividad de hialuronidasa del veneno de *P. regalis* en ausencia (Prv) y en presencia de diferentes concentraciones (100, 200 y 300  $\mu\text{M}$ ) de ácido aristolóquico, ácido nordihidroguaiarético, catequina, curcumina, indometacina, quercetina y naringenina. Los resultados indicaron que solamente la catequina y la indometacina redujeron significativamente la actividad de hialuronidasa del veneno. La catequina, a la concentración de 100  $\mu\text{M}$ , produjo un  $27.08 \pm 6.77\%$  de inhibición de la actividad de hialuronidasa del veneno; mientras que la indometacina produjo un  $37.8 \pm 3.54 \%$  de inhibición a la concentración de 100  $\mu\text{M}$ , un  $36.28 \pm 1.3\%$  de inhibición a la concentración de 200  $\mu\text{M}$ , y un  $35.54\%$  de inhibición a la concentración de 300  $\mu\text{M}$ . Se realizaron pruebas similares con el control de hialuronidasa de testículo bovino; pero, los resultados indicaron mucha variación en la respuesta (Figura 17 y 18). Solamente el ácido aristolóquico y la quercetina produjeron una disminución significativa de la actividad de la hialuronidasa control. Sin embargo, no se muestra un efecto dependiente de la concentración.



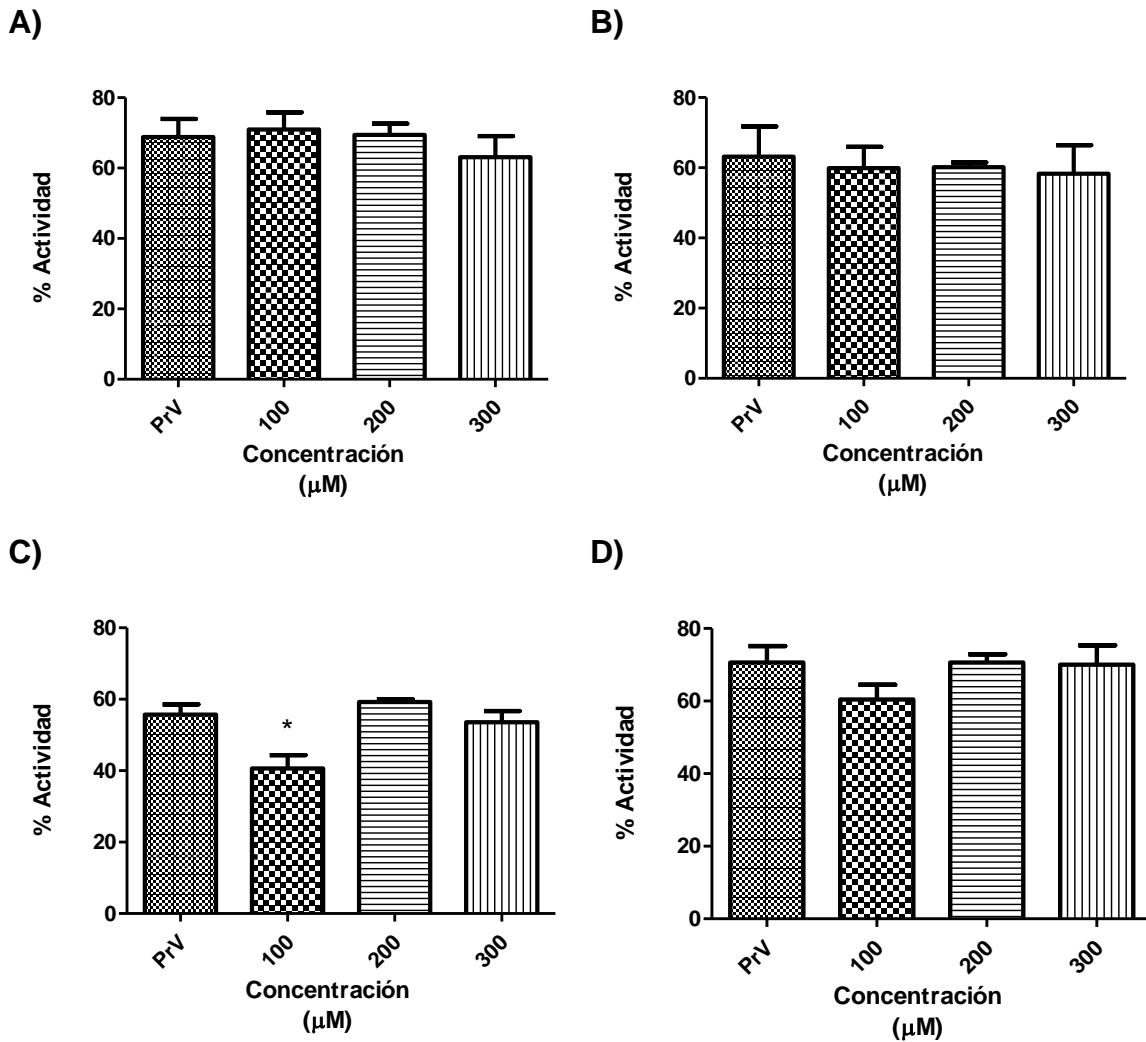


Figura 15. Actividad de hialuronidasa del veneno de *P. regalis* (Prv, 20 μg/ml) en presencia de diferentes concentraciones (100, 200 y 300 μM) de ácido aristolóquico (A), ácido nordihidroguaiarético (B), catequina (C) y curcumina (D). \*Presentó diferencia significativamente menor con respecto al control (Prv) ( $P < 0.05$ ).

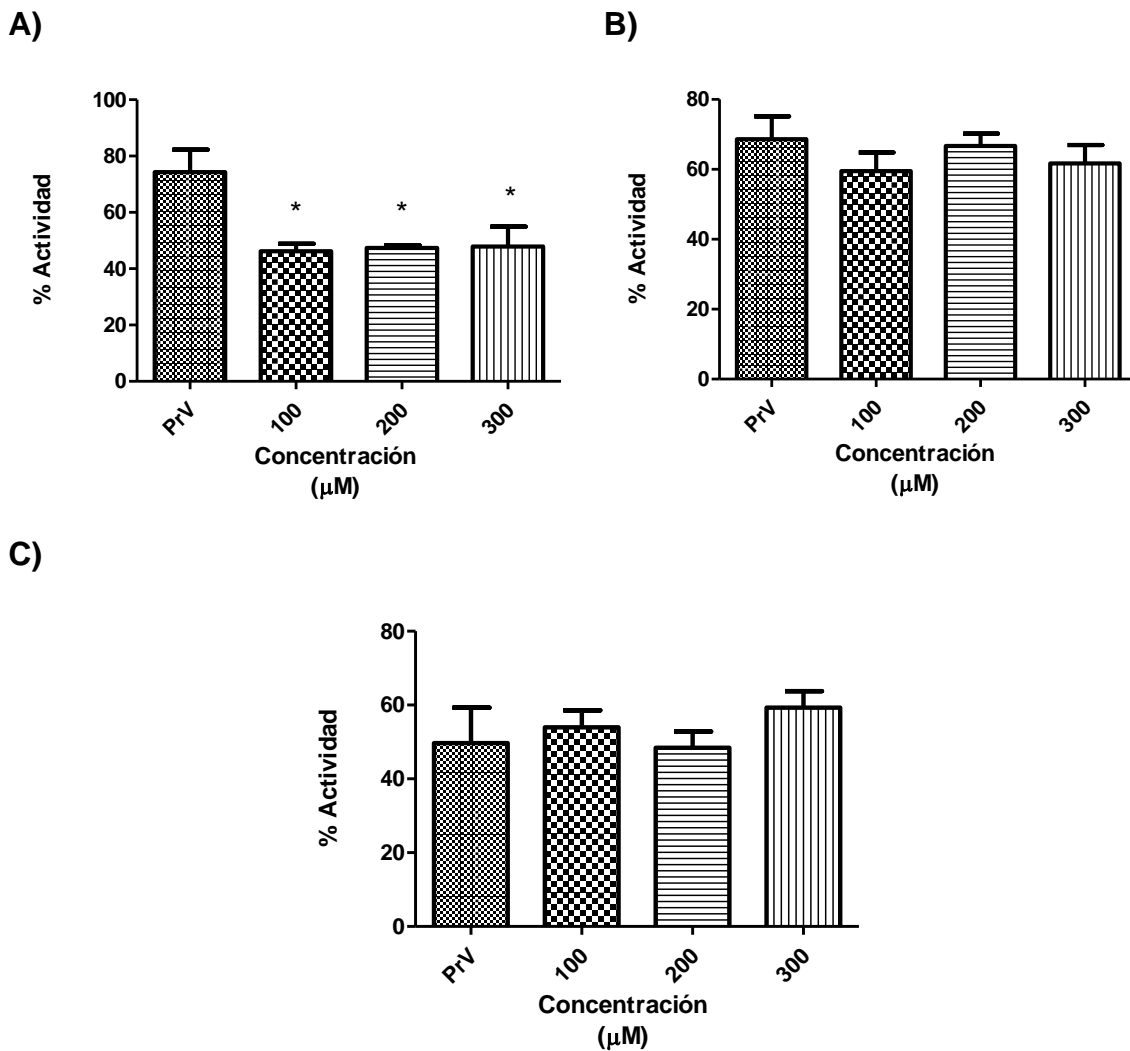


Figura 16. Actividad de hialuronidasa del veneno de *P. regalis* (Prv, 20 μg/ml) en presencia de diferentes concentraciones (100, 200 y 300 μM) de indometacina (A), quercetina (B) y naringenina (C). \*Presentó diferencia significativamente menor con respecto al control (Prv) ( $P < 0.05$ ).

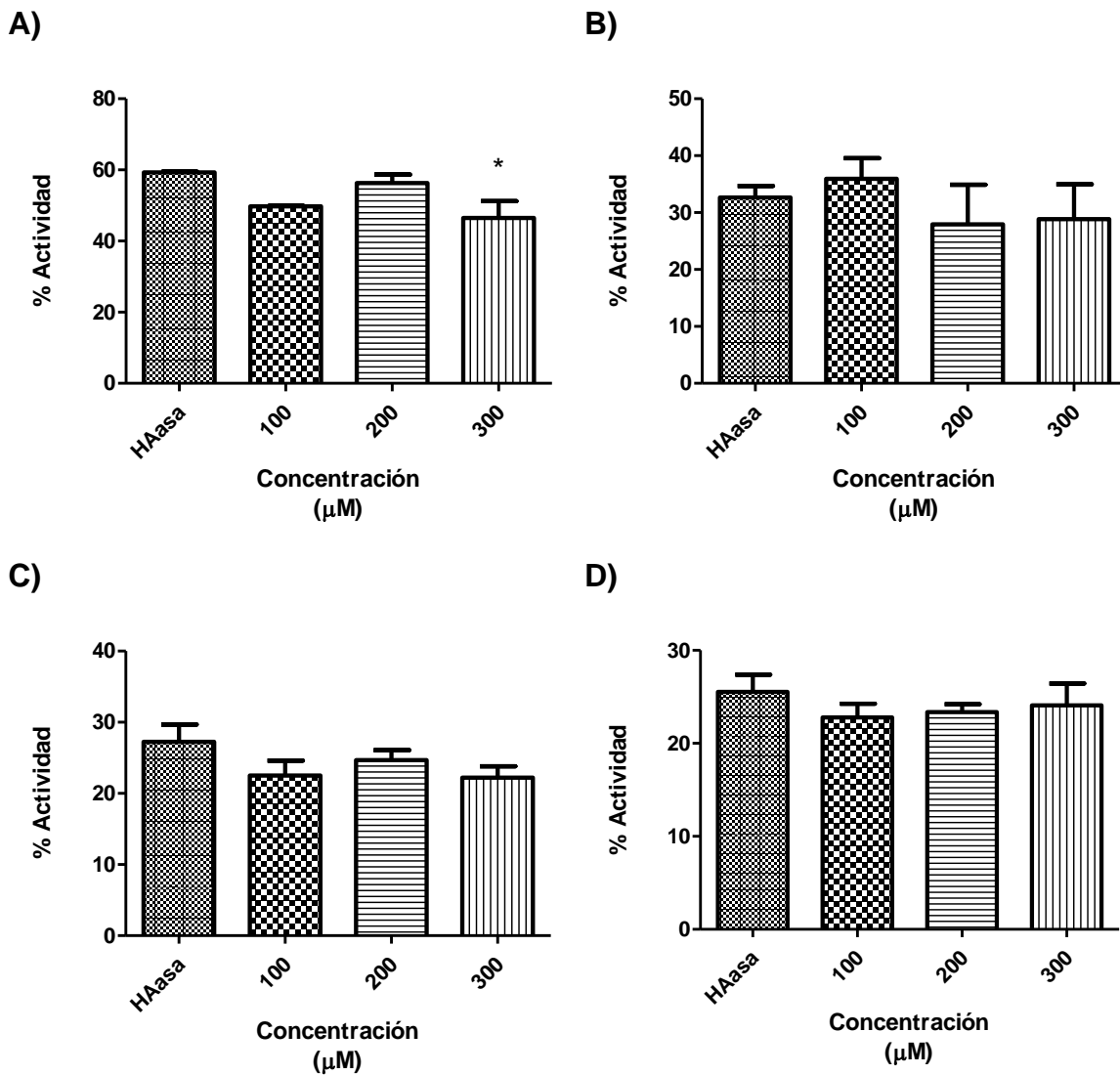


Figura 17. Actividad de la hialuronidasa de testículo bovino (HAasa, 20 μg/ml) en presencia de diferentes concentraciones (100, 200 y 300 μM) de ácido aristolóquico (A), ácido nordihidroguaiarético (B), catequina (C) y curcumina (D). \*Presentó diferencia significativamente menor con respecto al control (Prv) ( $P < 0.05$ ).

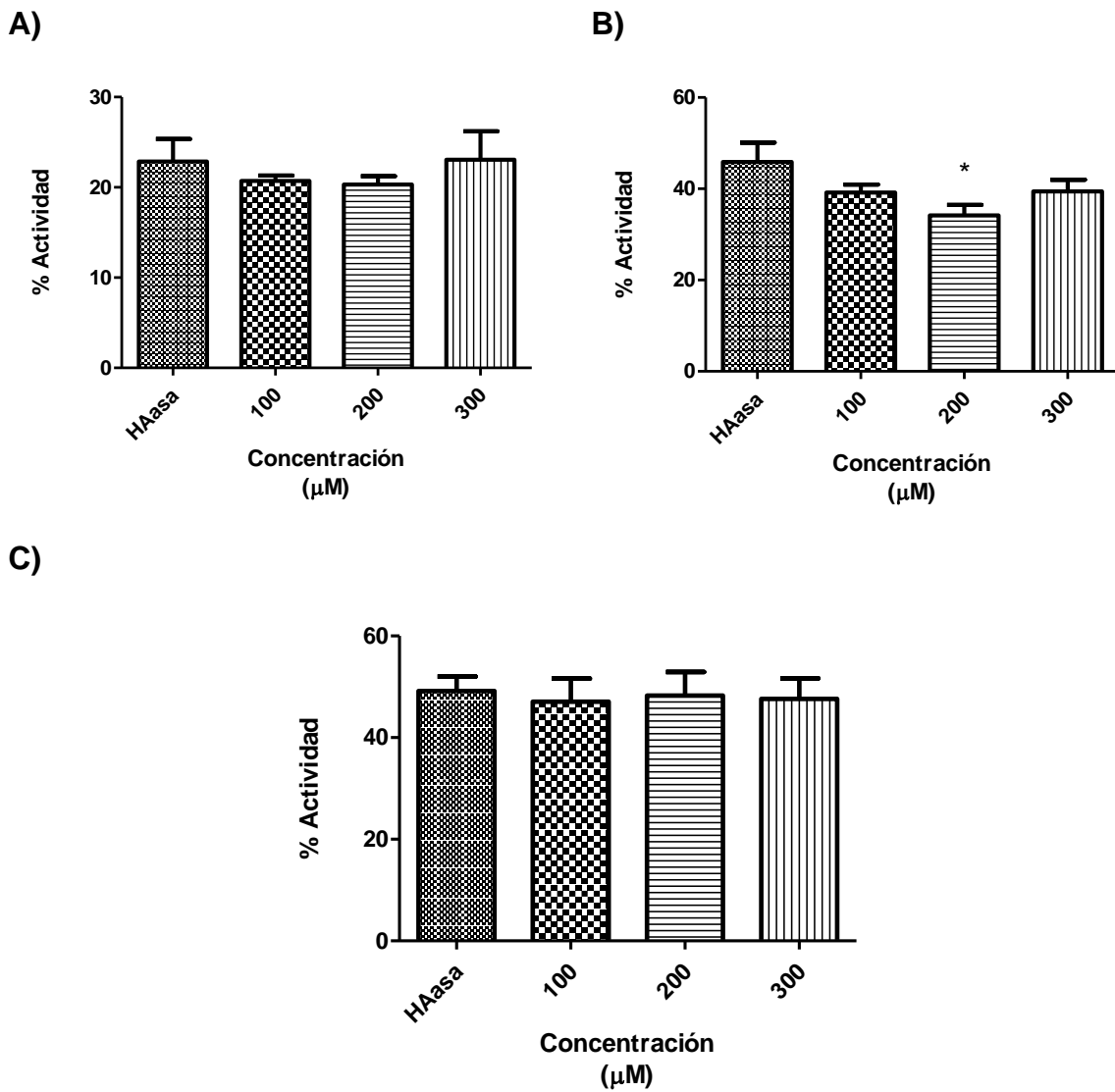


Figura 18. Actividad de la hialuronidasa de testículo bovino (HAasa, 20 μg/ml) en presencia de diferentes concentraciones (100, 200 y 300 μM) de indometacina (A), quercetina (B) y naringenina (C). \*Presentó diferencia significativamente menor con respecto al control (Prv) ( $P < 0.05$ ).

### **8.3 Acción inhibitoria de los extractos etanólicos de las especies vegetales sobre la actividad de hialuronidasa del veneno de *P. regalis***

De manera similar a lo realizado con los compuestos bioactivos, se probó la capacidad de los extractos etanólicos de diferentes especies vegetales para inhibir la actividad de hialuronidasa del veneno de *P. regalis* (Figura 19, 20 y 21). Así mismo, se evaluó también la capacidad de estos extractos para inhibir la actividad de la hialuronidasa de testículo bovino empleada como control (Figura 22, 23 y 24). Los resultados indicaron que el extracto etanólico de las partes aéreas de *Fumaria officinalis* L. produjo una reducción significativa de la actividad de hialuronidasa del veneno a las concentraciones de 500 ( $15.6 \pm 2.29\%$  de inhibición) y 1000  $\mu\text{g/ml}$  ( $14.11 \pm 2.15\%$  de inhibición); pero, este extracto no redujo la actividad del control de hialuronidasa. El extracto etanólico de los frutos de *Prunus serotina* Ehrh. Redujo la actividad de hialuronidasa del veneno a la concentración de 200  $\mu\text{g/ml}$  ( $56.61 \pm 1.8\%$  de inhibición); pero no ocurrió lo mismo con la enzima control. De manera similar, el extracto etanólico de los frutos de *Myrtillocactus geometrizans* (Martr. Ex Pfeiff.) Console redujo significativamente la actividad de hialuronidasa del veneno a la concentración de 200  $\mu\text{g/ml}$  ( $9.62 \pm 1.92\%$  de inhibición); pero, este mismo extracto también redujo significativamente la actividad de la enzima control a la misma concentración ( $26.23 \pm 3.68\%$  de inhibición). El extracto metanólico de la raíz de *Croton ciliatoglandulifer* Ortega también redujo la actividad de hialuronidasa del veneno a la concentración de 200  $\mu\text{g/ml}$  ( $10.25 \pm 2.01\%$  de inhibición), pero el extracto metanólico de los tallos de la misma planta no presentó actividad inhibitoria; además, ni el extracto de tallos ni el de raíz redujeron la actividad de la enzima control. Finalmente, a pesar de que el extracto etanólico de la raíz de *Ipomoea stans* Cav. no redujo significativamente la actividad del veneno, si redujo la actividad de la enzima control a las concentraciones de 100 ( $33.73 \pm 3.04\%$  de inhibición) y 200  $\mu\text{g/ml}$  ( $20.33 \pm 8.46\%$  de inhibición). Es importante mencionar que la actividad del veneno y de la enzima presentó altos valores a las concentraciones más altas de los extractos vegetales, debido a una posible interferencia a esas concentraciones.

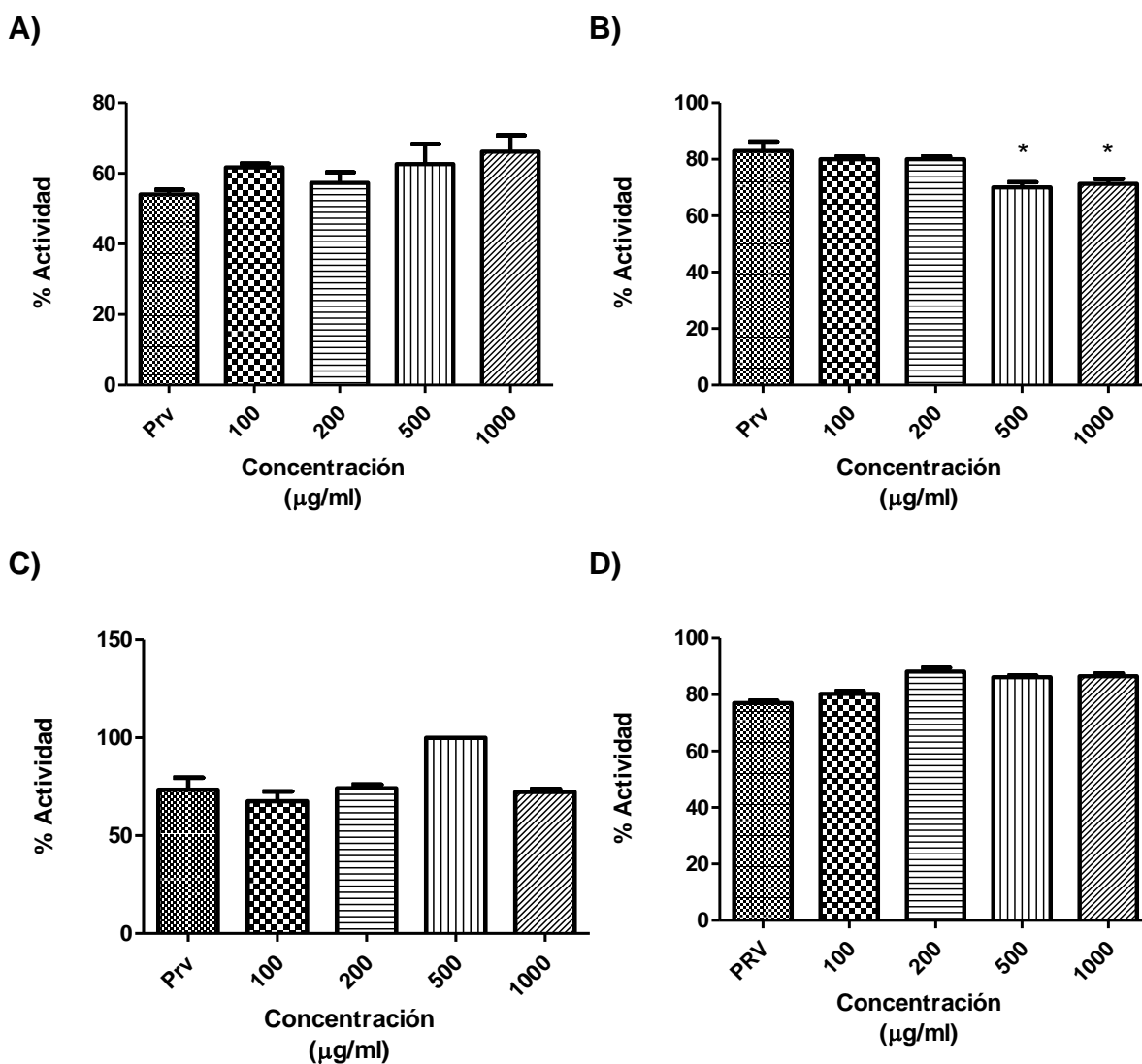


Figura 19. Actividad de hialuronidasa del veneno de *P. regalis* (Prv, 20 µg/ml) en presencia de diferentes concentraciones (100, 200, 500 y 1000 µg/ml) de los extractos etanólicos de *Lantana camara* L. (A), *Fumaria officinalis* L. (B), *Ceiba speciosa* (A. St.-Hil.) Ravenna (C) y del extracto metanólico de tallo de *Croton ciliatoglandulifer* Ortega (D). \*Presentó diferencia significativamente menor con respecto al control (Prv) ( $P < 0.05$ ).

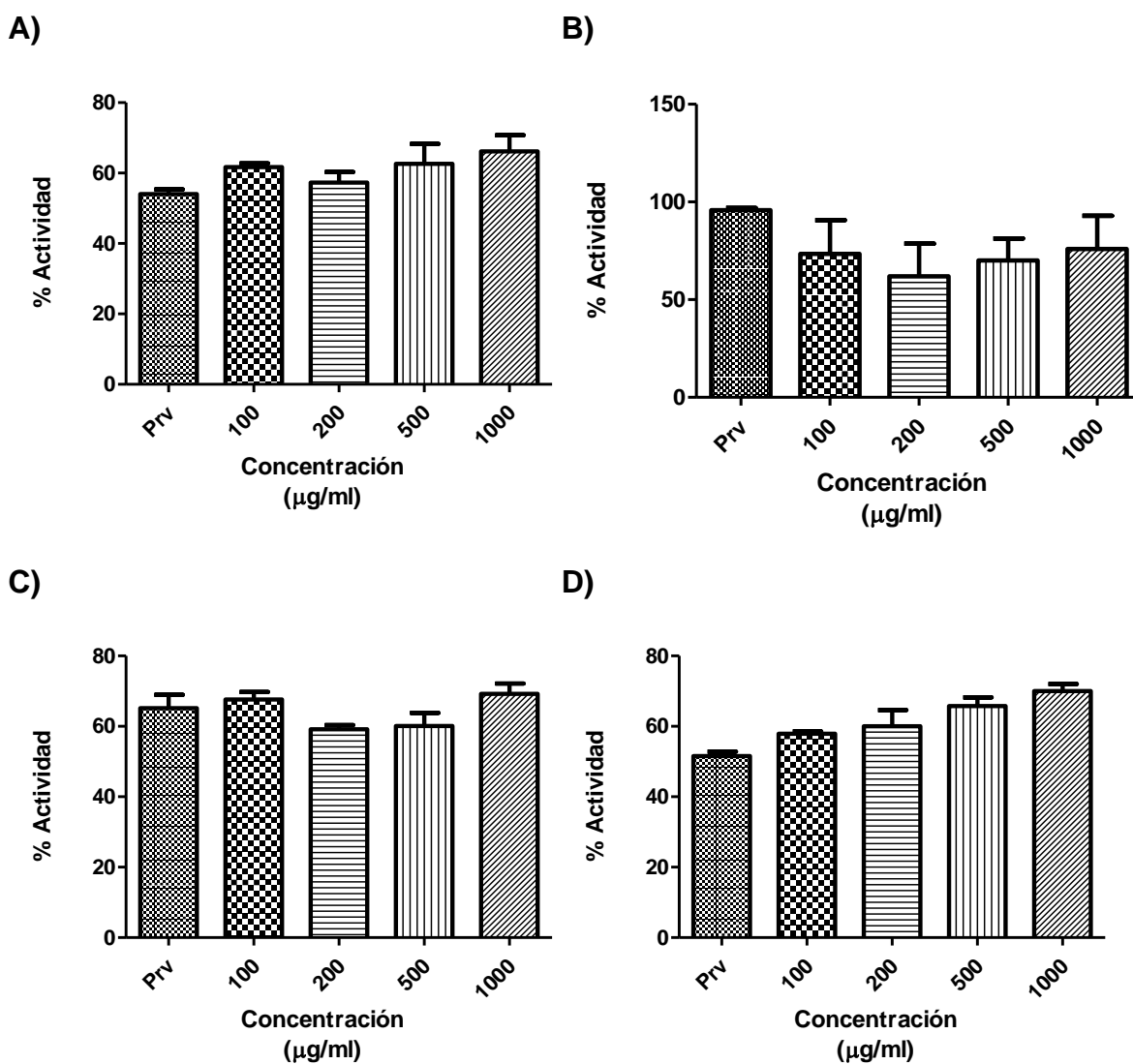


Figura 20. Actividad de hialuronidasa del veneno de *P. regalis* (Prv, 20 µg/ml) en presencia de diferentes concentraciones (100, 200, 500 y 1000 µg/ml) de los extractos etanólicos de *Ipomoea murucoides* Roem. y Schult (A), *Ipomoea stans* Cav. (B), *Ipomoea purpurea* (L.) Roth (C) e *Ipomoea cairica* (L.) Sweet (D). \*Presentó diferencia significativamente menor con respecto al control (Prv) ( $P < 0.05$ ).

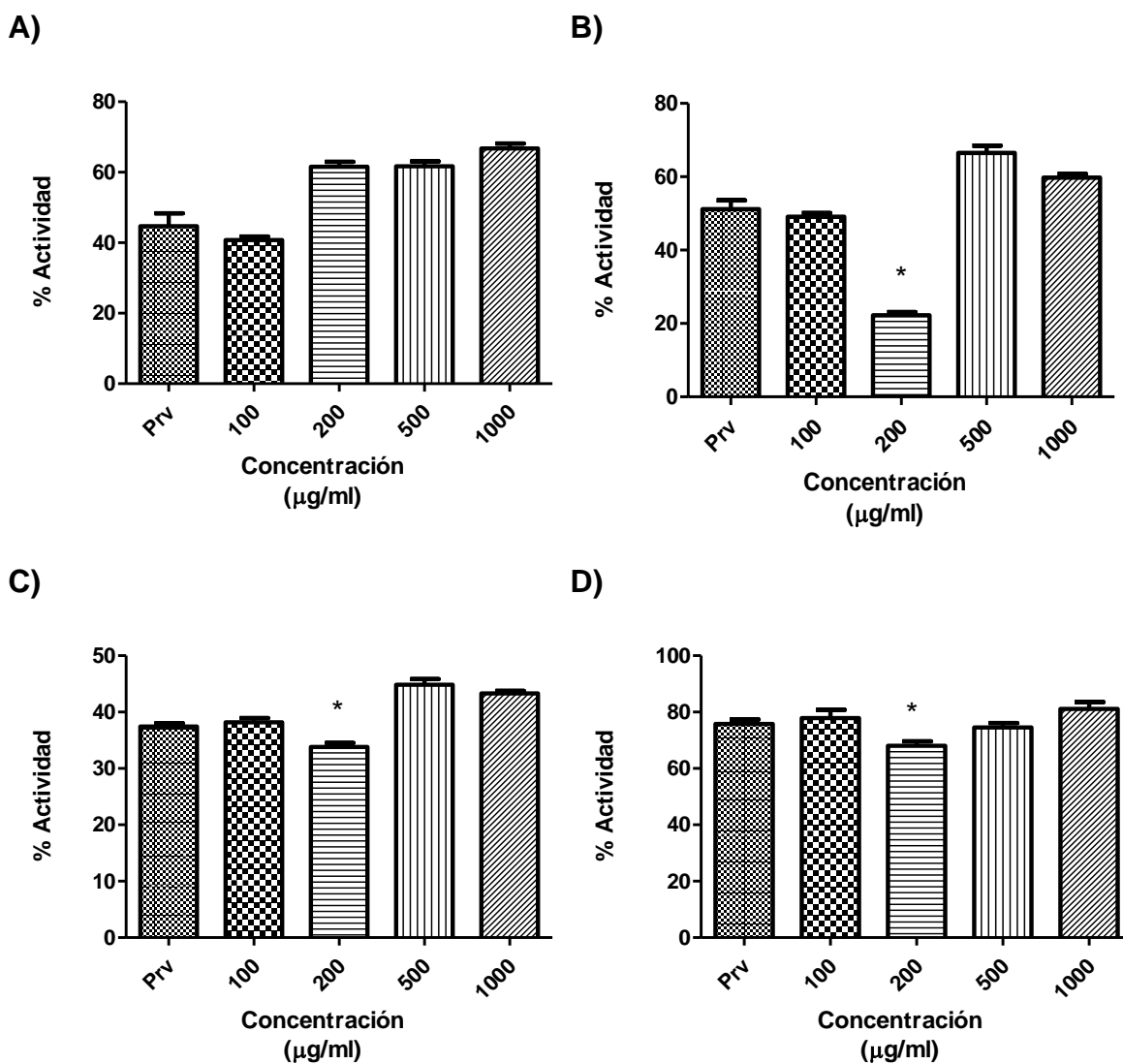
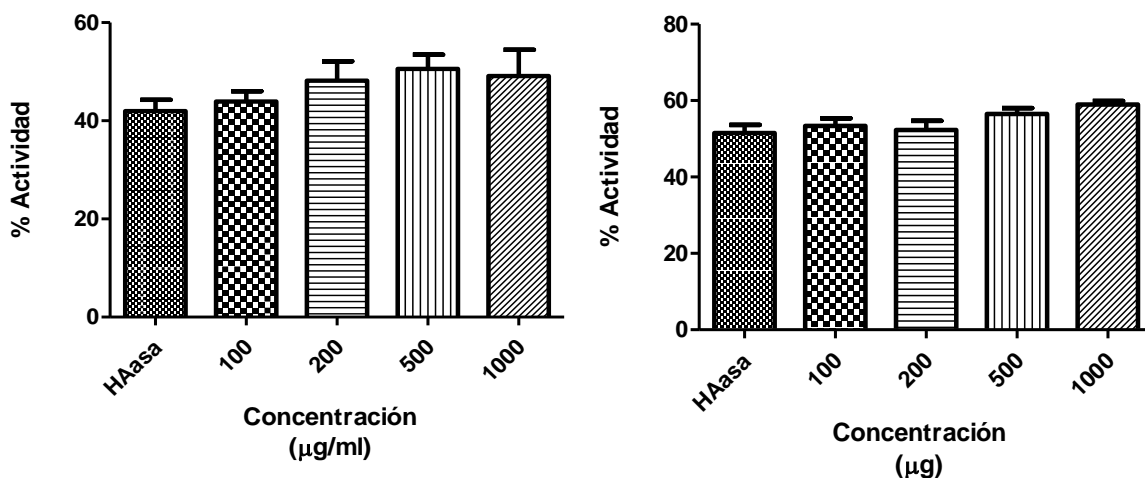


Figura 21. Actividad de hialuronidasa del veneno de *P. regalis* (Prv, 20 µg/ml) en presencia de diferentes concentraciones (100, 200, 500 y 1000 µg/ml) de los extractos etanólicos de *Ipomoea cardiophylla* A. Gray (A), *Prunus serotina* Ehrh. (B), *Myrtillocactus geometrizans* (Martr. Ex Pfeiff.) Console (C) y del extracto metanólico de raíz de *Croton ciliatoglandulifer* Ortega (D). \*Presentó diferencia significativamente menor con respecto al control (Prv) ( $P < 0.05$ ).

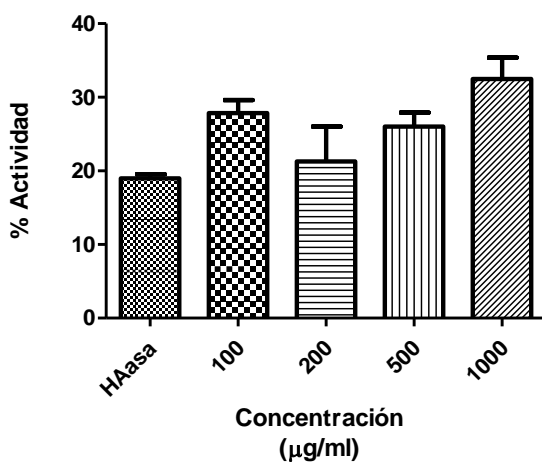
**A)**

**B)**





C)



D)

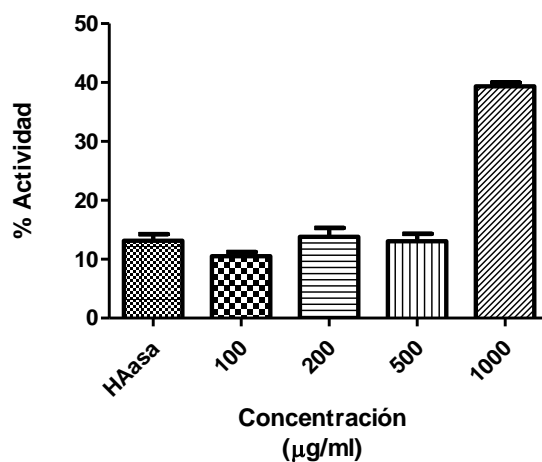


Figura .22 Actividad de la hialuronidasa de testículo bovino (HAasa, 20 µg/ml) en presencia de diferentes concentraciones (100, 200, 500 y 1000 µg/ml) de los extractos etanólicos de *Lantana camara* L. (A), *Fumaria officinalis* L. (B), *Ceiba speciosa* (A. St.-Hil.) Ravenna (C) y del extracto metanólico de tallo de *Croton ciliatoglandulifer* Ortega (D). \*Presentó diferencia significativamente menor con respecto al control (Prv) ( $P < 0.05$ ).

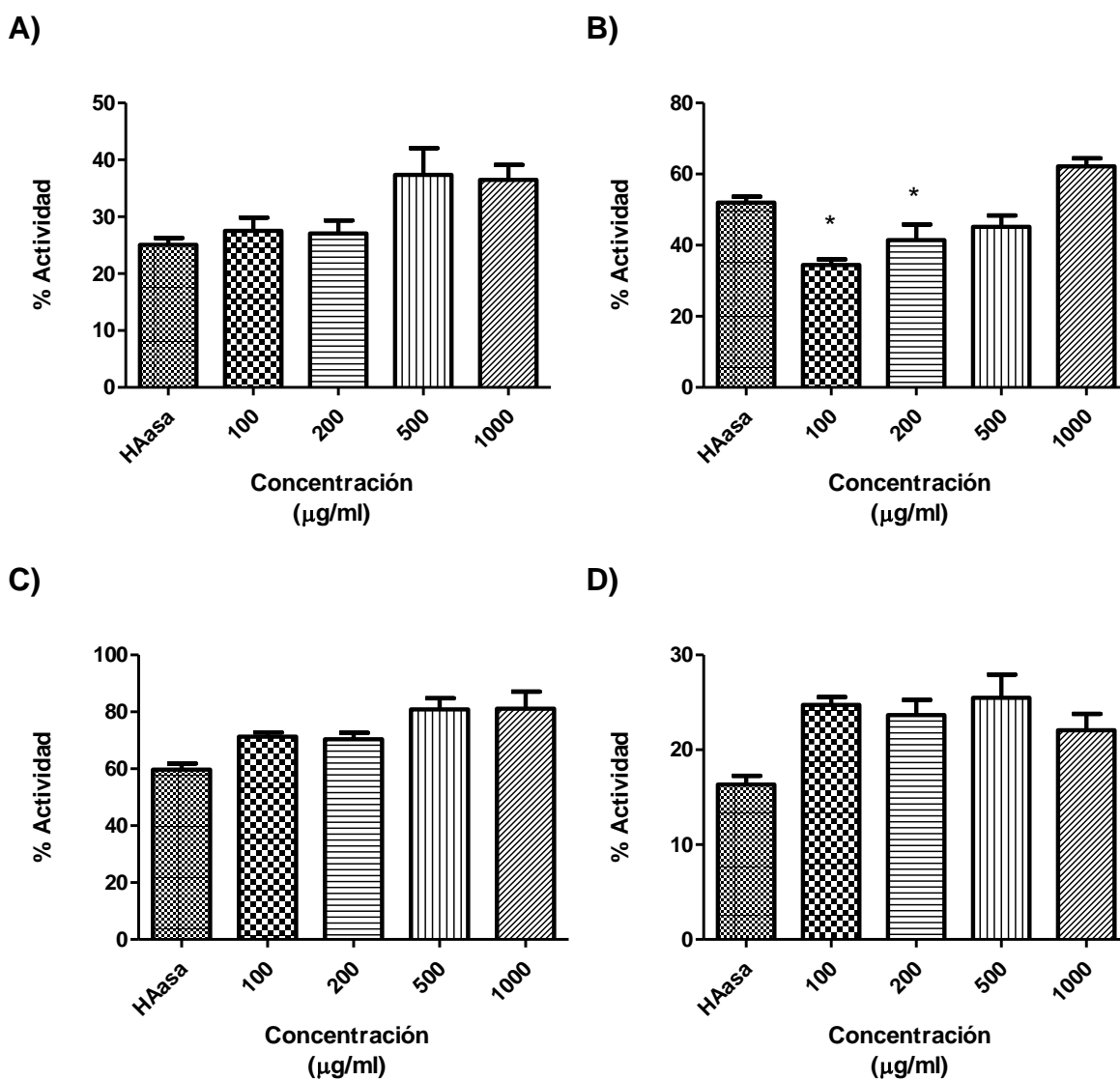


Figura 23. Actividad de la hialuronidasa de testículo bovino (HAasa, 20 µg/ml) en presencia de diferentes concentraciones (100, 200, 500 y 1000 µg/ml) de los extractos etanólicos de *Ipomoea murucoides* Roem. y Schult (A), *Ipomoea stans* Cav. (B), *Ipomoea purpurea* (L.) Roth (C) e *Ipomoea cairica* (L.) Sweet (D). \*Presentó diferencia significativamente menor con respecto al control (Prv) ( $P < 0.05$ ).

A)

B)

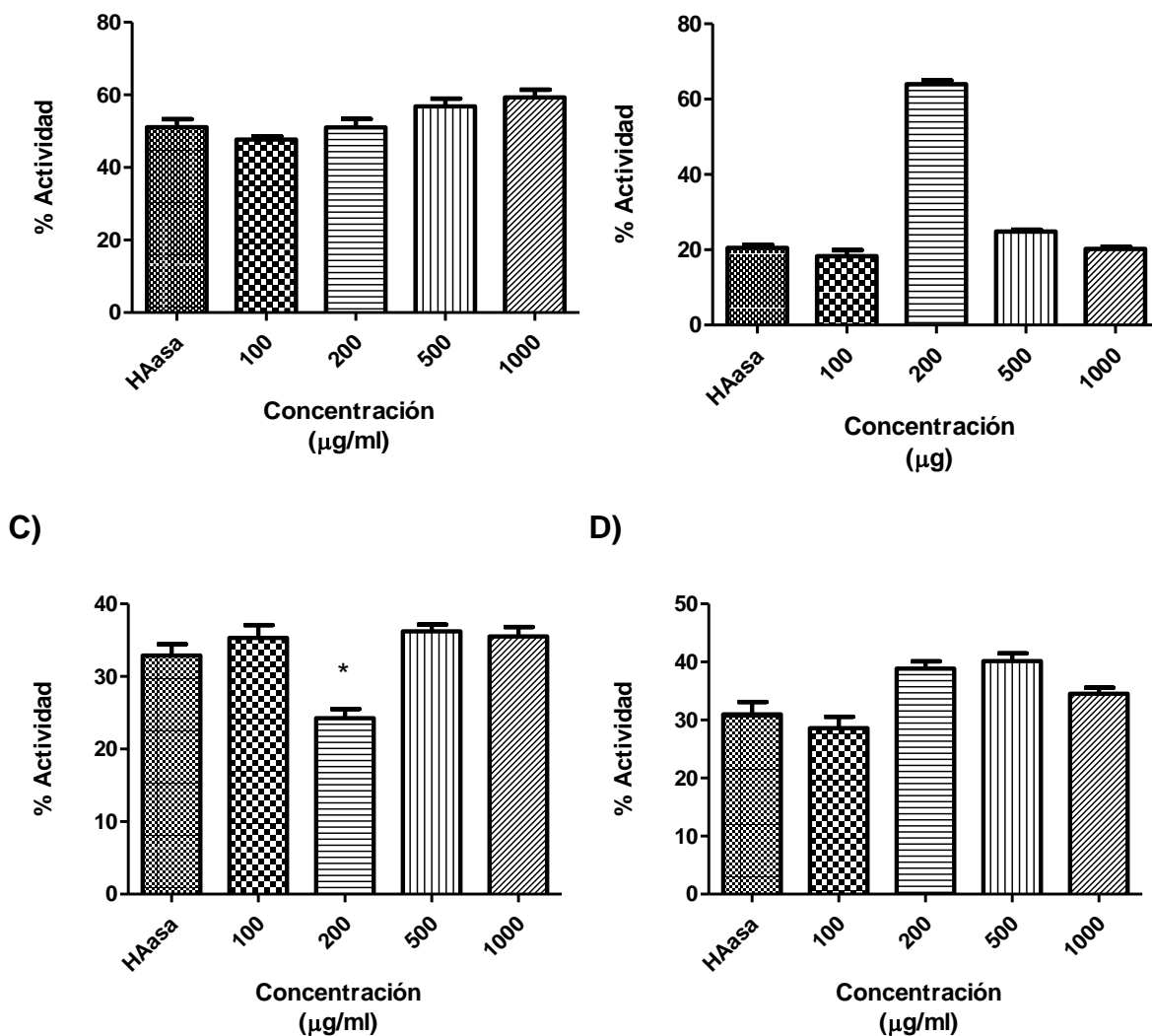


Figura 24. Actividad de la hialuronidasa de testículo bovino (HAasa, 20 µg/ml) en presencia de diferentes concentraciones (100, 200, 500 y 1000 µg/ml) de los extractos etanólicos de *Ipomoea cardiophylla* A. Gray (A), *Prunus serotina* Ehrh. (B), *Myrtillocactus geometrizans* (Martr. Ex Pfeiff.) Console (C) y del extracto metanólico de raíz de *Croton ciliatoglandulifer* Ortega (D). \*Presentó diferencia significativamente menor con respecto al control (Prv) ( $P < 0.05$ ).

#### **8.4. Efecto de los extractos sobre la toxicidad del veneno de *P. regalis* en grillos**

Mediante el ensayo de toxicidad en grillos se encontró que la DL<sub>50</sub> del veneno de *P. regalis* fue  $20.6 \pm 6.2$  µg/ g de peso. La administración de dos veces la DL<sub>50</sub> en los grillos produjo a las 24 horas un 40% de muertes, y un 20% de grillos paralizados que se recuperaron posteriormente. Al evaluar el efecto de los extractos etanólicos sobre la toxicidad del veneno se observó que solamente los extractos de *Ceiba speciosa* (A. St.-Hill) e *Ipomoea murucoides* Roem. y Schult. redujeron significativamente la toxicidad del veneno (Figuras 25, 26 y 27). Es importante mencionar que los extractos etanólicos de *I. stans* Cav., *I. purpurea* (L.) Roth, *I. cairica* (L.) Sweet, presentaron toxicidad al ser administradas en los grillos. Debido al bajo rendimiento, no fue posible evaluar los extractos de *Croton ciliantoglandulifer*.

#### **8.5. Efecto de los extractos sobre la toxicidad del veneno de *P. regalis* en ratones**

En ensayo de toxicidad en ratones indicó que la DL<sub>50</sub> fue  $10.8 \pm 2.04$  µg de veneno por gramo de peso. En el ensayo se observó que, a las dosis más altas, el veneno provocó movimientos más rápidos en los ratones con respecto a los controles, además de respiración forzada, saltos, convulsiones y muerte en el transcurso de una hora aproximadamente.

Al evaluar el veneno de *P. regalis* en los ratones a una concentración equivalente a dos veces la DL<sub>50</sub> se observó que los ratones inmediatamente presentaron convulsiones y saltos aproximadamente cada 30 segundos, el 66% de los ratones murió en el transcurso de 5 minutos, los ratones sobrevivientes siguieron vivos 24 horas después de la administración del veneno. Al administrar el veneno de *P. regalis* previamente incubado en presencia del extracto etanólico de *Ipomoea murucoides* Roem. y Schult., se observó un comportamiento similar en los ratones, con la diferencia que la respuesta no fue inmediata, las convulsiones periódicas tardaron de 2 a 3 minutos en presentarse. Sin embargo, al igual que con el veneno

solo, el 66% de los ratones murió en el transcurso de 5 minutos, por lo que no se mostraron diferencias en la toxicidad.

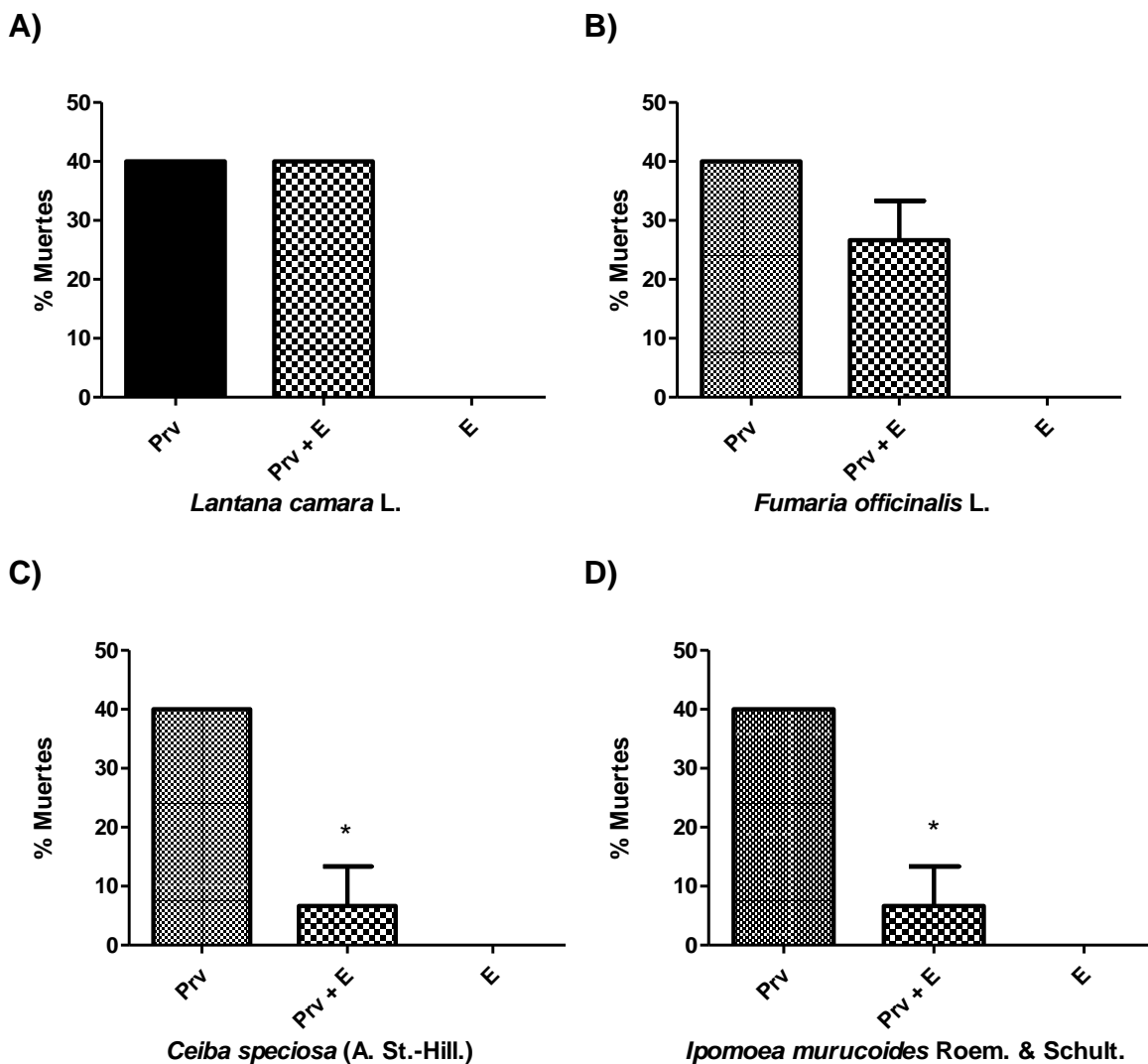


Figura .25 Toxicidad del veneno de *P. regalis* (dos veces la  $DL_{50}$ ) en grillos, en presencia (Prv + E) y ausencia (Prv) de los extractos etanólicos de las especies vegetales (6 partes de extracto por cada parte de veneno). Se evaluó la toxicidad del extracto etanólico solo (E) como control. Se emplearon grupos de 5 grillos y cada experimento se repitió 3 veces ( $n = 3$ ). \*Presentó diferencia significativamente menor con respecto al control (Prv) ( $P < 0.05$ ).

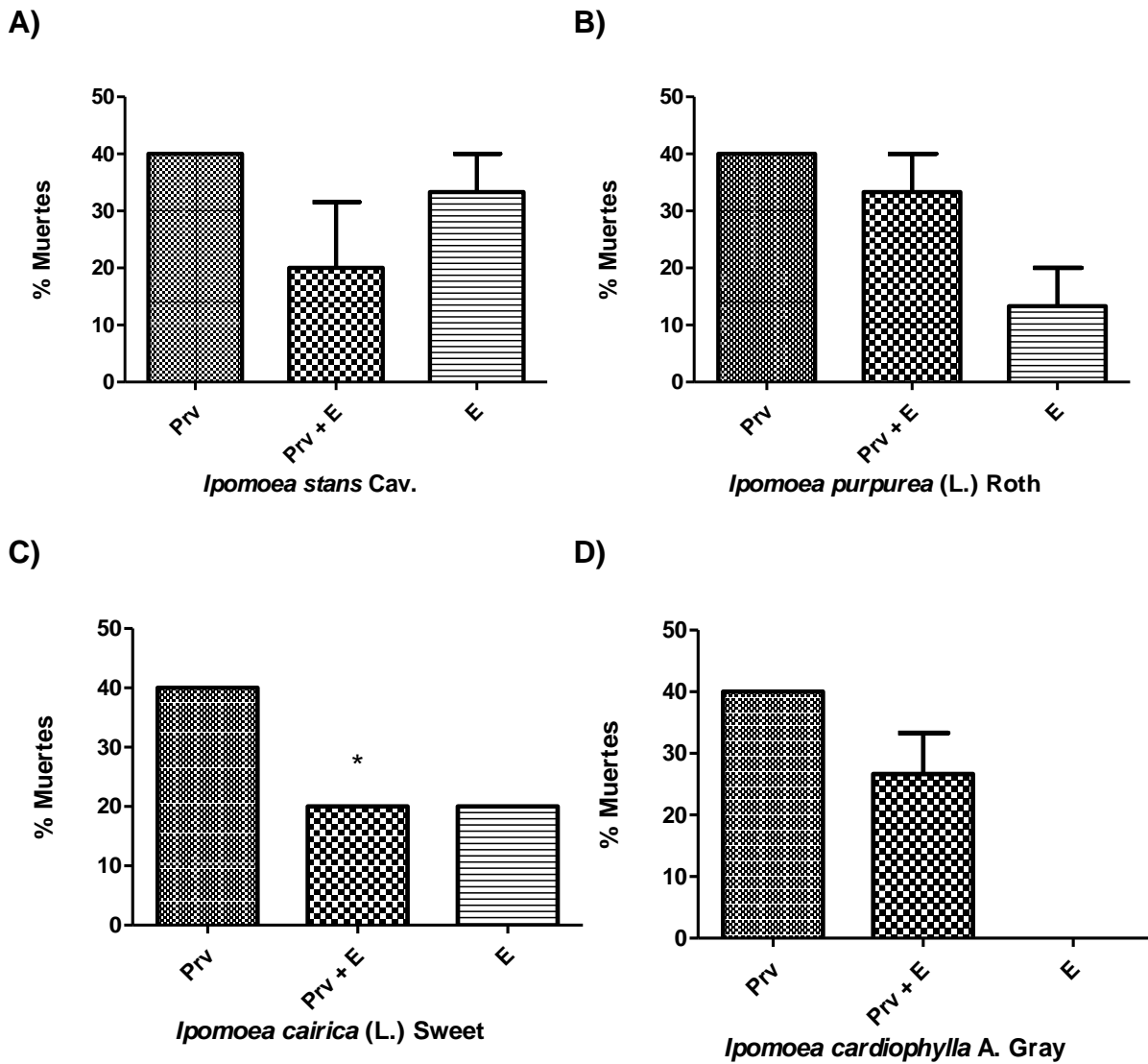


Figura 26. Toxicidad del veneno de *P. regalis* (dos veces la  $DL_{50}$ ) en grillos, en presencia (Prv + E) y ausencia (Prv) de los extractos etanólicos de las especies vegetales (6 partes de extracto por cada parte de veneno). Se evaluó la toxicidad del extracto etanólico solo (E) como control. Se emplearon grupos de 5 grillos y cada experimento se repitió 3 veces ( $n = 3$ ). \*Presentó diferencia significativamente menor con respecto al control (Prv) ( $P < 0.05$ ).

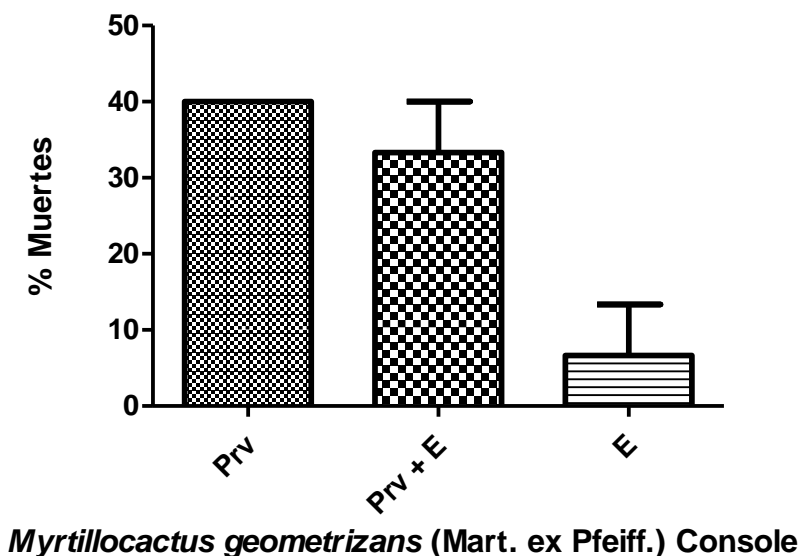
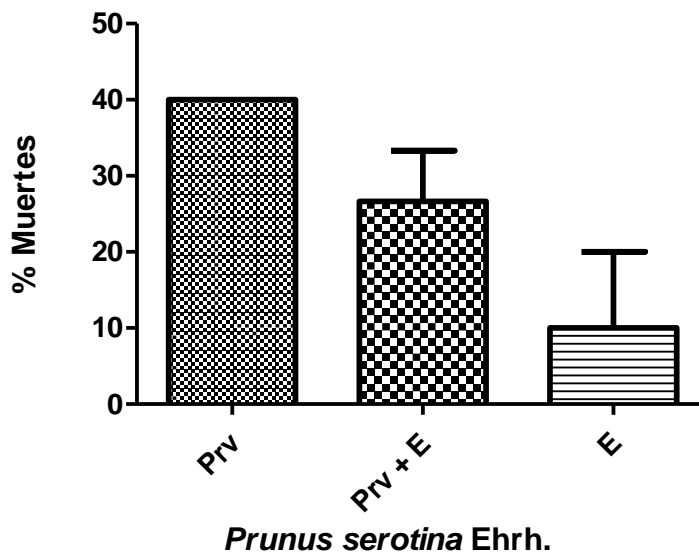


Figura 27. Toxicidad del veneno de *P. regalis* (dos veces la  $DL_{50}$ ) en grillos, en presencia (Prv + E) y ausencia (Prv) de los extractos etanólicos de los frutos de capulín y garambullo (6 partes de extracto por cada parte de veneno). Se evaluó la toxicidad del extracto etanólico solo (E) como control. Se emplearon grupos de 5 grillos y cada experimento se repitió 3 veces ( $n = 3$ ).

## 9. DISCUSIÓN

Dentro de la composición de los venenos de varios animales, las hialuronidasas son un componente fundamental para que el resto de los componentes del veneno ingresen a los tejidos de la presa. Estas enzimas son conocidas como “factores de dispersión”, que, como su nombre lo dice, son los componentes encargados de favorecer la difusión del veneno mediante la ruptura de la matriz extracelular, compuesta principalmente de glicosaminoglicanos, en su gran mayoría, ácido hialurónico y en menor cantidad sulfato de condroitina (Pardo y Selman, 2003; Stern *et al.*, 2006). Las hialuronidasas se han encontrado en venenos de arácnidos, himenópteros y serpientes (Rebello *et al.*, 2014). En un estudio realizado previamente por nuestro grupo de trabajo, se observó que las enzimas de este tipo pueden considerarse como un componente común en los venenos de las tarántulas (Rodríguez-Ríos *et al.*, 2017); en ese estudio, se realizó una caracterización bioquímica parcial de las hialuronidasas presentes en los venenos de algunas especies del género *Poecilotheria*. Sin embargo, en ese estudio previo no se logró hacer un estudio de especificidad de las hialuronidasas de esas especies, por lo que a estas enzimas se les nombró como “enzimas de tipo hialuronidasa”. Considerando ese punto, el primer paso en este estudio fue determinar la especificidad de las enzimas del veneno de *P. regalis* sobre tres tipos de sustrato: ácido hialurónico, sulfato de condroitina A y sulfato de condroitina B. Los resultados mostraron que el veneno degradó el ácido hialurónico de una manera dependiente de la concentración, es decir, al degradarse el ácido hialurónico se observó una menor turbidez. Por otro lado, el veneno no degradó significativamente a los sulfatos de condroitina a las concentraciones evaluadas en este estudio, lo que indica que las enzimas de tipo hialuronidasa presentes en el veneno de *P. regalis* son altamente específicas para el ácido hialurónico. Para probar que el ensayo funcionara de manera adecuada con cada uno de los sustratos, se realizaron pruebas con controles, una hialuronidasa (HAasa) y una condroitinasa (SCasa), indicando que efectivamente cada enzima control degradó a sus respectivos sustratos. En un estudio sobre la tarántula mexicana *Brachypelma vagans*, se evaluó también la capacidad del veneno de esa especie para degradar diferentes



sustratos y se encontró un resultado similar, la actividad fue altamente específica sobre ácido hialurónico (Clement *et al.*, 2012). Es posible que la especificidad de las hialuronidasas de tarántulas sobre el ácido hialurónico les provea una función de supervivencia, para defenderse de sus depredadores de una manera más eficaz, ya que el ácido hialurónico está presente ampliamente en tejido conectivo, epitelial y neuronal de los mamíferos (Bordon *et al.*, 2015; Stern *et al.*, 2006).

Al suprimir las enzimas tipo hialuronidasa no solo se disminuye el daño a la matriz celular, también disminuye la acción de las toxinas encargadas de desencadenar el envenenamiento (Rodríguez-Ríos *et al.*, 2017). Girish y Kemparaju (2005) comprobaron la actividad inhibitoria de algunos compuestos bioactivos sobre las hialuronidasas presentes en el veneno de la cobra (*Naja naja*), sus resultados difieren de los obtenidos aquí, excepto con catequina, e indometacina. Actualmente se sabe que las hialuronidasas tienen su actividad óptima en presencia de especies reactivas de oxígeno. Esto concuerda con lo que Scotti *et al.* 2016 mencionan, tanto los compuestos puros, como los extractos de plantas que presenten actividad antioxidante o antiinflamatoria influirán en la inhibición de la actividad de hialuronidasa y otras enzimas presentes en el proceso de degradación de la matriz extracelular al disminuir la presencia de especies reactivas de oxígeno producidas por la hidrólisis de HA (Scotti *et al.*, 2016). Es importante recordar que no todas las enzimas con actividad de hialuronidasa presentes en los venenos son similares, por lo tanto, no serán inhibidas de la misma manera con los mismos compuestos. Por ejemplo, el peso molecular es una de las principales diferencias entre las hialuronidasas de veneno de la cobra *N. naja* y la tarántula *P. Regalis*, 110 kDa y 36 kDa, respectivamente (Bordon *et al.*, 2015; García-Arredondo *et al.*, 2015; Kemparaju y Girish, 2006). Además, las asparaginas glicosiladas son la diferencia principal entre las isoformas de las hialuronidasas, que en cada especie presentan diferente posicionamiento y cantidad. Se ha puesto a prueba la actividad inhibitoria de hialuronidasa con ácido aristolóquico en el escorpión *Tityus serrulatus*, resultando 100% de inhibición con 26 µg del compuesto, presentando una inhibición positiva conforme aumentaba la concentración (Horta *et al.*, 2014).

Las hialuronidasas de los artrópodos presentan dos sitios de unión al sustrato, ácido aspártico y ácido glutámico, la mutación de alguno conduce a la pérdida de actividad enzimática. La presencia de la arginina en la estructura permite que el HA sea guiado al sitio de escisión, creyéndose que es mediante interacciones electroestáticas y que los residuos de triptófano y tirosina son los que promueven el correcto funcionamiento e interacción de la enzima con el sustrato, su modificación probaría la pérdida de la especificidad con el sustrato (Horta *et al.*, 2014). Se puede deducir entonces, basados en los datos de acoplamiento molecular de la inhibición de hialuronidasas de serpiente y escorpión, que la modificación de cualquiera de estos residuos desencadenaría un incorrecto funcionamiento de la enzima, ya sea en su catálisis, la especificidad o la interacción de la enzima con su sustrato. Aún no se conoce a profundidad cuál de estos residuos son los que se modifican con cada inhibidor. Sin embargo, es probable que la inhibición de la actividad de las hialuronidasas presentes en el veneno de *P. regalis* en presencia de catequina se deba a la naturaleza de flavonoide de la catequina, que interacciona con los residuos ácidos del sitio catalítico (E y D) de la enzima, impidiendo su acción correcta. Por otro lado, la indometacina como antiinflamatorio no esteroide, tiene su principal interacción con la enzima en los residuos de arginina y serina, interfiriendo en las interacciones eléctricas con HA sin poder anclarse para su escisión (Horta *et al.*, 2014; Sivaramakrishnan *et al.*, 2017).

En este estudio también se evaluó la capacidad de algunos extractos de plantas medicinales y frutos comunes en México para tratar el envenenamiento o por su alta cantidad de compuestos bioactivos, lo que incrementa la probabilidad de encontrar nuevas fuentes de compuestos bioactivos capaces de actuar como inhibidores de hialuronidasas del veneno de *P. regalis*. La búsqueda de propiedades contra envenenamiento en extractos vegetales se ha incrementado debido a la necesidad de tratamientos alternativos o coadyuvantes por los altos costos de los antivenenos. Se ha visto que los extractos de varias plantas pueden utilizarse como un complemento benéfico además del anti-suero en el tratamiento para el envenenamiento causado por serpientes, demostrándose la efectividad de muchas de estas tanto en la medicina tradicional como en ensayos farmacológicos, aplicando el extracto o la planta de manera interna o externa (Shabbir *et al.*, 2014;

Félix-Silva *et al.*, 2017). Específicamente con la actividad anti-hialuronidasa, también se han hecho estudios en donde se muestra la efectividad de extractos de plantas medicinales para inhibir la actividad enzimática de venenos de serpiente, teniendo buenos resultados con extractos con etanol y metanol debido a su alta composición en compuestos fenólicos (Fatima *et al.*, 2021). En este estudio, se encontró que el extracto etanólico de las partes aéreas de *Fumaria officinalis* L. produjo una reducción significativa de la actividad de hialuronidasa del veneno de *P. regalis*, sin presentar actividad inhibitoria sobre la enzima control; esto puede deberse a las diferencias estructurales de las hialuronidasas que ya se han explicado anteriormente. El extracto etanólico de los frutos de *Prunus serotina* Ehrh. también redujo la actividad de hialuronidasa del veneno. Mientras que el extracto etanólico de los frutos de *Myrtillocactus geometrizans* (Martr. Ex Pfeiff.) Console produjo un efecto inhibitorio similar. La reducción significativa de la actividad de hialuronidasa provocada por los extractos etanólicos de *P. serotina* y *M. geometrizans* concuerdan con las observaciones en estudios con hialuronidasas de veneno de serpientes, la actividad antioxidante y el alto contenido de fenoles totales, presentan una significativa reducción de la actividad hialuronidasa (Fatima *et al.*, 2021).

El presente estudio se enfocó en la inhibición de uno de los efectos biológicos del veneno de *P. regalis*, la actividad de hialuronidasa. Sin embargo, como ya se ha mencionado, los venenos de tarántula están constituidos por mezclas complejas, que además de varias isoformas de enzimas de tipo hialuronidasa (Rodríguez-Ríos *et al.*, 2017) contiene una gran cantidad de péptidos neurotóxicos que actúan en conjunto para paralizar a sus presas (Escoubas y Rash, 2004). Como se mencionó al inicio de esta sección, en este estudio se encontró que las enzimas presentes en este veneno son específicas para el ácido hialurónico, que es común en los tejidos de mamíferos, por lo que estas enzimas deben de jugar un papel importante para defenderse de sus depredadores que en su mayoría son mamíferos. Por lo tanto, el siguiente paso en este estudio fue determinar si los extractos de las especies vegetales tienen la capacidad de inhibir también la toxicidad en grillos. De esta manera, se observó que solamente los extractos de *Ceiba speciosa* (A. St.-Hill) e *Ipomoea murucoides* Roem. y Schult. redujeron significativamente la toxicidad del

veneno en los grillos. Es importante mencionar que los extractos etanólicos de *I. stans* Cav., *I. purpurea* (L.) Roth, *I. cairica* (L.) Sweet, presentaron toxicidad al ser administradas en los grillos. Para el caso de los extractos foliares de *I. stans*, se tiene registro de ser utilizado como antiespasmódico cuando es untado como pomada, sin embargo, al mezclar hojas con las flores se vuelve un insecticida en bajas concentraciones. Caso distinto con *I. murucoides*, donde, la infusión ingerida de toda la planta es utilizada para desinflamar y controlar los efectos de la picadura del alacrán (Meira *et al.*, 2012). Se realizaron controles a los que se les administró el etanol a las mismas cantidades que con los extractos, esto para asegurar que el efecto observado se debe al extracto.

Una vez determinado que el extracto de *I. murucoides*, puede ser un buen candidato para inhibir la toxicidad del veneno de *P. regalis*, se realizó el ensayo de toxicidad en ratones. En este caso, no se observó una disminución significativa de la toxicidad del veneno. Sin embargo, la muerte provocada por el veneno se retrasó unos minutos, por lo que podría realizarse un estudio más completo con esta especie. Como se observa en los resultados obtenidos en este estudio, el extracto etanólico de *I. murocoides* no redujo la actividad de hialuronidasa del veneno de *P. regalis* pero si disminuyó su toxicidad en grillos, por lo que podría estar ejerciendo un efecto inhibitorio sobre otros componentes del veneno.

## 10. CONCLUSIÓN

Los resultados de este estudio indicaron que las enzimas de tipo hialuronidasa presentes en el veneno de *P. regalis* actúan de manera altamente específica sobre el ácido hialurónico y no sobre sulfatos de condroitina. La actividad de hialuronidasa inducida por el veneno puede inhibirse en presencia de los compuestos catequina e indometacina. Estas enzimas también pueden inhibirse en presencia de los extractos etanólicos de los frutos de *Prunus serótina* y *Myrtillocactus geometrizans*. Por otro lado, de los extractos de las especies vegetales evaluados en este estudio, solamente los de *Ipomoea murucoides* y *Ceiba speciosa* redujeron la toxicidad en grillos, sugiriendo que estas especies podrían estar inhibiendo otros componentes del veneno distintos a las hialuronidasas. Por lo tanto, considerando los resultados observados en este estudio, se sugiere realizar estudios más completos de toxicidad con las especies de *Ipomoea murucoides* y *Ceiba speciosa*.

## 11. REFERENCIAS

Andreev-Andrievskiy, A., Popova, A., Lagereva, E., Osipov, D., Berkut, A., Grishin, E. y Vassilevski, A. (2017) Pharmacological analysis of *Poecilotheria* spider venoms in mice provides clues for human treatment. *Toxicon*, 138, 59-67.

Anger, E., Yu, F., Li, J. (2020) Aristolochic Acid-Induced Nephrotoxicity: Molecular Mechanisms and Potential Protective Approaches. *International Journal of Molecular Science*, 21(3), 1157.

Bala, E., Hazarika, R., Singh, P., Yasir, M., Shrivastava, R. (2017) A biological overview of Hyaluronidase: A venom enzyme and its inhibition with plants materials, *Materials today: proceeding*, 5, 6406-6412.

Bianchin dos Santos, F., Brandão Quines, C., Ben Pilissão, L.E., de Castro Dal Forno, A.H., Freitas Rodrigues, c., Casagrande Denardin, C., Moreira Farias, F., Silva Ávila, D. (2020) Aqueous bark extract of *Ceiba speciosa* (A. St.-Hill) Ravenna protects against glucose toxicity in *Caenorhabditis elegans*. *Oxid Med Cell Longev*.

Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. Universidad Nacional Autónoma de México, 2009. [www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx](http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx) [Consulta: 03 de diciembre 2022].

Borda, F., da Silva, P., Soares, T., Gonçalves, L., Correa, L., Gonçalves, T., Vieira, G., da Rocha, M., Barreto, M., Viana, E., Benedeta, R., Henrique, T., Guedes, P. (2016) Evaluation of antimicrobial, cytotoxic, and hemolytic activities from venom of the spider *Lasiadora* sp. *Toxicon*, 122, 119-126.

Bordon, K., Wiezel, G., Amorim, F., Arantes, E. (2015) Arthropod venom Hyaluronidases: biochemical properties and potential applications in medicine and biotechnology. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 21(43), 2-12.

Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.

Breene, R., Dean, D., Edwards, G., Hebert, B., Levi, H., Manning, G., McWest, K., Sorkin, L. (2003) Common names of arachnids. American Arachnological Society, Primera edición. Entomological Society of America, 10-19.

Buhren, B., Schrupf, H., Norman.Phillip, H., Bölke, E., Hilton, S., Gerber, P. (2016) Hyaluronidase: from clinical applications to molecular and cellular mechanisms. *European Journal of Medicinal Research*, 21(5), 2-7.

Caratozzolo, S. (2016) Las arañas gigantes. Morfología, comportamiento, alimentación y reproducción. Editorial de vecchi, S.A.U. España

Castillo, I. (2009). Evaluación *in vitro* de las propiedades antioxidantes y antimicrobianas de extractos del fruto de capulín (*Prunus serótina* subsp. capulí) [Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias Alimentarias]. Universidad Veracruzana.

Catálogo Fotográfico de Biodiversidad del Municipio de El Marqués, Querétaro 2016. Gobierno Municipal.  
[http://www.elmarques.gob.mx/inf\\_consulta/desa\\_urbano/2015-2018/CATALOGO ECOLOGIA.pdf](http://www.elmarques.gob.mx/inf_consulta/desa_urbano/2015-2018/CATALOGO ECOLOGIA.pdf) [Consulta: 03 de diciembre 2022].

CCA comunicado (2017), Plan de acción de América del Norte para un comercio sustentable de especies de tarántula, Comisión para la Cooperación Ambiental, Montreal, 48.

CITES (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora) (2019) consideration of proposals for amendment of appendices i and ii. Eighteenth meeting of the Conference of the Parties Colombo (Sri Lanka). [en línea] Disponible en: <https://cites.org/sites/default/files/eng/cop/18/prop/060319/E-CoP18-Prop-46.pdf> [Consulta: 26 de noviembre 2020].

Clement, H. Olvera, A., Rodríguez, M., Zamudio, F. Palomares, L.A., Possani, L.D., Odell, G.V., Alagón, A., Sánchez-López, R. (2012) Identification, cDNA cloning and heterologous expresión of a hyaluronidase from the tarantula *Brachypelma vagans* venom. *Toxicon*, 60(7):1223-1227.

CONABIO (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad) (2009) Verbenaceae *Lantana camara* L. Cinco negritos. [en línea] Disponible en: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/verbenaceae/lantana-camara/fichas/ficha.htm> [Consulta: 23 de febrero 2022].

Cuéllar-Balleza, L., Mosqueda, J., Vergara-Pineda, S. (2017) Parásitos de tarántulas (Araneae: Theraphosidae): Estudio de caso en Querétaro. *Boletín de la Sociedad Mexicana de Entomología*, 3, 77-82.

Da Silva Barth, C., Tolentino de Souza, H., Rocha, L., da Silva, G., Dos Anjos, M., Pastor, V., Belle Bresolin, T., García Couto, A., Roberto Santin, J., Meira Quintão, N., (2017) *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br (Convolvulaceae) relieved nociception and inflammation in mice - A topical herbal medicine against effects due to cnidarian venom-skin contact. *Journal of Ethnopharmacology*, 200(22),156-164.

Di Ferrante, N. (1956) Turbidimetric measurement of acid mucopolysaccharides and hyaluronidase activity. *Journal of Biological Chemistry*, 220, 303-306.

Díaz-Peña, L. (2017) "Identificación de las principales toxinas peptídicas presentes en el veneno de la tarántula *Poecilotheria regalis* (Pocock, 1899)". Tesis Maestro en Ciencias Químico Biológicas. Querétaro: Universidad Autónoma de Querétaro.

Díaz-Peña, L., Ramírez, R., Cuéllar-Balleza, L., Aguilar, M., Lazcano-Pérez, F., Arreguín-Espinosa, R., Ibarra-Alvarado, C., García-Arredondo, A. (2019). Rat aorta relaxation induced by the venom of *Poecilotheria regalis* involves the activation of the NO/cGMP pathway. *Toxicon*, 163, 12-18.

Dörr, J.A., Bitencourt, S., Bortoluzzi, L., Alves, C., Silva, J., Stoll, S., Pinteus, S., Boligon A.A., Vianna Santos, R.C., Laufer, S., Pedrosa, R., Goettert M.I. (2019). *In vitro* activities of *Ceiba speciosa* (A.St.-Hil) Ravenna aqueous stem bark extract. *Nat Prod Res*, 33(23), 3441-3444.



Escoubas, P., Rash, L (2004). Tarantulas: eight-legged pharmacists and combinatorial chemists. *Toxicon*, 43, 555-574.

Etuh, M.A., Ohemu, L.T., Pam, D.D. (2021). *Lantana camara* ethanolic leaves extracts exhibit anti-aging properties in *Drosophila melanogaster*: survival-rate and life span studies. *Toxicological Research (Camb)*, 10(1), 79-83.

Ezzat, M., Geny, S., Saad, A., Abdo, W., Sayed, A., Elmotayam, A. (2020). Secondary metabolites from *Lantana camara* L. flowers extract exhibit *in vivo* anti-urolithiatic activity in adult Wistar albino rats. *Natural Product Research*, doi.org/10.1080/14786419.2020.1853726.

Fatima, S., Aslam, N., Khalid, S, Ullah, K., Abbas, K., Hussain, S., Hissain Shah, S.S., Quereshi, Z., Qayum, M., Hassan Bin Asad, M. (2021). Antihyaluronidase and alkaline phosphatase (ALP) activities of medicinal plants to combat *Echis carinatus* venom-induced toxicities. *Biomed. Res. Int.* 2021, 6618349.

Félix-Silva, J., Silva-Junior, A.A., Zucolotto, S.M., Fernandes-Pedrosa M.F. (2017). Medicinal plants for the treatment of local tissue damage induced by snake venoms: An overview from traditional use to pharmacological evidence. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2017, 5748256.

Fuchs, J. von Deched, M., Mordasini, R., Ceschi, A., Nentwig, W. (2013). A verified spider bite and a review of the literature confirm Indian ornamental tree spiders (*Poecilotheria* species) as underestimated theraphosids of medical importance. *Toxicon*, 77, 73-77.

Garcia-Arredondo, A., Rodriguez-Rios, L., Diaz-Peña, M., Vega-Angeles, R. (2015). Pharmacological characterization of venoms from three theraphosid spiders: *Poecilotheria regalis*, *Ceratogyrus darlingi* y *Brachypelma epicureanum*. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 21(15), 1-9.

Girish, K., Kemparaju, K. (2005). Inhibition of *Naja naja* Venom Hyaluronidase by Plant-Derived Bioactive Components and Polysaccharides. *Biochemistry (Moscow)*, 70(8), 948-952.

Girish, K., Kemparaju, K., Nagaraju, S., Vishwanath, B. (2009). Hyaluronidase Inhibitors: A Biological and Therapeutic Perspective. *Current Medicinal Chemistry*, 16(18), 2261-2288.

Guía-García, J. L., Charles-Rodríguez, A. v., López-Romero, J. C., Torres-Moreno, H., Genisheva, Z., Robledo-Olivo, A., Reyes-Valdés, M. H., Ramírez-Godina, F., García-Osuna, H. T., y Flores-López, M. L. (2021). Phenolic Composition and Biological Properties of *Rhus microphylla* and *Myrtillocactus geometrizans* Fruit Extracts. *Plants*, 10(10), 2010.

Guzmán, F. A., Segura-Ledesma, S. D., y Almaguer-Vargas, G. (2020). El capulín (*Prunus serotina* Ehrh.): árbol multipropósito con potencial forestal en México. *Madera y Bosques*, 26(1).

Gwaltney-Brant, S., Dunayer, E., Hany, Y. (2018). Chapter 58 Terrestrial zootoxins En: Gupta, R. *Veterinary Toxicology*, 3era edición. Estados Unidos, Elsevier Inc., 781-801.

Herzig V., Khalife A., Chong Y., Isbister G., Currie B., Churchill T., Horner S., Escoubas P., Nicholson G., Hodgson W. (2008). Intersexual variations in northern (*Missulena pruinosa*) and eastern (*M. bradleyi*) mouse spider. *Toxicon*, 51, 1167-1177.

Horta, C. C. R., Magalhães, B. de F., Oliveira-Mendes, B. B. R., Carmo, A. O. do, Duarte, C. G., Felicori, L. F., Machado-de-Ávila, R. A., Chávez-Olórtegui, C., Kalapothakis, E. (2014). Molecular, Immunological, and Biological Characterization of *Tityus serrulatus* Venom Hyaluronidase: New Insights into Its Role in Envenomation. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(2).

Ikonomopoulou, M., Smith, J., Herzig, V., Pineda, S., Dziemborowicz, S., Sing-Yan, E., Durek, T., Gilchrist, J., Alewood, P., Nicholson, G., Bosmans, F. King, G. (2016). Isolation of two insecticidal toxins from venom of the Australian theraphosid spider *Coremiocnemis tropix*. *Toxicon*, 123, 62-70.

Islas-Barrios, Y., Serrato-Díaz, A., Zavala-Hurtado, J. A., Octavio-Aguilar, P., Callejas-Chavero, A., Cornejo-Romero, A. (2020). Las flores de *Myrtillocactus geometrizans* (Cactaceae): morfología y artrópodos visitantes en un gradiente geográfico. *Botanical Sciences*, 99(1), 28–42.

Isoyama, T., Thwaites, D., Selzer, M., Carey, R., Barbucci, R., Lokeshwar, V. (2006). Differential selectivity of hyaluronidase inhibitors toward acidic and basic hyaluronidases. *Glycobiology*, 16, 11-21.

Kemparaju, K., Girish, K. S. (2006). Snake venom hyaluronidase: a therapeutic target. *Cell Biochem Funct*, 24, 7–12.

Lima, M., Bitencourt, M., Furtado, A., Oliveira Rocha, H., Oliveira, R., da Silva-Júnior, A., Tabosa do Egito, E., Tambourgi, D., Zucolotto, S., Fernandes-Pedrosa Mde F. (2014) *Ipomoea asarifolia* neutralizes inflammation induced by *Tityus serrulatus* scorpion venom. *Journal of Ethnopharmacology*, 153(13), 890-895.

López-Palestina, C., Aguirre-Mancilla, C., Ramírez-Pimentel, J., Raya-Pérez, J., Santiago-Saenz, Y., Gutiérrez-Tlahque, J., Hernández-Fuentes, A. (2019). Compuestos bioactivos y actividad antioxidante en tres estados de madurez de *Myrtillocactus geometrizans* provenientes del Valle del Mezquital, Hidalgo. *Investigación y Desarrollo En Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 4, 317–322.

Malakar, C., Choudhury, P. (2015). Pharmacological potentiality and medicinal uses of *Ipomoea aquatica* forsk: a review. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 2(8), 60-63.

Mansoori, A., Singh, N., Dubey, S., Thakur, T., Alkan, N., Das, S., Kumar, A. (2020). Phytochemical characterization and assessment of crude extract from *Lantana camara* L. for antioxidant and antimicrobial activity. *Frontiers in Agronomy*, 2, 582268.

Marković-Housley, Z., Miglierini, G., Soldatova, L., Rizkallah, P., Müller, U., Schirmer, T. (2000). Crystal structure of hyaluronidase, a major allergen of bee venom. *Structure*, 15(8), 1025-35

Meira, M., Silva, E., David, J.M, David, J. P. (2012). Review of the genus *Ipomoea*: traditional uses, chemistry and biological activities. *Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 22(3), 682-713.

Mila-Arango, R., Ramírez-Bribiesca, E., Soto-Hernández, R., Hernández-Mendo, O., Torres-Hernández, G., Mellado-Bosque, M. (2014) Identificación y estudio fitoquímico de dos especies de cazahuate en la intoxicación de cabras en una comunidad de la mixteca oaxaqueña. *Agricultura, sociedad y Desarrollo*, 11(4), 463-479.

Molur, S., Daniel, B., Siliwal, M. (2004). Distribution of the regal parachute spider *Poecilotheria regalis* Pocock, 1899. *Zoos' Print Journal*: 19(10), 1665-1667.

Molur, S., Siliwa, M. (2008). At last! Indian Tarantulas on IUCN Red List. *Zoos' Print Journal*, 12(23), 1-3.

Mortari, M., do Couto, L., dos Anjos, L., Mourão, C., Camargos, T., Vargas, J., Oiveira, F., Gati, C., Schwartz, C., Schwartz, E. (2012). Pharmacological characterization of *Synoeca cyanea* venom: an aggressive social wasp widely distributed in the Neotropical region. *Toxicon*, 59(1), 163–70.

Nile, S., Keum, Y. (2017) Antioxidant, anti-inflammatory and enzyme inhibitory activities of 10 selected Unani herbs. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 12, 162-64.

Ocaña, J., Tadeo, M. de los A. (2018). Características farmacognósticas y cuantificación espectrofotométrica de antocianinas totales del fruto de *Prunus serótina*. Subsp. *capuli* (Cav) Mc Vaugh "Capulí". [Tesis I]. UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO.

Oldrati, V., Koua, D., Allard, P-M., Hulo, N., Arrell, M., Nentwing, W., Lisacek, F., Wolfender, J-L., kunh-Nentwing, L., Stöcklin, R. (2017) Peptidomic and transcriptomic profiling of four distinct spider venoms. *Plos one*, 12(3), 1-18.

Orozco, J., Rodríguez-Monroy, M., Martínez, K., Flores, C., Durán, A., Rosas-López, R., Hernández, L.B., Canales, M. (2013) Evaluation of some medicinal properties of *Ceiba aesculifolia* subsp. *parvifolia*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(7), 309-314.

Pardo, A., Selman, M (2003) "La célula y su microambiente" En: Jiménez, L. y Merchant, H. *Biología celular y molecular*, 1era Edición. México, Pearson Educación, 515-540.

Pongprayoon, U., Bohlin, L., Wasuwat, S., (1991) Neutralization of toxic effects of different crude jellyfish venoms by an extract of *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br. *Journal of Ethnopharmacology*, 35(1), 65-9.

Raafat, K.M., El-Zahaby S.A. (2020). Niosomes of active *Fumaria officinalis* phytochemicals: antidiabetic, antineuropathic, anti-inflammatory, and possible mechanism of action. *Chin Med*, 15, 40.

Rocha-e-Silva, T., Sutti, R., Hyslop, S., (2009). Milking and partial characterization of venom from the Brazilian spider *Vitalius dubius* (Theraphosidae). *Toxicon*, 53, 153-161.

Rodriguez-Rios, L., Diaz-Peña, L., Lazcano-Perez, F., Arreguin-Espinosa, R., Rojas-Molina, A., Garcia-Arredondo, A. (2017). Hyaluronidase-like enzymes are a frequent component of venoms from theraphosid spiders. *Toxicon*, 136, 34-43.

Sánchez, F., Ehrenfeld, I., Durán, W. (2013). S-nitrosation of proteins: an emergent regulatory mechanism in microvascular permeability and vascular function. *Tissue Barriers*.

Santhosh, S., Hemshekhar, M., Sunitha, K., Thushara, R., Jnaneshwari, S., Kemparaju, Girish K. (2013). Snake venom induced local toxicities: Plant secondary metabolites as an auxiliary therapy. *Medical Chemistry*, 13, 103-123.

Scotti, L., Singla, R., Ishiki, H., Mendonça, F., Silva, M., Barbosa Filho, J.M., Scotti, M. (2016) Recent advancement in natural hyaluronidase inhibitors. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 16 (29).

Senbanjo, L., Chellaiah, M. (2017) CD44: A Multifunctional Cell Surface Adhesion Receptor is a regulator of progression and metastasis of cancer cells. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 5(18).

Shabbir, A., Shahzad, M., Masci, P., Gobe, G.C. (2014). Protective activity of medicinal plants and their isolated compounds against the toxic effects from the venom of *Naja* (cobra) species. *Journal of Ethnopharmacology*. 157, 222-227.

Sivaramakrishnan, V., Ilamathi, M., Girish, K. S., Kemparaju, K., Rangappa, K. S., Dhananjaya, B. L. (2017). Viper venom hyaluronidase and its potential inhibitor analysis: a multipronged computational investigation. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 35(9), 1979–1989.

Solís, D., García-Vieyra, M. (2017). Perfil fitoquímico de compuestos bioactivos y determinación de la capacidad antioxidante de plantas medicinales. *Verano de La Investigación Científica*, 3(2), 27–32.

Stern, R., Asari, A. Sugahara, K. (2006). Hyaluronan fragments: An information-rich system. *European Journal of Cell Biology*, 85, 699-715.

Suastegui-Baylón, L., Salazar, R., Maldonado-Astudillo, Y., Ramírez-Sucre, M., Arámbula-Villa, G., Flores-Casamayor, V., Jiménez-Hernández, J. (2021) Physical, chemical and rheological characterization of tuber and starch from *Ceiba aesculifolia* subsp. *parvifolia*. *Molecules*, 26(7), 2097.

Sunitha, K., Suresh, P., Santhosh, M., Hemshekhar, M., Thushara, R., Marathe, G., Thirunavukkarasu, C., Kemparaju, K., Kumar, M., Girish, K. (2013) Inhibition of hyaluronidase by N-acetyl cysteine and glutathione: Role of thiol group in hyaluronan protection. *International Journal of Biological Macromolecules*, 55, 39-46.

Thibeault, S., Rautureay, Y., Oubaha, M., Faubert, D., Wikes, B., Delisle, C., Gratton, J. (2010). S-nitrosilation of beta-catenin by eNOS-derived NO promotes VEGF-induced endothelial cell permeability. *Molecular Cell*, 39(12), 468–476.

Tobyn, G., Denham, A., Whitelegg, M., Rowling, M. (2011) “Chapter 16: *Fumaria officinalis*, fumitory.” En: *The western herbal tradition 2000 years of medicinal plant knowledge*, USA, Editorial Elsevier. 165–172.

Tomohara K, Ito T, Onikata S, Kato A, Adachi I (2017). Discovery of hyaluronidase inhibitors from natural products and their mechanistic characterization under DMSO-perturbed assay conditions. *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters*, 27, 1620-1623.

Uka, C., Uwabunkeonye, O., Muoka, R., Chidozie, A. (2020) Comparative phytochemical study of the parts of *Ipomoea* species. *Journal of Medicinal Plants Studies*, 8(4), 257-261.

WSC (2020). World Spider Catalog. Version 22.0. Natural History Museum Bern, [en línea] Disponible en: <http://wsc.nmbe.ch> [Consulta: 26 de noviembre 2020].

Wu, P., Song, Z., Wang, X., Li, Y., Li, Y., Cui, J., Tuerhong, m., Jin, D., Abudukeremu, M., Lee, D., Xu, J. Guo, Y. (2020). Bioactive triterpenoids from *Lantana camara* showing anti-inflammatory activities *in vitro* and *in vivo*. *Bioorganic Chemistry*.

Xavier-Santos, J.B., Ramos Passos, J.G., Santos Gomes, J.A., Cavalcante Cruz, J.V., Ferreira Alves, J.S., Barreto Garcia, V., Moreira da Silva, R., Peporine Lopes, N., Fernandes Araujo-Junior, R., Zucolotto S.M., Silva-Junior, A.A., Félix-Silva, J., Fernandes-Pedrosa M.F. (2022). Topical gelcontaining phenolic-rich extract from *Ipomoea pes-capre* leaf (Convolvulaceae) has anti-inflammatory, wound healing, and antiophidic properties. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 149, 112921.

Xu, D., Hu, M., Wang, Y., Cui, Y. (2019). Antioxidant activities of quercetin and its complexes for medicinal application. *Molecules*, 24(6) 1123.

Zhang, R., Guo, Q., Kennelly, E.J., Long, C., Chai, X. (2020). Diverse alkaloids and biological activities of *Fumaria* (Papaveraceae): An ethnomedicinal group. *Fitoterapia*, 146:104697.

Zhang, Y. (2015). Why do we study animal toxins?. *Zoological research*, 36(4), 183-222.