

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

“CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE HIALURONIDASAS
PRESENTES EN LOS VENENOS DE TARÁNTULAS DEL
GÉNERO *Poecilotheria*”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

PRESENTA

Q.F.B. LUIS HUMBERTO RODRÍGUEZ RIOS

DIRIGIDA POR

Dr. JOSÉ ALEJANDRO GARCÍA ARREDONDO

QUERÉTARO, QRO. CENTRO UNIVERSITARIO

NOVIEMBRE DE 2016



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

**“CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE HIALURONIDASAS PRESENTES
EN LOS VENENOS DE TARÁNTULAS DEL GÉNERO *Poecilotheria*”**

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

PRESENTA

Q.F.B. LUIS HUMBERTO RODRÍGUEZ RÍOS

SINODALES

Dr. José Alejandro García Arredondo
Presidente

Dra. Alejandra Rojas Molina
Secretario

Dr. Manuel B. Aguilar Ramírez
Vocal

Dra. Jesica E. Escobar Cabrera
Suplente

Dr. Mamadou Moustapha Bah
Suplente

M.S.P Sergio Pacheco Hernández
Director de la Facultad

Firma
Firma
Firma
Firma
Firma

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Director de Investigación y Posgrado

QUERÉTARO, QRO. CENTRO UNIVERSITARIO
NOVIEMBRE DE 2016

RESUMEN

Los venenos de tarántulas (familia Theraphosidae) están constituidos por mezclas complejas de toxinas que incluyen compuestos de bajo peso molecular, miniproteínas y enzimas con actividad de hialuronidasa. Estas enzimas degradan el ácido hialurónico, un componente importante de la matriz extracelular de varios tejidos, de tal manera que potencian el efecto del veneno al promover la distribución de las toxinas a través de los tejidos de las presas. Los estudios sobre estas enzimas y la búsqueda de nuevas fuentes de estas, se han incrementado debido a su uso potencial como adyuvantes para incrementar la absorción de algunos fármacos. Las tarántulas del género *Poecilotheria*, constituido por especies arborícolas endémicas de la India, destacan porque sus mordeduras generan síntomas atípicos como dolor severo, vómito y calambres musculares en humanos. En el presente trabajo, se determinó la actividad de hialuronidasa de los venenos de doce especies de tarántulas de diferentes géneros, incluyendo cuatro especies del género *Poecilotheria*, y se determinaron algunas propiedades bioquímicas de estas enzimas. Los resultados indicaron que el veneno de *P. ornata* fue el que presentó mayor actividad enzimática (27.56 ± 0.9073 TRU/mg). Mediante análisis de electroforesis y zimografía en una dimensión, se encontró que todos los venenos poseen hialuronidasas con un peso molecular relativo de 38 a 42 kDa. Solamente el veneno de *N. chromatus* presentó además hialuronidasas de ~60 kDa. Se determinaron las condiciones de pH y temperatura óptimas de la actividad de hialuronidasa de los venenos del género *Poecilotheria*, encontrándose un rango de pH óptimo de 3 a 5 y una temperatura óptima variable con rangos de 20 a 70 °C, presentado la actividad más estable el veneno de *P. rufilata*. Además, los resultados obtenidos mediante análisis de electroforesis 2D, zimografía bidimensional y secuenciación parcial por espectrometría de masas demostraron que estos venenos poseen varias isoformas de hialuronidasas con diferentes puntos isoeléctricos (pI), mostrando un rango de pI de 6 a 8. Los hallazgos encontrados en este trabajo demuestran que los venenos de las tarántulas del género *Poecilotheria* representan una fuente potencial de hialuronidasas que podrían aplicarse en diversos campos de la biotecnología y la medicina.

Palabras clave: **tarántula, veneno, *Poecilotheria*, hialuronidasas**

SUMMARY

Tarantula's venoms comprise a complex mixture of toxins that includes low molecular weight compounds, miniproteins and enzymes with hyaluronidase activity. Hyaluronidases degrade hyaluronic acid, an important element of extracellular matrix from diverse tissues, by doing so, these enzymes enhance venom's effect by promoting the distribution of toxins through prey's tissues. Research on regard these enzymes and searching for new sources, has been increasing due to its potential use as coadjuvants to promote absorption of some drugs. Tarantulas from *Poecilotheria* genus, consisting of arboreal species endemic from India, are characterized by their bite atypical symptomatology which includes severe pain, vomiting and muscle cramps in humans. In this work, hyaluronidase activity from the venoms of 12 species of tarantulas from different genera including four *Poecilotheria* species have been determined, as well as, some biochemical properties of such enzymes. Results showed that *P. ornata* presented the highest enzymatic activity (27.56 ± 0.9073 TRU/mg). Through one dimensional electrophoresis and zymography, it was found that all venoms present hyaluronidases with a relative molecular weight of 38 to 42 kDa; solely *N. chromatus* venom presented an extra hyaluronidase of ~60 kDa. Optimal pH and temperature conditions of hyaluronidase activity assay were determined from the venoms of *Poecilotheria* genus, which exhibited an optimal pH range from 3 to 5, and optimal temperature from 20 to 70 °C, being *P. rufilata* venom the one who showed the most stable activity. Additionally, results obtained through 2D electrophoresis, bidimensional zymography and partial sequencing by mass spectrometry demonstrate that these venoms possess different isoforms of hyaluronidase with different isoelectric points, exhibiting a range of isoelectric point from 6 to 8. The results found in this work demonstrate that tarantula's venoms from *Poecilotheria* genera represent a potential source of hyaluronidase that could be applied in diverse fields of biotechnology and medicine.

Keywords: tarantula, venom, *Poecilotheria*, hyaluronidases

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico otorgado para la realización de este trabajo de investigación.

A la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ), por darme la oportunidad de continuar con mis estudios de Posgrado.

A la Maestría en Ciencias Químico Biológicas por permitirme adquirir nuevos conocimientos y desarrollar habilidades del ámbito científico, así como crecer como persona.

Al Dr. José Alejandro García por dirigir este proyecto de tesis, por su apoyo, confianza y consejos brindados.

A todos los compañeros y amigos del Laboratorio de Investigación Química y Farmacológica de Productos Naturales. En especial a Héctor, Luis Fernando, Andrea, Berenice e Iris por todo su apoyo brindado.

A cada uno de mis sinodales, por todas sus valiosas aportaciones a este trabajo.

*Dedicada a la memoria de mi Madre,
a mi Padre por ser mí guía y amigo,
a mi hermana y a Faby por
acompañarme a lo largo de este camino.*

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Investigación Química y Farmacológica de Productos Naturales de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro bajo la dirección del Dr. José Alejandro García Arredondo, con apoyo de una beca completa CONACYT (**número de becario 335525**) y una beca complementaria (No. Becario 24577) otorgada por parte del proyecto de investigación titulado “**CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE LOS VENENOS DE TARÁNTULAS DEL GÉNERO *Poecilotheria***” que tiene financiamiento por parte del Fondo Sectorial de Investigación para la Educación con clave **CONACYT CB-2013-01/223591**.

ÍNDICE GENERAL

TABLA DE CONTENIDO

| | Página |
|--|---------------|
| RESUMEN | |
| SUMMARY | |
| ÍNDICE DE TABLAS..... | iii |
| ÍNDICE DE FIGURAS | iv |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 2. ANTECEDENTES | 3 |
| 2.1 Importancia de los venenosos en el desarrollo de fármacos..... | 3 |
| 2.2 Aspectos generales de las tarántulas (Familia Theraphosidae)..... | 8 |
| 2.3 Composición del veneno de tarántulas | 10 |
| 2.3.1 Compuestos de bajo peso molecular | 11 |
| 2.3.1.1 Iones, ácidos orgánicos y nucleótidos | 11 |
| 2.3.1.2 Aminoácidos, poliaminas y neurotransmisores | 12 |
| 2.3.2 Miniproteínas | 16 |
| 2.3.2.1 Características estructurales | 16 |
| 2.3.2.2 Efectos farmacológicos | 19 |
| 2.3.3 Enzimas | 30 |
| 2.3.3.1 Hialuronidasas | 33 |
| A. Clasificación..... | 38 |
| B. Aplicaciones terapéuticas..... | 40 |
| C. Potencial farmacológico y biotecnológico de hialuronidasas procedentes de artrópodos..... | 44 |
| 2.4 Género <i>Poecilotheria</i> | 46 |
| 3. JUSTIFICACIÓN | 50 |
| 4. HIPÓTESIS..... | 51 |
| 5. OBJETIVOS..... | 52 |
| 5.1 Objetivo general..... | 52 |
| 5.2 Objetivos específicos..... | 52 |
| 6. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 53 |

| | |
|---|-----|
| 6.1 Obtención y mantenimiento de los especímenes | 53 |
| 6.2 Extracción del veneno | 54 |
| 6.3 Cuantificación de proteína | 54 |
| 6.4 Determinación de la actividad de hialuronidasa..... | 54 |
| 6.5 Determinación de las condiciones óptimas para la actividad de hialuronidasa . | 55 |
| 6.6 Electroforesis en gel de poliacrilamida Tricina-SDS-PAGE..... | 55 |
| 6.7 Zimografía en una dimensión..... | 56 |
| 6.8 Electroforesis bidimensional | 57 |
| 6.9 Zimografía en dos dimensiones | 58 |
| 6.10 Purificación y secuenciación parcial de las hialuronidasas | 58 |
| 6.11 Adquisición de imágenes y análisis estadísticos | 60 |
| 7. DISEÑO EXPERIMENTAL..... | 61 |
| 8. RESULTADOS | 62 |
| 8.1 Determinación de la actividad de hialuronidasa..... | 62 |
| 8.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida (Tricina-SDS-PAGE) | 63 |
| 8.3 Zimografía en una dimensión..... | 63 |
| 8.4 Determinación de condiciones óptimas para la actividad de hialuronidasa | 66 |
| 8.5 Electroforesis bidimensional | 69 |
| 8.6 Zimogramas obtenidos por electroforesis bidimensional para la actividad hialuronidasa de los venenos de tarántulas del género <i>Poecilotheria</i> | 69 |
| 8.7 Purificación y secuenciación parcial de hialuronidasas | 74 |
| 9. DISCUSIÓN | 78 |
| 10. CONCLUSIONES | 82 |
| 11. BIBLIOGRAFÍA..... | 83 |
| 12. ANEXOS | 98 |
| 12.1 Valores de la actividad hialuronidasa para el veneno de <i>P. ornata</i> a diferentes valores de pH y temperatura. | 99 |
| 12.2 Valores de la actividad hialuronidasa para el veneno de <i>P. regalis</i> a diferentes valores de pH y temperatura. | 99 |
| 12.3 Valores de la actividad hialuronidasa para el veneno de <i>P. rufilata</i> a diferentes valores de pH y temperatura. | 100 |
| 12.4 Valores de la actividad hialuronidasa para el veneno de <i>P. vittata</i> a diferentes valores de pH y temperatura. | 100 |

ÍNDICE DE TABLAS

| Tablas | | Página |
|--------|--|--------|
| 1 | Fármacos aprobados derivados del estudio de proteínas de venenos de animales. | 6 |
| 2 | Compuestos procedentes de venenos en etapas de estudios clínicos. | 7 |
| 3 | Subtipos de canales de Na _v de vertebrados sobre los que actúan las miniproteínas procedentes del veneno de tarántulas. | 22 |
| 4 | Enzimas descritas en venenos de diferentes familias de arañas. | 32 |
| 5 | Propiedades de hialuronidasas purificadas de venenos de tarántulas. | 36 |
| 6 | Formulaciones de hialuronidasas disponibles en el mercado. | 41 |
| 7 | Dosis de hialuronidasas recomendada para la corrección de relleno de ácido hialurónico. | 43 |
| 8 | Especies de terafósidos del género <i>Poecilotheria</i> . | 46 |
| 9 | Especies de tarántulas estudiadas. | 53 |
| 10 | Resultados de la actividad hialuronidasa. | 62 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| Figura | | Página |
|--------|---|--------|
| 1 | Sección transversal del quelícero de <i>P.nigrocolor</i> . | 9 |
| 2 | Estructura general de las toxinas acilpoliaminas. | 13 |
| 3 | Ejemplos de toxinas acilpoliaminas características en venenos de arañas. | 14 |
| 4 | Motivo ICK del péptido ω -hexatoxina-Hv1a. | 17 |
| 5 | Ejemplos de los tres plegamientos reportados para las toxinas peptídicas de venenos de tarántulas. | 19 |
| 6 | Gráfica del resumen de las actividades biológicas reportadas para 450 toxinas peptídicas de la familia Theraposidae en la base de datos de Arachnoserver. | 20 |
| 7 | Gráfica de los blancos moleculares identificados para las toxinas peptídicas de la familia Theraphosidae. | 21 |
| 8 | Toxinas más potentes encontradas en venenos de tarántula que modulan diferentes blancos moleculares. | 29 |
| 9 | Comparación de las estructuras de dos hialuronidasas de las especies del género <i>Brachypelma</i> con hialuronidasas de otros artrópodos. | 37 |
| 10 | Estructura del hialuronano y sitios donde actúan las diferentes clases de hialuronidasas. | 39 |
| 11 | Principales productos generados por las diferentes clases de hialuronidasas. | 39 |
| 12 | Degradación efectiva de hialuronidasas de rellenos dérmicos basados de ácido hialurónico. | 43 |
| 13 | Imágenes de especies de tarántulas del género <i>Poecilotheria</i> . | 49 |
| 14 | Perfiles electroforéticos en una dimensión de los venenos de tarántulas. | 64 |
| 15 | Zimogramas en una dimensión para la actividad | 65 |

| | | |
|----|--|-------|
| | hialuronidasa de los venenos de tarántulas. | |
| 16 | Gráficas del comportamiento de la actividad hialuronidasa evaluada a diferentes temperaturas (pH 6) para los venenos de tarántulas del género <i>Poecilotheria</i> . | 67 |
| 17 | Gráficas del comportamiento de la actividad hialuronidasa evaluada a diferentes valores de pH (37 °C) para los venenos de tarántulas del género <i>Poecilotheria</i> . | 68 |
| 18 | Perfil de electroforesis bidimensional para los venenos de tarántulas del género <i>Poecilotheria</i> . | 70-71 |
| 19 | Zimogramas 2-D obtenidos para la actividad hialuronidasa para los venenos de tarántulas del género <i>Poecilotheria</i> . | 72-73 |
| 20 | Gel bidimensional bajo condiciones no reductoras de la fracción de concentrado (>30 kDa) resultante del veneno de <i>P. vittata</i> . | 74 |
| 21 | Resultados de la secuenciación parcial de la muestra A de la fracción >30 kDa del veneno de <i>P. ornata</i> . | 76 |
| 22 | Gráficas del comportamiento de la actividad hialuronidasa evaluada a diferentes temperaturas (pH 6) para los venenos de tarántulas del género <i>Poecilotheria</i> . | 77 |

1. INTRODUCCIÓN

Las tarántulas (familia Theraphosidae), también conocidas como terafósidos, son consideradas fuentes potenciales de nuevas entidades moleculares que pueden ser empleadas en el desarrollo de fármacos para el tratamiento de diversas enfermedades (King, 2013), ya que estas especies producen venenos complejos que utilizan para capturar a presas específicas y para defenderse de algunos depredadores. Los venenos de las tarántulas están constituidos principalmente por péptidos y proteínas, además de otros componentes como sales, acilpoliaminas, nucleótidos y aminoácidos (Herzig y King, 2013).

Actualmente se conocen 953 especies de tarántulas alrededor del mundo (Platnick, 2014), muchas de las cuales no han sido estudiadas y no se tiene conocimiento sobre la toxicidad y la composición de sus venenos. Entre sus componentes, los péptidos son los que han recibido mayor atención debido a sus propiedades farmacológicas y su potencial biotecnológico. La mayor parte de los péptidos provenientes de venenos de tarántulas que se han caracterizado estructuralmente, presentan un motivo altamente conservado que consiste en una estructura con tres enlaces disulfuro que forman un nudo inhibidor de cistina (Herzig y King, 2013), denominado motivo ICK por sus siglas en inglés (*inhibidor cystine knot*). El motivo ICK es definido como una lámina β antiparalela estabilizada por un nudo de cistina que confiere estabilidad química, térmica y biológica a las toxinas peptídicas (Herzig y King, 2015). En su mayoría, estos péptidos, denominados como miniproteínas, modulan la actividad de varios tipos de canales iónicos, así como de otros blancos moleculares del sistema nervioso central y periférico (Herzig y King, 2013). Debido a la alta especificidad que presentan algunas de estas toxinas sobre sus blancos moleculares, diversos grupos de investigación están interesados en el desarrollo de fármacos dirigidos al tratamiento de enfermedades neurodegenerativas a partir de estas (King, 2015). Además se ha encontrado que algunas miniproteínas presentan propiedades antiparasitarias, antiarrítmicas, analgésicas y antibacterianas (Oldrati y col., 2013).

Por otro lado, las enzimas son componentes comunes en los venenos de diversas especies que contribuyen de manera especial en el proceso de envenenamiento (Rash y Hodgson, 2002). En los venenos de tarántulas se ha reportado principalmente la presencia de enzimas con actividad de hialuronidasa (Rash y Hodgson, 2002; Sutti y col., 2014; García y col., 2015; Ferreira y col., 2016), considerándose incluso a esta enzima como uno de los principales componentes del veneno (Rash y Hodgson, 2002). Estas enzimas degradan el ácido hialurónico, el principal componente de la matriz extracelular en tejido conectivo suave. Su función principal es potenciar el efecto de las toxinas peptídicas en el organismo afectado al facilitar su distribución en los tejidos (Nagaraju y col., 2007; Ferrer y col., 2013); es por esto que a estas enzimas se les conoce como “factores de difusión”. Considerando sus propiedades, estas enzimas han sido empleadas como adyuvantes para incrementar la absorción y distribución de fármacos que son administrados por vía subcutánea (Bordon y col., 2015). En aplicaciones no aprobadas, se han empleado para reducir el edema en los tejidos (Racz y col., 2008). Además, existen hialuronidasas provenientes de venenos de artrópodos que forman parte de algunos tratamientos que se encuentran en fases clínicas para el tratamiento de la diabetes tipo I y cáncer pancreático (Bordon y col., 2015).

En comparación con los estudios dirigidos al aislamiento y caracterización de toxinas peptídicas de venenos de tarántulas, son muy pocos los estudios enfocados en el aislamiento y caracterización de nuevas hialuronidasas. Este tipo de estudios podría revelar mayor información acerca de la función que tienen estas enzimas en los venenos. Además, es importante para conocer el potencial que tienen las tarántulas como nuevas fuentes de hialuronidasas, mismas que podrían ser empleadas en desarrollo de nuevos medicamentos y otros productos farmacéuticos. Considerando lo anterior, en el presente trabajo se determinó la presencia de hialuronidasas de los venenos de doce especies de tarántulas de diferentes géneros, haciendo un análisis más profundo en las especies del género *Poecilotheria*.

2. ANTECEDENTES

2.1 Importancia del veneno de animales en el desarrollo de fármacos

La industria farmacéutica ha logrado desarrollar alrededor de 1,200 medicamentos en los últimos 60 años, mismos que han jugado un papel importante en el aumento de la esperanza de vida de millones de personas (Munos, 2009). Sin embargo, la industria farmacéutica ha llegado a un estado de crisis debido a la falta de nuevas entidades moleculares y al incremento exponencial en el costo que lleva el proceso de investigación y desarrollo de nuevos medicamentos (Munos, 2009; King, 2011). Esta situación se ve agravada por la disminución dramática en los últimos 25 años de la tasa de aprobación de los compuestos candidatos a fármacos ya que durante las etapas preclínicas y clínicas han sido rechazados (King, 2011). En realidad, las razones de la disminución en la producción de nuevos fármacos son complejas. Un punto que se ha debatido enérgicamente es el aprovechamiento de los productos naturales en el proceso de descubrimiento de nuevos fármacos. A pesar de que aproximadamente el 50 por ciento de todos los fármacos en uso clínico provienen de productos naturales (Paterson y Anderson, 2005; Newman y Cragg, 2007), en la década de los noventa una considerable cantidad de empresas farmacéuticas terminaron prematuramente sus programas de investigación sobre productos naturales (Ortholand y Ganesan, 2004). Actualmente y en contraste a décadas pasadas, el estudio de productos naturales como fuentes de nuevos fármacos se ha reavivado ante la escasez de principios bioactivos como resultado de la atención enfocada en la química combinatoria y en la síntesis orgánica de alto rendimiento (David y col., 2009).

A pesar del desarrollo del Captopril en la década de los setentas, el desarrollo de principios activos procedentes de venenos se mantuvo relativamente escaso hasta los últimos años. Esto se debió en parte a la dificultad en la adquisición de animales venenosos y su manutención en condiciones de laboratorio, a la cantidad minúscula de veneno que ofrecen estas especies y a la falta de técnicas analíticas disponibles para la caracterización de los componentes. Sin embargo, en los

últimos 15 años se ha marcado una tendencia importante en la investigación de venenos de animales como fuente potencial de nuevos compuestos, debido a la creciente aprobación de fármacos derivados de esas fuentes. Además, los recientes avances tecnológicos facilitan el rastreo farmacológico y la caracterización funcional y estructural de sus componentes; lo cual ha acelerado enormemente el desarrollo de fármacos, dejando así de lado algunos problemas del pasado (King, 2011).

Un veneno se define como una secreción producida en una glándula especializada que a través de la aflicción de una herida es inyectado a otro animal (a través de ciertos mecanismos como arpones, aguijones o colmillos), y que contiene moléculas que interrumpen procesos fisiológicos o bioquímicos normales en la víctima a fin de facilitar la alimentación o la defensa por parte del animal que lo produce (Nelsen y col., 2014). Los animales venenosos se encuentran ampliamente distribuidos en el planeta habitando una gran variedad de ecosistemas terrestres y acuáticos. Estos poseen una historia evolutiva desde hace cientos de millones de años reflejándose en la composición de su veneno, mismo que emplean como mecanismo para dañar, inmovilizar o matar a sus presas, depredadores o adversarios. Los animales venenosos se encuentran distribuidos en varios phyla del reino animal, entre los que se incluyen: Arthropoda (arañas, escorpiones, ácaros, insectos, hormigas, avispas, abejas); Cnidaria (anémonas de mar, corales de fuego y medusas); Mollusca (caracoles marinos, pulpos, calamares); Annelida (sanguijuelas); Echinodermata (erizos y estrellas de mar) y Chordata (peces, reptiles y mamíferos), entre otros (Takacs y Nathan, 2014).

En cuanto a composición se refiere, los venenos consisten en mezclas complejas de proteínas, péptidos y compuestos orgánicos e inorgánicos de bajo peso molecular que actúan sinérgicamente. Estos componentes actúan selectivamente sobre una gran variedad de blancos moleculares como canales iónicos o receptores membranales involucrados en procesos fisiológicos vitales, por lo cual son considerados como herramientas útiles para el desarrollo de nuevos fármacos. Los compuestos proteicos pueden actuar como enzimas o tener otras funciones, entre ellas, la de actuar como neurotoxinas, siendo estas responsables

de la mayoría de las actividades farmacológicas del veneno (Takacs y Nathan, 2014).

Alrededor de 7 medicamentos aprobados han sido derivados del estudio de compuestos proteicos procedentes de animales venenosos (Tabla 1). Además, hay un número importante de compuestos prometedores que se encuentran en evaluaciones de etapas preclínicas y clínicas (Tabla 2). En contraste con los fármacos aprobados actualmente, estos compuestos van dirigidos a una gama más amplia de condiciones fisiopatológicas, incluyendo dolor crónico, enfermedades autoinmunes, curación de heridas, VIH y cáncer (King, 2011). Entre los compuestos más prometedores se encuentra el cenderitida (CD-NP) procedente de la mamba verde oriental (*Dendroaspis angusticeps*), para el tratamiento del fallo cardiaco congestivo; el compuesto ShK-186 de la anémona (*Stichodactyla helianthus*), para el tratamiento de varias enfermedades autoinmunes y el compuesto desmoteplasa del murciélago común (*Desmodus rotundus*), para el tratamiento del accidente cerebrovascular isquémico agudo (Takacs y Nathan, 2014).

Durante el año 2013, más de 10 millones de personas a nivel mundial fueron tratados con fármacos derivados de toxinas. En el ámbito económico, las ventas globales para el medicamento PRIALT[®] se estimaron en 27 millones de dólares, para BYETTA[®]/BYDUREON[®] en 698 millones de dólares, mientras que los inhibidores de la ECA (enzima convertidora de la angiotensina) fueron la cuarta clase de medicamentos con mayor prescripción en Estados Unidos durante el año 2009 (Takacs y Nathan, 2014).

Por otra parte, algunas toxinas procedentes de diferentes venenos de serpientes son empleadas para alrededor de 15 pruebas de diagnóstico en laboratorios clínicos de hemostasis y una prueba de miastenia gravis (Marsh y Williams, 2005).

Tabla 1. Fármacos aprobados derivados del estudio de proteínas de venenos de animales (tomado de King, 2011).

| Nombre del fármaco | Especie de origen | Mecanismo de acción | Indicación terapéutica | Vía de administración | Aprobación por la FDA |
|----------------------------|--|--|--|-----------------------------------|-----------------------|
| Captopril (CAPOTEN®) | <i>Bothrops jararaca</i> (serpiente) | Inhibidor de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA) | <ul style="list-style-type: none"> • Hipertensión • Fallo cardíaco | Oral | 1981 |
| Eptifibatida (INTEGRILIN®) | <i>Sistrurus miliarius</i> (serpiente) | Impide la unión del fibrinógeno, el factor von Willebrand y otros ligandos de adherencia al receptor GP IIb/IIIa | <ul style="list-style-type: none"> • Síndrome agudo coronario • Intervención coronaria percutánea | Parenteral (infusión intravenosa) | 1998 |
| Tirofiban (AGGRASTAT®) | <i>Echis carinatus</i> (serpiente) | Inhibidor del receptor del fibrinógeno GP IIb/IIIa | <ul style="list-style-type: none"> • Síndrome agudo coronario | Parenteral (infusión intravenosa) | 1999 |
| Bivalirudina (ANGIOMAX®) | <i>Hirudo medicinalis</i> (sanguijuela medicinal europea) | Inhibidor reversible de la trombina | <ul style="list-style-type: none"> • Anticoagulante en la intervención coronaria percutánea | Parenteral (infusión intravenosa) | 2000 |
| Ziconotide (PRIALT®) | <i>Conus magus</i> (caracol marino) | Antagonista del canal Ca _v 2.2 | <ul style="list-style-type: none"> • Administrado para el dolor crónico severo | Intratecal | 2004 |
| Exenatide (BYETTA®) | <i>Heloderma suspectum</i> (monstruo de gila) | Agonista del receptor del péptido similar al glucagón tipo 1 | <ul style="list-style-type: none"> • Diabetes mellitus tipo 2 | Parenteral (inyección subcutánea) | 2005 |
| Batroxobina (DEFIBRASE®) | <i>Bothrops atrox</i> ó <i>Bothrops moojeni</i> (serpientes) | Se une a la cadena α del fibrinógeno | <ul style="list-style-type: none"> • Infarto cerebral agudo • Angina pectoris inespecífica • Sordera súbita | Parenteral (infusión intravenosa) | Fuera de E.U. |

Nota: Los fármacos se colocan de acuerdo al año de aprobación por la FDA.

La Batroxibina es empleada clínicamente fuera de los E.U. (principalmente en China) para el tratamiento de desórdenes trombóticos como derrame cerebral, embolia pulmonar, trombosis venosa profunda, infarto de miocardio y hemorragia perioperatoria.

Tabla 2. Compuestos procedentes de venenos en etapas de estudios clínicos (tomado de King, 2011).

| Compuesto | Especie de origen | Blanco molecular | Indicación terapéutica | Vía de administración | Fase clínica | Referencia |
|-----------------------------------|---------------------------------|--|-------------------------------|------------------------------------|--------------|--|
| Xen2174 | Caracol marino | Transportador de norepinefrina | Dolor postoperatorio | Intratecal | II | Brust y col., 2009. |
| BAT86-7548 (Bombesina) | Sapo de vientre de fuego | Receptor del péptido liberador de gastrina | Cáncer de próstata | Parenteral (inyección intravenosa) | I | Hong y col., 2010. |
| CNSB004 (Leconotide) | Caracol marino | Canal Cav2.2 | Dolor neuropático | Parenteral (inyección intravenosa) | I | Kolosov y col., 2010. |
| ShK-192 | Anémona de mar | Canal Kv 1.3 | Enfermedad autoinmune | Parenteral | I (2012) | Pennington y col., 2009. |
| Tumor Paint (clorotoxina) | Escorpión acosador de la muerte | Anexina A2 | Marcador tumoral para cirugía | Parenteral (infusión intravenosa) | I | Veiseh y col., 2007; Kesavan y col., 2010. |
| Cenderitida (CD-NP) | Mamba verde del este | Receptor del péptido natriurético | Falla cardíaca congestiva | Parenteral (infusión intravenosa) | II | Lee y col., 2009. |
| RPI-MN (α -cobrattoxina) | Cobra | nAChR | VIH | Parenteral (inyección subcutánea) | I | Reid y Raymond, 2010. |
| RPI-78M (α -cobrattoxina) | Cobra | nAChR | Esclerosis múltiple | Oral | I | Reid, 2007. |
| Agkistrodon (agkisacutacina) | Víbora de nariz afilada | Fibrinógeno | Sangrado perioperatorio | Parenteral (infusión intravenosa) | III | Wei y col., 2010. |
| Desmoteplasa (rDSPA α 1) | Murciélagos común | Plasminógeno | Infarto agudo isquémico | Parenteral (infusión intravenosa) | III | Medcalf, 2012. |

Nota: Compuestos ordenados en orden creciente de acuerdo a su masa molecular.

2.2 Aspectos generales de las tarántulas (Familia Theraphosidae)

Las arañas, orden Aranae, son artrópodos venenosos en creciente investigación. Este grupo cuenta con alrededor de 46,000 especies distribuidas en 3988 géneros y 114 familias (Platnick, 2014). La familia Theraphosidae es un grupo de arañas que destacan por su gran tamaño y son comúnmente conocidas como tarántulas o terafósidos. Esta familia incluye 953 especies distribuidas en 126 géneros (Platnick, 2014). Las tarántulas habitan prácticamente en todos los continentes, exceptuando la Antártida, pero son más abundantes en zonas con clima tropical y subtropical (Escoubas y Rash, 2004).

A pesar de su temible reputación, provocada por su gran tamaño, hasta el momento no se ha documentado algún caso de fatalidad en humanos causada por mordeduras de tarántulas. Algunas especies pueden alcanzar dimensiones de 10 hasta 30 cm de longitud, como es el caso de *Theraphosa blondi* que es la araña más grande que se conoce hasta el momento (Herzig y King, 2013). Estudios realizados en Brasil y Australia han demostrado que las mordeduras de tarántulas en humanos inducen síntomas localizados leves como dolor, sangrado en el sitio de la mordedura y en raros casos pueden provocar efectos sistémicos como náusea y vómito (Lucas y col., 1994; Isbister y col., 2003). Solamente algunas tarántulas australianas exhiben efectos letales en caninos (Isbister y col., 2003). Algunas excepciones están representadas por algunas especies de origen africano y asiático, en particular las especies del género *Poecilotheria*, que son tarántulas endémicas de la India y Sri Lanka de las que se ha reportado que pueden inducir efectos sistémicos de mayor severidad en humanos (Ahmed y col., 2009; Fuchs y col., 2014). Más adelante, se describen a detalle los efectos inducidos por las mordeduras de tarántulas del género *Poecilotheria* en humanos.

El sistema productor del veneno en las tarántulas consiste en un par de glándulas venenosas que se encuentran en el segmento basal de los quelíceros y están conectadas al extremo de los colmillos mediante un fino conducto. Estas glándulas están rodeadas por músculo estriado y están separadas del epitelio

secretor por una capa de tejido conectivo circundante. Esta capa permite que la glándula se dilate durante la síntesis de veneno y se comprima durante la expulsión del mismo. Morfológicamente las glándulas son descritas como una estructura cilíndrica alargada bien formada (Figura 1). Su cuerpo consta de una región anterior (cabeza), con un conducto de veneno en el extremo; la longitud y el diámetro varían en función de la especie (Rocha-e-silva y col., 2009).

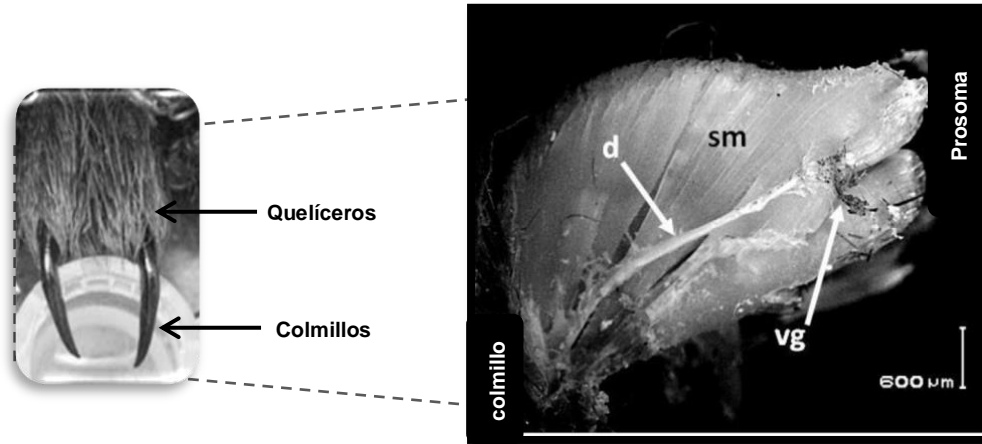


Figura 1. Aspecto externo y sección transversal del quelícero de *P. nigrocolor*. vg: glándula del veneno, sm: músculo estriado, d: conducto (tomado de Estrada y col., 2013).

La dieta de las tarántulas es variada y consiste principalmente en invertebrados como insectos, además de pequeños vertebrados como anfibios, reptiles, aves y mamíferos (Herzig y King, 2013). A diferencia de las arañas comunes, las tarántulas no emplean la seda para la captura de sus presas sino para la construcción de sus madrigueras que establecen principalmente en el suelo, algunas especies son arborícolas y construyen sus madrigueras en lo alto. La estrategia de caza de las tarántulas es esperar a la presa en la entrada de su madriguera para que en el momento en que esta se acerque la capturan rápidamente con sus colmillos, inmovilizándola mediante la inyección del veneno (Escoubas y Rash, 2004). Además, las tarántulas también utilizan su veneno para ahuyentar a algunos depredadores mediante la inducción de dolor (Herzig y King, 2013). Esto explica que los venenos de tarántulas contienen toxinas

activas contra un amplio rango de especies de vertebrados e invertebrados. La amplia variedad de toxinas que puede encontrarse en el veneno de cada especie, aunada a la selectividad que presentan algunas toxinas sobre blancos moleculares específicos, ha hecho que estos venenos sean considerados como fuentes valiosas de prototipos para el desarrollo de nuevos fármacos, y herramientas farmacológicas y biotecnológicas (Escoubas y Rash, 2004; Saez y col., 2010; Herzig y King, 2013). Además de la riqueza de compuestos que presentan estos venenos, las investigaciones farmacológicas con venenos de tarántulas se favorece debido a que su gran tamaño permite obtener buenos rendimientos de veneno sin necesidad de sacrificar al animal como se hace con otros artrópodos (Herzig y King, 2013).

2.3 Composición del veneno de tarántulas

Las tarántulas utilizan sus venenos principalmente con fines ofensivos. Es decir, utilizan sus venenos para capturar a sus presas y alimentarse. De tal modo que no es de sorprenderse que gran parte de los componentes de sus venenos actúen sinérgicamente para producir parálisis inmediata en la presa (Fry y col., 2009). Muchos de estos componentes actúan sobre proteínas membranales de neuronas y células musculares para producir el bloqueo de la generación y propagación del potencial de acción (King y Hardy, 2013; Pineda y col., 2014). Además, las tarántulas también utilizan sus venenos con propósitos defensivos, por lo que también presentan componentes necesarios para ahuyentar a algunos depredadores. Por ejemplo, algunas toxinas peptídicas de tarántulas actúan como agonistas de los receptores de potencial transitorio vaniloide tipo 1 (TRPV1), que son canales que generan estímulos de dolor ardiente en vertebrados (Herzig y King, 2013). Es por esto que estos venenos están constituidos por mezclas extremadamente complejas, que incluyen una gran variedad de compuestos orgánicos e inorgánicos de bajo peso molecular, péptidos y proteínas (Kuhn-Nentwig y col., 2011).

En general, los péptidos son los componentes principales para la gran mayoría de los venenos tarántulas; algunas especies contienen más de 1000

péptidos únicos con un rango de masa de 2 a 8 kDa (Escoubas y Rash, 2004; King y Hardy, 2013). Esto se aplica también para el resto de las arañas; por ejemplo, un aproximado de 1,000 péptidos de venenos de arañas han sido descrito para 86 especies, el cual representa aproximadamente el 0.01% de 10 millones de péptidos nuevos estimados para el total de especies de arañas reportadas (Herzig y col., 2011). Menos de la mitad de los péptidos de venenos de araña reportados han sido funcionalmente caracterizados. Sin embargo, los blancos moleculares conocidos que son afectados por toxinas de arañas, son de gran relevancia para el campo farmacológico. La mayoría de los péptidos caracterizados poseen alta afinidad por una diana molecular en particular y son a menudo selectivos para algún subtipo de receptor, por lo que esta selectividad, diversidad funcional y estabilidad biológica hace que los péptidos sean atractivos compuestos para el desarrollo de fármacos (Saez y col., 2010).

2.3.1 Compuestos de bajo peso molecular

2.3.1.1 Iones, ácidos orgánicos y nucleótidos

Haciendo referencia a este primer grupo de compuestos, un veneno de araña tiene una concentración específica de iones y se ha reportado que, en comparación con la hemolinfa, los venenos de tarántula contienen concentraciones elevadas de iones K^+ y concentraciones bajas de Na^+ . Por ejemplo, el veneno de *Eurypelma californicum* contiene 9.4 mM de Na^+ , 70.4 mM de K^+ , 2.9 mM de Ca^{+2} y 11.2 mM de Mg^{+2} (Savel-Niemman, 1989). A esta concentración, el potasio es capaz de inducir una despolarización de fibras axonales alrededor del sitio de inyección del veneno lo que se traduce en provocar la parálisis de una presa, por lo que el potasio ejercería un efecto sinérgico con las neurotoxinas (Kuhn-Nentwig y col., 2011).

El ácido cítrico también ha sido encontrado en venenos de tarántulas. Existen cuatro posibles razones de su presencia: 1) por sí sólo, es eficaz para prevenir el crecimiento de bacterias a las concentraciones que se produce en diferentes venenos de arañas (16-147 mM); 2) se puede asumir que sirve como un promotor para hacer cumplir el efecto de otros antimicrobianos o de otras

sustancias; 3) como un agente quelante puede inhibir parcialmente la acción de algunas enzimas como metaloproteasas dependientes de zinc y de calcio, y de fosfolipasas A2. Después de la inyección del veneno en la presa, las concentraciones de ácido cítrico se diluyen y las enzimas podrían activarse y 4) el citrato podría servir como un contraión de los péptidos citolíticos altamente catiónicos y de acilpoliaminas; además, podría ser responsable de que el valor de pH en los venenos de arañas sea entre 5.3 y 6.1 (Kuhn-Nentwing y col., 2011).

También se han identificado la presencia de nucleótidos tales como ATP, ADP y AMP en venenos de tarántulas. Por ejemplo, en *E. californicum*, *Dugesiella* sp. y *Aphonopelma* sp. (Schanbacher y col., 1973; Chan y col., 1975; Odell y col., 1989; Savel-Niemann, 1989; Weisel-Eichler y Libersat, 2004). En un estudio elaborado por Horta y col. (2013) sobre el veneno de una tarántula brasileña *Lasidiora* sp., se evaluó su efecto sobre el tono vascular. En ese estudio se encontró que el veneno produce un efecto vasorrelajante sobre segmentos aislados de aorta de rata de una manera dependiente de endotelio. Ese efecto se debía a un aumento en la actividad de la enzima eNOS (óxido nítrico sintetasa endotelial) por la fosforilación del residuo de Ser¹¹⁷⁷, un sitio de activación bien conocido de la enzima. Mediante una estrategia biodirigida, se purificó el principal componente responsable de la actividad vasorrelajante, el ADP. Tanto el efecto del veneno, como el del ADP, fueron significativamente inhibidos por suramina; un antagonista del receptor P2 purinérgico (Burnstock, 2002; Buvinic y col., 2002; Burnstock, 2007; Hess y col., 2009).

2.3.1.2 Aminoácidos, poliaminas y neurotransmisores

Dentro de este segundo grupo, las acilpoliaminas son una clase de compuestos orgánicos neuroactivos de bajo peso molecular presentes en venenos de varias familias de arañas, incluyendo a la familia Theraphosidae. Estos compuestos presentan un rango de peso molecular de 300 a 1,000 Da e inhiben la actividad principalmente de receptores ionotrópicos de glutamato y de acetilcolina lo que conduce a un bloqueo neuromuscular observado como una

parálisis rápida tanto en vertebrados e invertebrados (Kuhn-Nentwig y col., 2011). En cuanto a su estructura, las acilpoliaminas, poseen generalmente, un grupo acilo aromático (indólico o fenólico) terminal en un extremo conectado a cadena de poliamina, ya sea por la presencia de un aminoácido o no (Figura 2). La cadena de poliamina se caracteriza por poseer cargas positivas sobre los grupos aminos libres y secundarios, lo cual explica su actividad bloqueadora de canales iónicos selectivos a cationes. En general, estas toxinas son activas sobre canales catiónicos de K^+ , Ca^{+2} y en canales ionotrópicos de glutamato y de acetilcolina. Las acilpoliaminas se clasifican en dos grupos, las que contienen un aminoácido enlazante y las que carecen de éste, como se mencionó anteriormente (ver ejemplos en la Figura 3), pero ambas tienen efecto similar sobre los receptores de glutamato. En tarántulas, la presencia de acilpoliaminas sin la presencia del aminoácido enlazante ha sido reportada (Kuhn-Nentwig y col., 2011).

En insectos, la actividad biológica de las acilpoliaminas es caracterizada por provocar una parálisis reversible por el bloqueo, dependiente de la concentración, de canales ionotrópicos de glutamato post-sinápticos. El sitio de interacción de estos componentes se encuentra localizado en el poro del receptor ionotrópico cuando es accesible por la activación del ligando. Únicamente en presencia de la actividad sináptica, las acilpoliaminas interactúan con el receptor ya mencionado. Por lo que la presencia del ácido glutámico (aminoácido) también reportada en venenos de tarántulas se considera una estrategia durante el proceso del envenenamiento para la activación de los receptores mencionados lo que explica la eficacia de este tipo de venenos (Kuhn-Nentwig y col., 2011).

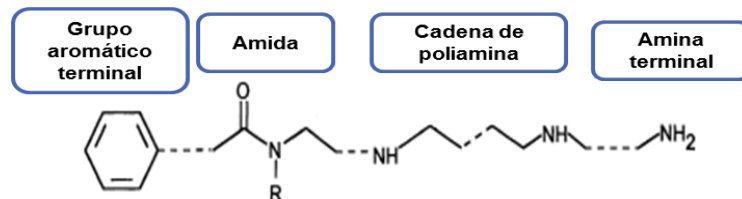
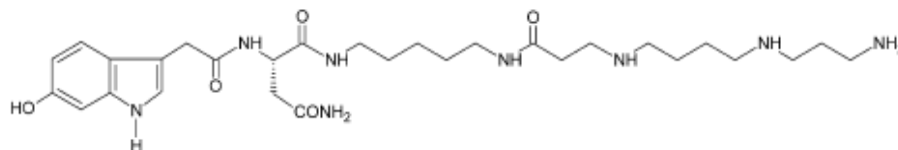
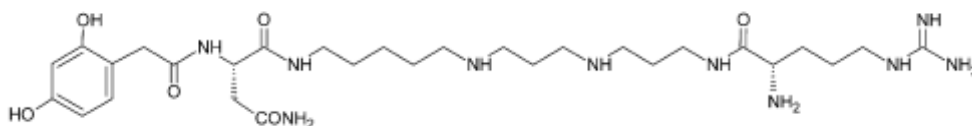


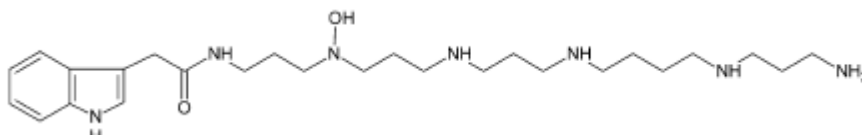
Figura 2. Estructura general de las toxinas acilpoliaminas (Usherwood y Blagbrough, 1991).



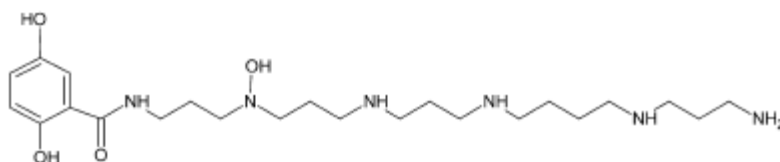
NPTX-1. Acilpoliamina que contiene un aminoácido enlazante exhibiendo un grupo indólico terminal (Toki y col. 1988).



Argiopina. Acilpoliamina que contiene un aminoácido enlazante, exhibiendo un grupo fenólico terminal conectado vía asparagina a la cadena de poliamina (Grishin y col., 1998).



AGEL 489. Acilpoliamina sin un aminoácido enlazante con un grupo indólico terminal conectado a la cadena de poliamina (Jasys y col., 1990).



AGEL 468. Acilpoliamina sin un aminoácido enlazante con un grupo fenólico terminal conectado a la cadena de poliamina (Jasys y col., 1990).

Figura 3. Ejemplos de toxinas acilpoliaminas características en venenos de arañas (estructuras tomadas de Kuhn-Nentwig y col., 2011).

En un estudio del 2013, se purificó una acilpoliamina de 728 Da nombrada VdTX-1, presente en el veneno de la tarántula *Vitalius dubius*. Esta toxina mostró una actividad antogonista no competitiva sobre receptores nicotínicos de acetilcolina en preparaciones músculo-nervio *biventer cervicis* de pollo (Rocha-e-Silva y col., 2013). En un estudio reciente realizado por Sutti y col., en el 2015, se encontró que esta misma toxina presenta actividad antimicrobiana contra 12 especies de microorganismos, inhibiendo su crecimiento e inclusive presentando un efecto más rápido que la estreptomycin. Además, presenta selectividad, ya que no mostró citotoxicidad contra células sanguíneas de linaje mamífero. Por otra parte, las acilpoliaminas también pueden inhibir a los receptores TRPV1, mismos que están involucrados en la nocicepción y en la detección de temperatura en vertebrados; como se observó con acilpoliminas aisladas del veneno de la araña *Agelenopsis aperta* (Kitaguchi y Swartz, 2005).

La presencia de aminas biógenas como la histamina, serotonina, octopamina y acetilcolina se ha reportado en venenos de tarántulas (Kuhn-Nentwig y col., 2011). La histamina es un neurotransmisor y neuromodulador que en artrópodos actúa como neurotransmisor de fotoreceptores y mecanoreceptores (Nässel, 1999 y Buchner y col., 1993). La importancia de la histamina en los venenos de arañas se centra en tres principales aspectos: 1) en la generación de dolor para la defensa ante depredadores vertebrados; 2) propiciar un aumento el flujo sanguíneo local y la permeabilidad celular, facilitando la difusión del veneno en el tejido de la presa y 3) como modulador después del envenenamiento en insectos. Es decir, que la histamina actúe como un potenciador sinérgico de otras toxinas presentes en los venenos como ya se ha demostrado (Kuhn-Nentwig y col., 1994; Wullschleger y col., 2005). La octopamina ha sido identificada en muchos artrópodos y se considera una hormona de “lucha o huida” en insectos; que desempeña un papel importante en la modulación de músculos involucrados en el vuelo, por lo que su presencia en venenos podría afectar la actividad muscular en insectos. Al igual que la histamina, la serotonina puede estar involucrada en la defensa de las tarántulas mediante la generación de dolor (Herzig y King, 2013). La acetilcolina, es el principal neurotransmisor

excitatorio de receptores quimio y mecano sensoriales en el sistema nervioso de insectos. La presencia de este neurotransmisor en venenos de tarántulas se cree que puede afectar al sistema nervioso de los insectos (Kuhn-Nentwig y col., 2011).

2.3.2 Miniproteínas

2.3.2.1 Características estructurales

Las miniproteínas son péptidos neurotóxicos ricos en enlaces disulfuro que comprenden un rango de peso entre 2 a 8 kDa (27-65 residuos de aminoácidos) y son los componentes más estudiados de los venenos de tarántulas (Escoubas y col., 2006). Estos péptidos han evolucionado a través de un proceso de duplicación genético, de modo que cada especie de tarántula produce múltiples isoformas de cada péptido, algunas de las cuales, únicamente difieren en un sólo residuo de aminoácido (Sollod y col., 2005).

Debido a la riqueza de cisteínas (6-14), las miniproteínas adoptan motivos estructurales de enlaces disulfuro en las cadenas polipeptídicas. En este sentido, el pliegue más común que presentan estos componentes es un nudo de tres enlaces disulfuro conocido como motivo proteínico ICK (por sus siglas en inglés *inhibitor cystine knot*), el cual confiere a las miniproteínas estabilidad química, térmica y biológica (Herzig y King, 2013). El motivo ICK es definido como una lámina β antiparalela estabilizada por un nudo de cistinas. La lámina β comprende típicamente dos hebras, aunque en algunas ocasiones una tercera hebra N-terminal puede estar presente (Figura 4A). El nudo de cistinas (*cystine knot*) comprende un anillo formado por dos enlaces disulfuro (Cys1–Cys4 y Cys2–Cys5) y un tercer enlace disulfuro (Cys3–Cys6) en las secciones intermedias de la cadena peptídica principal que cruza el anillo para formar un pseudo-nudo (Figura 4B). Los dos puentes disulfuro centrales que emanan de las hebras están estrechamente empaquetados uno contra el otro y forman el núcleo hidrofóbico compacto en los péptidos (Norton y Pallaghy, 1998). En un estudio reciente, se demostró que el motivo ICK presente en el péptido insecticida ω -hexatoxina-Hv1a (Hv1a) es notablemente resistente a la

degradación química. Este péptido es estable en el intervalo de pH 1-8, a temperaturas de hasta 75 °C y cuando se disuelve en una gama de disolventes orgánicos. Por otra parte, se encontró que esta toxina es altamente resistente a la degradación proteolítica, con una excelente estabilidad en la hemolinfa de insectos y de plasma humano, y bajo la acción de la proteinasa K. Estos altos niveles de resistencia química y proteolítica fueron completamente suprimidos cuando el motivo ICK de la toxina fue destruido por reducción y la alquilación de los seis residuos de cisteína. (Herzig y King, 2015).

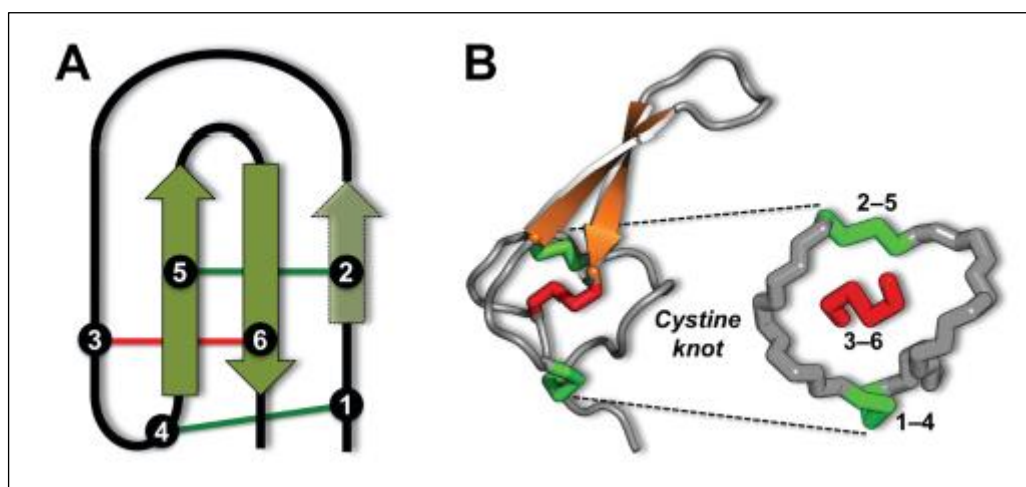


Figura 4. Motivo ICK del péptido ω -hexatoxina-Hv1a. **A.** Esquema del motivo ICK, el cual comprende una lámina β -antiparalela estabilizada por un nudo de cistinas. Las hebras β están mostradas en verde y los seis residuos de cisteínas que forman el nudo están etiquetados. En toxinas de tarántulas, la lámina β típicamente comprende dos hebras β alojando a las Cys5 y Cys6, aunque una tercera hebra N-terminal abarcando a la Cys2 se encuentra algunas veces presente. Los dos enlaces disulfuro externos se muestran en verde y el enlace disulfuro interno en rojo. **B.** Esquema de estructura tridimensional de la toxina destacando el motivo ICK. El nudo de cistina comprende un anillo formado por dos enlaces disulfuro (Cys1–Cys4 y Cys2–Cys5, señalados en verde) y las secciones intermedias de cadena principal del polipéptido (en gris), con un tercer disulfuro (Cys3–Cys6, en rojo) que perfora el anillo para crear un pseudo -nudo. El núcleo hidrófobo de la toxina se compone principalmente de los dos puentes disulfuro centrales conectados a las hebras β (tomado de Herzig y King, 2015).

El motivo proteico “*Kunitz motif*”, es otro arreglo poco descrito en toxinas de tarántulas, el cual se caracteriza por una hélice N-terminal corta 3_{10} , una α -hélice C-terminal y una β -estructura antiparalela de tres cadenas con el siguiente arreglo de puentes disulfuro $C^1-C^6, C^2-C^4, C^3-C^5$ (Figura 5B). Este motivo ha sido descrito en pocas miniproteínas del veneno de tarántulas, por ejemplo, en la κ -theraphotoxina-Hh1a del veneno de *H. schmidtii*, la cual posee actividad bloqueadora de un canal de potasio y como inhibidor de proteasa (Peng y col., 2002). Además, este motivo proteico se ha encontrado presente en una considerable diversidad de péptidos y proteínas tales como en inhibidores de tripsina pancreática, neurotoxinas de serpientes, garrapatas, caracoles del género *Conus* y anémonas de mar. Otro motivo proteínico presente se denomina “disulphide-directed β -hairpin” (DDH), que es considerado un motivo ancestral y se caracteriza por ser una horquilla- β estabilizada por dos enlaces disulfuro obligatorios. La disposición de enlaces disulfuro se da como $C^1-C^3, C^2-C^5, C^4-C^6$ (Figura 5C). Un ejemplo de este arreglo lo presenta la toxina U1-theraphotoxina-Hh1a procedente del veneno de *Haplopelma schmidtii* (Shu y col., 2002). En la Figura 5 se muestran los tres plegamientos reportados para las toxinas de tarántulas. A) κ -TRTXGr3a de *Grammostola rosea*, que contiene el motivo proteínico ICK; (B) κ -TRTX-Hh1a de *Haplopelma schmidtii*, tiene un plegamiento de tipo Kunitz y (C) U₁-TRTX-Hh1a también de *Haplopelma schmidtii*, presenta un pliegue tipo DDH.

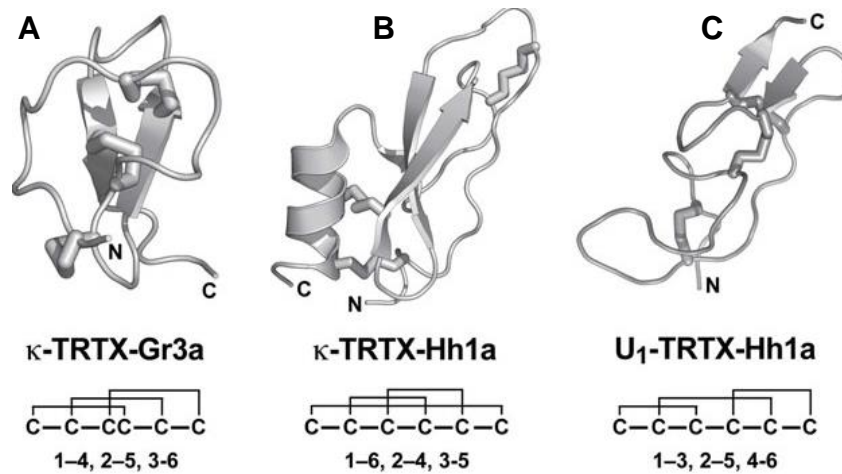


Figura 5. Ejemplos de los tres plegamientos reportados para las toxinas peptídicas de venenos de tarántulas. (A) κ -TRTXGr3a, (B) κ -TRTX-Hh1 y (C) U₁-TRTX-Hh1a. El nitrógeno (N) y el carbono (C) terminal están etiquetados en cada estructura, y los enlaces disulfuro se muestran como tubos gruesos. Las conectividades de los enlaces disulfuro se muestran debajo de cada estructura (imagen tomada de Herzig y King, 2013).

2.3.2.2 Efectos farmacológicos

En cuanto a la actividad farmacológica de las miniproteínas, se ha encontrado que la mayoría de estas actúa sobre canales iónicos a nivel del sistema nervioso. En la Figura 6 se muestra una gráfica que resume las actividades biológicas de las miniproteínas aisladas de tarántulas de acuerdo a la base de datos de ArachnoServer (Herzig y col., 2011). En esta se observa claramente que la mayoría de las miniproteínas identificadas poseen actividad neurotóxica, mismas que actúan principalmente sobre canales dependientes de voltaje. Muchos de estos péptidos son selectivamente insecticidas o modulan la actividad de varias dianas moleculares de vertebrados, incluyendo de seres humanos. En particular, como ha sucedido con varias toxinas de varias familias de arañas, las toxinas selectivas a insectos han sido patentadas para su posible uso como agentes bioinsecticidas para el control de plagas de insectos fitófagos o vectores de nuevas y reemergentes enfermedades (Windley y col., 2012). Algunas neurotoxinas han sido empleadas como herramientas moleculares para la identificación y caracterización de subtipos de canales iónicos. Otras, incluso ya han sido patentadas como agentes antiarrítmicos y analgésicos (Herzig y

King, 2013). En la Figura 7, se indican los blancos moleculares descritos para miniproteínas registradas en la base de datos de Arachnoserver. Además de sus acciones neurotóxicas bien conocidas, las toxinas peptídicas de tarántulas se han identificado con una extensa gama de otras actividades biológicas interesantes que incluyen propiedades antimicrobianas, antiparasitarias, inhibidores de proteasas, entre otras (Herzig y King, 2013).

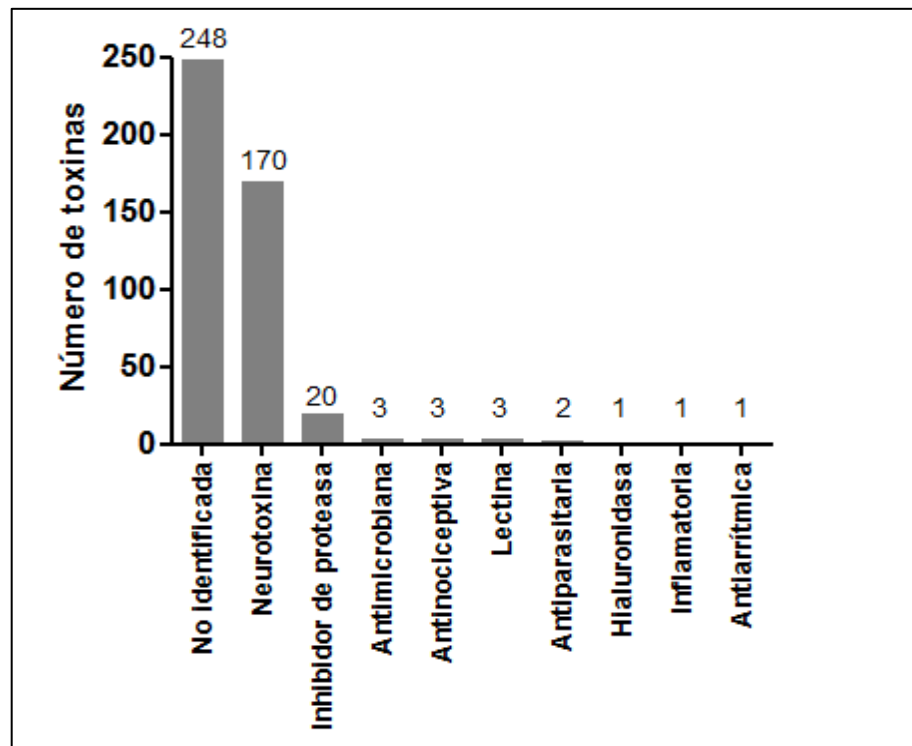


Figura 6. Gráfica del resumen de las actividades biológicas reportadas para 450 toxinas peptídicas de la familia Theraposidae. Datos tomados de la base de ArachnoServer (Herzig y col., 2011).

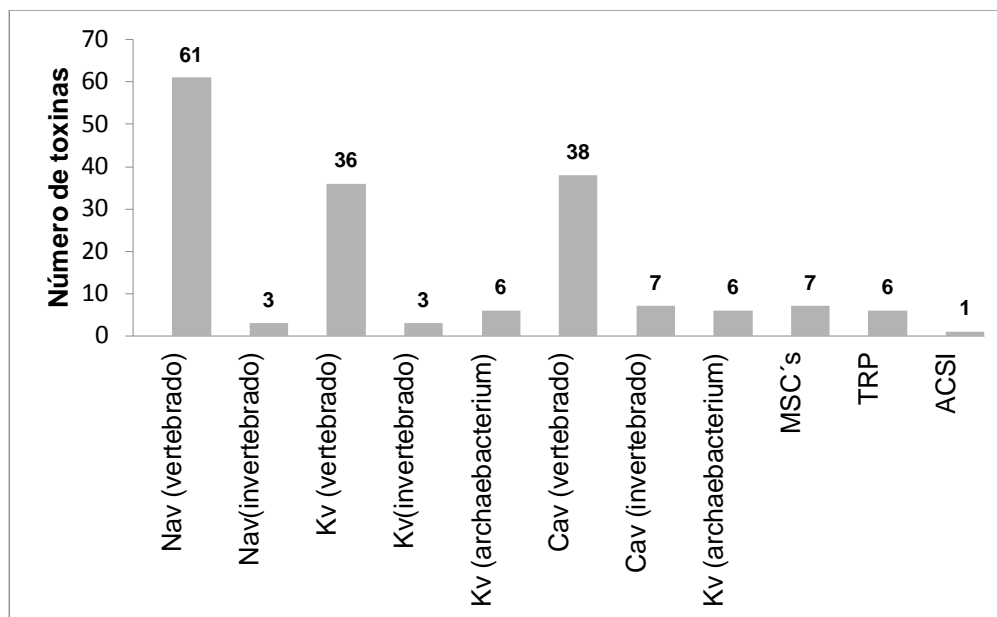


Figura 7. Gráfica de los blancos moleculares identificados para las toxinas peptídicas de la familia Theraphosidae de la base de datos de Arachnoserver (Herzig y col., 2011).

Los canales de sodio dependientes de voltaje (Na_V) son esenciales para la despolarización del nervio y músculo. Estos canales dan inicio a los potenciales de acción y son esenciales para su propagación. Esto hace que este tipo de canales sean el primer blanco molecular para las neurotoxinas que inducen parálisis (Nentwig y Kuhn-Nentwig, 2013). Todas las toxinas aisladas de venenos de arañas que actúan en sobre este tipo de canales son modificadores alostéricos que impiden que el poro del canal se ocluya, lo que conduce a un cambio conformacional alterando el equilibrio entre los estados abierto, cerrado e inactivado del canal (Klint y col., 2014). Estas toxinas pueden inducir síntomas excitatorios en su presa que, en última instancia, conducen a la parálisis. En insectos, únicamente un solo subtipo de canales Na_V ha sido descrito; dada su importancia, este canal se convierte en un excelente blanco molecular para las toxinas de las tarántulas que buscan incapacitar a sus presas (King y col., 2008). En contraste, en mamíferos hay una gran diversidad de canales Na_V , a la fecha se han descrito nueve subtipos $Na_V1.1$ - $Na_V1.9$ y se clasifican de acuerdo a su sensibilidad a la tetrodotoxina. Los canales sensibles a la tetrodotoxina $Na_V1.3$ y

en especial $Na_v1.7$ y el canal resistente a la tetrodotoxina $Na_v1.8$ están involucrados en la señalización del dolor. En la actualidad varios fármacos que actúan sobre los canales Na_v como la fenitoina, carbamazepina, lamotrigina y lidocaína están siendo evaluados para el tratamiento de enfermedades como la epilepsia y dolor neuropático. El canal $Na_v1.4$ se encuentra selectivamente localizado en células musculares en la función neuromuscular y es un blanco molecular prometedor para fármacos que actúan como relajantes musculares (Oldrati y col., 2013). En este contexto, las miniproteínas presentes en venenos de tarántulas son prometedoras herramientas farmacológicas para el desarrollo de fármacos contra enfermedades neurodegenerativas y para el tratamiento del dolor neuropático, entre otras. En la Tabla 3 se indica el subtipo de canales Na_v sobre los que modulan las neurotoxinas procedentes del veneno de tarántulas a la fecha, en base a la base de datos de Arachnoserver (Herzig y col., 2011). La toxina más potente encontrada es la β/ω TRTX-Tp2a (protoxina-2) del veneno de *Thrixopelma pruriens* con una CI_{50} de 0.3 nM en canales $Na_v1.7$ de humano (Figura 8A) (Klint y col., 2012).

Tabla 3. Subtipos de canales de Na_v de vertebrados sobre los que actúan las miniproteínas procedentes del veneno de tarántulas.

| Canal Na_v (vertebrados) | Número de toxinas |
|-------------------------------|----------------------|
| 1.1 | 7 |
| 1.2 | 13 |
| 1.3 | 11 |
| 1.4 | 6 |
| 1.5 | 15 |
| 1.6 | 4 |
| 1.7 | 11 |
| 1.8 | 8 |

Los canales de potasio dependientes de voltaje (K_v) constituyen una clase de canales importantes en la terapéutica. Se encuentran localizados en neuronas sensoriales, donde se involucran en el proceso de la nocicepción y en músculo cardíaco, donde están implicados en arritmias (Oldrati y col., 2013). El canal de potasio sensible al voltaje $K_v1.3$ es un blanco molecular para el tratamiento de enfermedades autoinmunes mediadas por linfocitos T (esclerosis múltiple, artritis reumatoide y psoriasis), ya que mediante su inhibición selectiva proporciona un mecanismo terapéutico sin inducir una inmunosupresión generalizada. ShK-186, una miniproteína del veneno de una anémona marina que cuenta una gran potencia y selectividad e inhibe los canales $K_v1.3$. Actualmente, este compuesto se encuentra en etapas clínicas para el tratamiento de esclerosis y artritis psoriásica (Chi y col., 2012). Dada la participación de los canales K_v en la liberación de neurotransmisores por la inducción de la etapa de repolarización, la modulación de este tipo de canales por toxinas de tarántulas es moderadamente común (como se aprecia en la Figura 7). Los péptidos de venenos de tarántulas que se han aislados modulan una variedad de subtipos de canales K_v (King, 2015). A la fecha, el péptido más potente de venenos de tarántulas es la k-TRTX-Sc1a (stromatoxina-1) encontrada en el veneno de *Stromatopelma calceatum* (Figura 8B) con una concentración inhibitoria media (IC_{50}) de 1.2 nM en canales $K_v4.2$ de vertebrados (Herzig y King, 2013).

Los canales de calcio dependientes de voltaje (Ca_v) están involucrados en la liberación del neurotransmisor en las sinapsis, en la contracción muscular y en otros procesos como secreción de hormonas, proliferación celular y expresión de genes (Flórez, 2008). Dada la importancia de los canales de Ca_v en los procesos de contracción muscular y liberación de neurotransmisores, este tipo de canales son excelentes blancos moleculares de las toxinas de tarántulas para inducir un bloqueo de larga duración de canales presinápticos y así generar una parálisis en las presas. Este tipo de toxinas comúnmente son llamadas ω -toxinas. La toxina procedente de venenos de tarántulas más potente, que actúa sobre canales Ca_v , es la ω -TRTX-Hg1a (SNX482) aislada del veneno de *Hysteroocrates gigas* (Figura 8C) con una IC_{50} de 30 nM en canales de $Ca_v2.3$ en vertebrados.

Hasta el 2013, las toxinas de tarántulas que actúan sobre Ca_v presentan tres enlaces disulfuro y un rango de tamaño entre 28-42 residuos de aminoácidos (Herzig y King, 2013). Las toxinas de tarántulas que modulan canales Ca_v tienen una perspectiva interesante para ser investigados para el desarrollo de analgésicos. En humanos, de los diez subtipos de Ca_v identificados, los subtipos $Ca_v2.1$, $Ca_v2.2$ y $Ca_v2.3$ son las dianas farmacológicas validadas para el tratamiento del dolor. Por ejemplo, el medicamento analgésico aprobado por la FDA, Prialt[®], consiste en un péptido ICK del veneno del gasterópodo marino *Conus magus* que inhibe la actividad de canales $Ca_v2.2$ (King, 2015). Hay varias toxinas de arañas que muestran modular la actividad de varios tipos de canales Ca_v , es decir, que no son específicas para un subtipo de Ca_v en particular. A pesar de ello, muestran actividad analgésica sin causar efectos adversos (King, 2015). Por ejemplo, la toxina, ω -ctenitoxina-Pn4a de la araña *Phoneutria nigriventer* muestra actividad en los canales $Ca_v1.2$, $Ca_v2.2$, $Ca_v2.1$ y $Ca_v2.3$; a pesar de ello, mostró ser eficaz en modelos dolor inflamatorio y dolor neuropático en ratas y ratones sin causar alteraciones en el comportamiento de los roedores e indujo los máximos efectos antinociceptivos (Vieira y col., 2005; Souza y col., 2008). Además, esta toxina tiene el potencial para ser empleada como adyuvante en el tratamiento del dolor con opioides, ya que potencia el efecto analgésico de la morfina y reduce los efectos adversos de dosis repetidas de morfina, incluyendo tolerancia, estreñimiento, hiperalgesia y síntomas de abstinencia (De Souza y col., 2011). En particular, la toxina ω -TRTX-Hg1 del veneno de la tarántula *Hysteroocrates gigas* que bloquea canales $Ca_v2.3$ se encuentra a la espera de ser evaluada en modelos animales de dolor (Klint y col., 2014). Por otra parte, el canal $Ca_v2.1$ es altamente expresado en el sistema nervioso central y se cree que juega un rol clave en desórdenes neurológicos como epilepsia, ataxia, degeneración en la enfermedad de Alzheimer, entre otros (Nimmrich y Gross, 2012). Las toxinas peptídicas de las tarántulas y en general de las arañas representan una fuente de moléculas para el desarrollo fármacos para el tratamiento de este tipo de enfermedades (King, 2015).

Los canales mecanosensitivos (MSC's) están relacionados con varios procesos fisiológicos. En las neuronas sensoriales, estos canales están involucrados en la mecanotransducción de estímulos externos como la presión y el tacto, mientras que en el corazón, se encuentran implicados en condiciones patológicas como la fibrilación auricular (Oldrati y col., 2013). En venenos de tarántulas también se han encontrado miniproteínas capaces de actuar sobre este tipo de canales (Herzig y King, 2013). Un potente bloqueador de este tipo de canales es la toxina M-TRTX-Gr1b (GsMTx4) (Figura 8D), procedente de la tarántula chilena *Grammostola rosea*, de la que se ha demostrado que bloquea este tipo de canales sin ningún efecto citotóxico. Actualmente, esta toxina se está siendo empleada para estudiar la estructura y la farmacología de los MSC's. Además, teniendo en cuenta la implicación de estos canales en sensación de dolor, esta toxina fue sugerida como candidato a fármaco para reducir el dolor neuropático y mecánico (Gottlieb y col., 2004; Park y col., 2008). Por otra parte, los MSC's están involucrados en las arritmias cardíacas, por lo que el uso de la toxina GsMTx4 para el tratamiento de este tipo de enfermedad también podría ser considerado. También, una aplicación de esta toxina en el tratamiento de distrofia muscular ha sido propuesta. Esta enfermedad hereditaria se caracteriza por defectos en las proteínas musculares que impiden el movimiento y conducen a insuficiencia respiratoria (King, 2015). El bloqueo selectivo de los canales parece mejorar el rendimiento muscular y mitigar esta condición patológica. Otra posible aplicación es para el tratamiento de la xerocitosis hereditaria, ya que la toxina GsMTx4 bloquea al canal mecanosensitivo selectivo Piezo 1 que asocia a esta enfermedad (Saez y col., 2010; Bae y col., 2011; Zarychanski y col., 2012).

La familia de canales TRP (Receptores de Potencial Transitorio) son una diana molecular emergente para el tratamiento de diferentes enfermedades como el dolor neuropático, migraña y enfermedad inflamatoria del intestino (Holzer, 2011; Eid, 2011; Benemei y col., 2013; Julius, 2013). Los canales TRP son los responsables de mediar la respuesta a sensaciones tales como el calor, el frío y la presión y responden a algunos productos químicos en alimentos

picantes como a la capsaicina presente en los chiles y el mentol de la menta (Julius, 2013; Vay y col., 2012). Los receptores TRPV1, TRPV3 y TRPA1 son de particular interés, ya que su modulación puede generar un efecto analgésico. Actualmente, una preparación de capsaicina tópica, un agonista de receptores TRPV1, es empleada para el tratamiento del dolor (Anand y Bley, 2011). El fundamento de utilizar activadores de la actividad del receptor radica en que estos compuestos promuevan la desensibilización de TRPV1 y generen el efecto analgésico deseado (Julius, 2013; Vay y col., 2012). Con la finalidad de investigar de una manera más profunda la estructura y función de los canales TRPV1, herramientas moleculares selectivas son necesarias para ello. Por ejemplo, la toxina DkTx, recientemente fue empleada para capturar la estructura del estado abierto del canal TRPV1 (Cao y col., 2013). Las toxinas peptídicas de tarántulas que actúan como agonistas de canales TRPV1 generan la activación de este receptor que produce un dolor ardiente en vertebrados, por lo que estas toxinas pueden jugar un papel defensivo contra los depredadores vertebrados (Herzig y King, 2013). La toxina promiscua (β/ω -theraphotoxina-Tp1a), la cual inhibe la actividad de canales Nav, Cav y Kv, recientemente se encontró que además inhibe la actividad de canales TRPA1 (Gui y col., 2014). Estas toxinas representan una herramienta útil para la caracterización estructural y el estudio farmacológico de estos canales y que podrían llegar a ser considerados compuestos líderes para el desarrollo de fármacos con propiedades analgésicas (King, 2015).

La concentración de protones, o el pH, es uno de los parámetros fisiológicos más estrictamente controlados. Las alteraciones fisiológicas al pH están a menudo asociadas a condiciones patológicas, por lo que los mamíferos están equipados con sistemas para detectar acidosis (King, 2015). En este contexto, los canales sensibles al ácido (ASIC) parecen ser los sensores de ácido primarios en nociceptores humanos (Ugawa y col., 2002). Estos canales pertenecen a la superfamilia ENaC/DEG (*epithelial sodium channel/degenerin*) encontrándose principalmente distribuidos en células neuronales y se activan por una alta concentración de protones en el medio. Siete subunidades han sido

identificadas actualmente: ASIC1a, ASIC11b, ASIC11b2, ASIC12a, ASIC12b, ASIC13 y ASIC14 que se combinan para formar canales heterotriméricos u homotriméricos que difieren en su sensibilidad al pH, cinética y distribución tisular. La subunidad ASIC3 junto con ASIC1a, es la más sensible al pH y es altamente expresada en las neuronas sensoriales que inervan la piel, el sistema muscular y muchos órganos (Deval y col., 2010), y desempeña un papel clave en el dolor inflamatorio (Deval y col., 2008), artritis (Izumi y col., 2012), dolor postoperatorio y migraña (Karczewski y col., 2010). Información reciente originada de modelos de dolor en roedores, sugiere que la subunidad ASIC1b, la cual es encontrada exclusivamente en neuronas sensoriales periféricas, es también una diana molecular válida para el desarrollo de analgésicos (Diochot y col., 2012). La subunidad ASIC1a es la más abundante en el sistema nervioso central y es considerada un blanco molecular relacionado en varias condiciones patológicas, incluyendo dolor, accidente cardiovascular isquémico (Xiong y col., 2004), depresión, glioblastomas de alto grado y enfermedades autoinmunes y degenerativas como esclerosis múltiple (Vergo y col., 2011), enfermedad de Huntington y Parkinson (Arias y col., 2008; Wong y col., 2008). Por lo anterior, los inhibidores de ASIC son de gran interés para el desarrollo de fármacos analgésicos y para el tratamiento de una importante variedad de desórdenes del sistema nervioso central. La terafotoxina π -Pc1a, también conocida como PcTx1 (Figura 8E), procedente del veneno de la tarántula *Psalmopoeus cambridgei* está constituida por 40 residuos de aminoácidos y tres enlaces disulfuro. Esta toxina es la más potente bloqueadora del canal ASIC1a, con una CI_{50} de 0.9 nM en rata (Saez y col., 2011). En un estudio, se encontró que la administración intratecal o intracerebroventricular (i.c.v.) de PcTx1 en ratones induce un potente efecto analgésico, indicando que los canales ASIC1a presentes en el SNC están implicados en el procesamiento de dolor central y que son un blanco molecular viable para el desarrollo de analgésicos (Pignataro y col., 2007). Por otro lado, los canales ASIC1a son una diana terapéutica para el tratamiento del derrame cerebral, ya que en modelos de roedores de isquemia cerebral, el tamaño del infarto y los déficits neurológicos se reducen en gran medida por el bloqueo

farmacológico de canales ASIC1a (Xiong y col., 2004; Rooj y col., 2012). En un modelo de rata de isquemia focal (oclusión de la arteria cerebral media transitoria), la inyección i.c.v. de la toxina PcTx1, 30 minutos antes y después de la inducción de la isquemia reduce el tamaño del infarto en un 60%. Consistentemente con estos resultados, siendo un efecto mediado por los canales ASIC1a, el tamaño del infarto se redujo de manera similar en un 61% en ratones knockout de canales ASIC1a (Xiong y col., 2004). Aún más interesante desde una perspectiva terapéutica fue la observación de que la toxina PcTx1 reduce el tamaño del infarto al 30% cuando es administrada vía i.c.v. a las 5 horas después empleando el mismo modelo animal. Por lo tanto, PcTx1 es una pista prometedora para el desarrollo de nuevas terapias para tratar accidentes cerebrovasculares (Pignataro y col., 2007).

El blanco molecular sigue siendo desconocido para un poco más del 50% de las toxinas reportadas del veneno de tarántulas. La razón principal es que la mayoría de las secuencias de las toxinas se han derivado de transcriptomas de la glándula del veneno y no se han realizado estudios sobre su actividad o identificación de su blanco molecular. Muchas de estas toxinas podrían actuar sobre uno de los blancos moleculares ya mencionados. Dada la gran variación en el tamaño de las toxinas de tarántulas (de 27 a 116 residuos de aminoácidos) y en el número de puentes disulfuro (1-5) se estima que se identifiquen otros blancos moleculares de acción (Herzig y King, 2013).

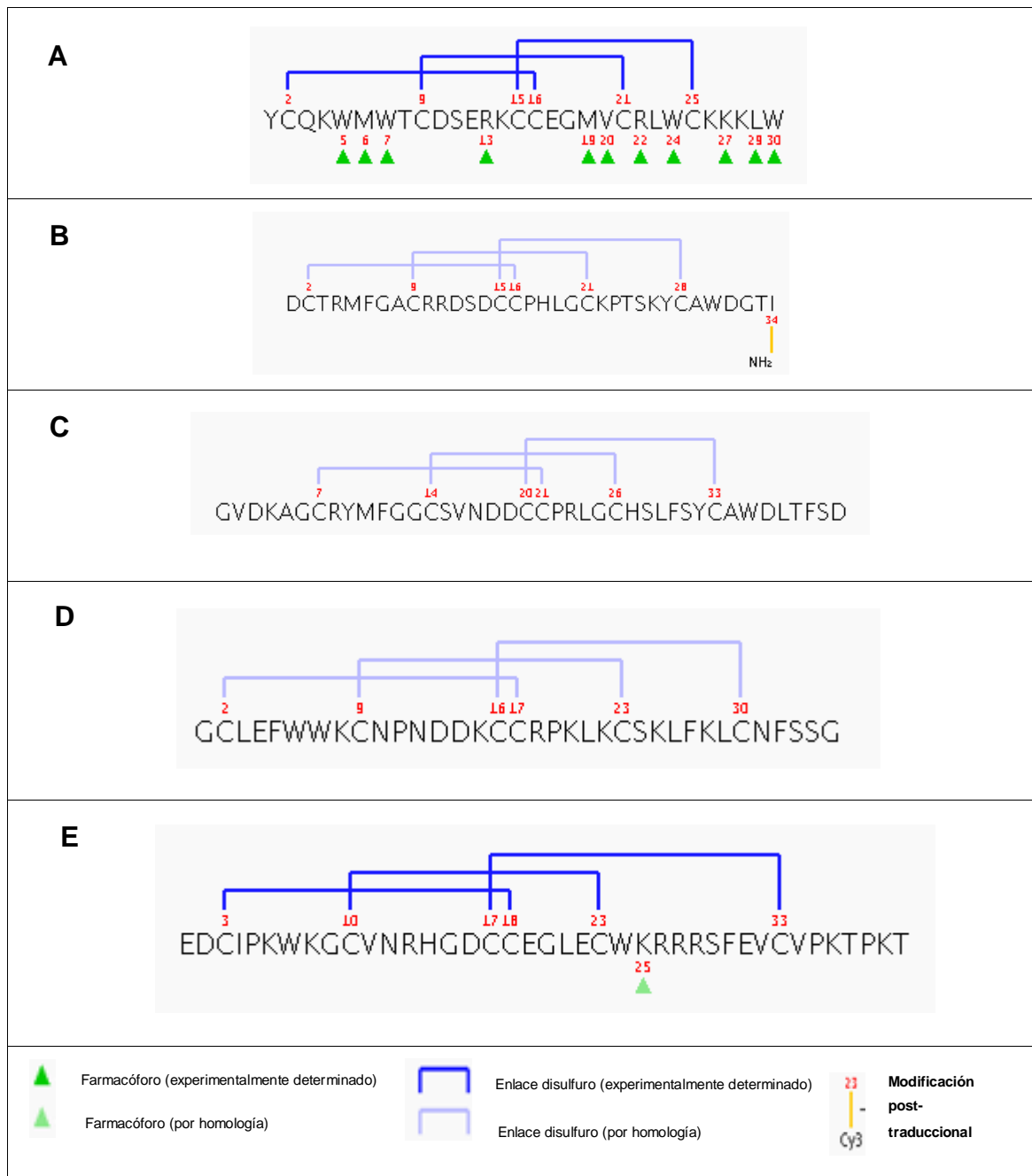


Figura 8. Toxinas más potentes encontradas en venenos de tarántulas que modulan diferentes blancos moleculares. (A). β , ω -TRTX-Tp2a (protoxina-2), (B). κ -TRTX-Sc1a (stromatoxina-1), (C). ω -TRTX-Hg1a (SNX482), (D). TRTX-Gr1b (GsMTx4), (E). π -TRTX-Pc1a (PcTx1). Imágenes tomadas de Herzig y col., 2011.

2.3.3 Enzimas

Las enzimas son componentes constitutivos de los venenos de arañas. En un análisis realizado por Kuhn-Nentwig y col. (2011) señala que se han reportado diferentes tipos de actividad enzimática en 14 diferentes familias de arañas (Tabla 4). De acuerdo a esto y con base en el tipo de sustratos sobre los que actúan, estas enzimas se pueden clasificar en dos principales grupos: enzimas que actúan sobre componentes de la matriz extracelular y las que actúan sobre componentes de la membrana celular. Dentro de las enzimas que actúan sobre componentes de la matriz extracelular se encuentran las hialuronidasas, que han sido reportadas en las familias de arañas Theraphosidae, Sicariidae, Desidae, Lamponidae, Heridiidae, Ctenidae, Lycosidae. Las colagenasas y otras metaloproteasas han sido identificadas en los venenos de las familias Araneidae, Nephilidae, Sparassidae y Lycosidae. Particularmente los venenos de diferentes especies de arañas del género *Loxosceles*, bien conocidas como “arañas violinistas”, han sido investigados con respecto a sus propiedades proteolíticas, de los cuales se han identificado serina proteasas y metaloproteinasas. Además, enzimas de tipo proteasa han sido reportadas en las familias Hexathelidae, Theraphosidae, Lycosidae y Lamponidae (Kuhn-Nentwig y col., 2011).

Por otra parte, dentro de las enzimas que actúan sobre componentes de la membrana celular como fosfolípidos de diversa composición química, se encuentran las fosfodiesterasas, fosfolipasas y esfingomielinasas tipo D. Estas últimas se encuentran particularmente presentes en los venenos de arañas del género *Loxosceles*, que son las causantes del efecto necrótico que causa su mordedura en los tejidos afectados. El objetivo de la presencia de estas clases de enzimas es la de destruir la barrera de la matriz extracelular y las membranas celulares para facilitar que la distribución de las toxinas para puedan alcanzar a su diana molecular y ejercer su efecto de una manera más rápida en sus presas. Además, la actividad proteolítica de algunas de estas enzimas facilita la digestión preoral posterior (Kuhn-Nentwig y col., 2011).

Otros tipos de enzimas han sido reportadas en venenos de arañas. Por ejemplo, una isomerasa de *Agelenopsis aperta* que altera la quiralidad del residuo de Ser46 a la configuración D de la ω -agatoxian IVB y mejora la actividad de esta toxina en casi dos órdenes de magnitud (Heck y col., 1994; Shikata y col., 1995). Además, una ATPasa, que cataliza la desfosforilación de ATP a ADP ha sido descrita en los venenos de *Loxosceles laeta* y *L. reclusa* (Geren y col., 1976; Schenone y Suarez, 1978). Por otro lado, una cininasa activadora de la bradiquinina ha sido aislada del veneno de *Latrodectus tredecimguttatus*. Esta podría ser identificada como una tiol-endopeptidasa que actúa con gran especificidad en el enlace Pro-Phe de la bradicinina y la angiotensina I (Akhunov y col., 1996). Las fosfatasas de tipo ácido y alcalino están relacionadas con una variedad de procesos biológicos, como traducción de señales, regulación metabólica y metabolismo energético (Kostrewa y col., 1999). Este tipo de enzimas han sido identificadas en los venenos de *Parawixia bistriata* (Rodrigues y col., 2006) y *Loxosceles reclusa* (Heitz y Norment, 1974).

Con base en el análisis elaborado por Kuhn-Nentwig y col., (2011), en la familia a la que pertenecen las tarántulas (Theraphosidae), las enzimas representativas son hialuronidasas, fosfodiesterasas y proteasas. Sin embargo, algunos autores sugieren que la presencia de proteasas en los venenos de tarántulas se debe a contaminación por saliva del espécimen al momento de la extracción del veneno (Escoubas y Rash, 2004).

Tabla 4. Enzimas descritas en venenos de diferentes familias de arañas (tomado de Kuhn-Nentwig y col., 2011).

| Familia | Especies | Enzima |
|----------------|-------------------------------------|---|
| Agelenidae | <i>Agelenopsis aperta</i> | Isomerasa de péptidos |
| Araneidae | <i>Eriophora transmarina</i> | Colagenasa (proteínasa) |
| | <i>Parawixia bistriata</i> | Fosfatasa alcalina y ácida |
| Ctenidae | <i>Cupiennius salei</i> | Hialuronidasa |
| | <i>Phoneutria</i> (dos especies) | Hialuronidasa, proteasa |
| Desidae | <i>Badumna insignis</i> | Hialuronidasa, proteasa |
| Eresidae | <i>Eresus kollari</i> | Fosfolipasa A2 |
| Hexathelidae | <i>Atrax robustus</i> | Hialuronidasa, fosfodiesterasa, proteasa |
| | <i>Hadronyche versuta</i> | Fosfolipasa A |
| Lamponidae | <i>Lampona cylindrata</i> | Hialuronidasa, proteasa |
| Lycosidae | <i>Hippasa</i> (tres especies) | Hialuronidasa, metaloproteasa, serinproteasa, fosfolipasa A2 |
| | <i>Lycosa</i> (dos especies) | Hialuronidasa, proteasa (colagenasa), serin proteasa |
| Miturgidae | <i>Cheiracanthium mildei</i> | Fosfolipasa A2 |
| Nephilidae | <i>Nephila edulis</i> | Colagenasa (peptidasa) |
| Sicariidae | <i>Loxosceles</i> (16 especies) | Fosfatasa alcalina, ATPasa, esterasa, hialuronidasa, metaloproteínasa, proteasa, serinproteasa, fosfolipasa D, chitinasa, |
| | <i>Sicarius</i> (9 especies) | Fosfolipasa D |
| Sparassidae | <i>Holconia immanis</i> | Colagenasa (proteínasa) |
| Theraphosidae | <i>Aphonopelma</i> (3 especies) | Hialuronidasa, fosfodiesterasa, proteasa |
| | <i>Vitalius dubius</i> | Hialuronidasa |
| Theridiidae | <i>Latrodectus tredecimguttatus</i> | Hialuronidasa, cinasa, fosfodiesterasa |

2.3.3.1 Hialuronidasas

Las hialuronidasas son glucosidasas que hidrolizan preferentemente al hialuronano (polímero del ácido hialurónico), componente de la matriz extracelular, especialmente de tejido conectivo blando. Estructuralmente, el hialuronano es un polisacárido lineal formado por unidades repetidas del disacárido N-acetil- β -D-glucosamina (GlcNAc) y β -D-ácido glucorónico (GlcUA), unidos alternadamente por enlaces glicosídicos β -1,3 y β -1,4 (Figura 9), que bajo condiciones fisiológicas se encuentra en rango de peso de 10^6 y 10^7 Da y es altamente aniónico debido a la presencia de grupos carboxilo que le confieren carga negativa. El ácido hialurónico es crítico para el ensamblaje y la estructura de la matriz extracelular tanto a nivel celular y de tejido. El gran tamaño del hialuronano proporciona rigidez a la matriz extracelular y tiene una función de andamiaje para varios sus constituyentes. Los grupos hidrófilos del hialuronano atraen el agua para hidratar los tejidos, lubricar las articulaciones, y llenar espacio. Un hialuronano hidratado, permite a la matriz extracelular facilitar el movimiento y la proliferación celular, que es fundamental durante los procesos de desarrollo temprano, y en la regeneración y remodelación de tejidos; como por ejemplo durante la cicatrización de heridas (Triggs-Raine y Natowicz, 2015). Otra de las funciones, es que el hialuronano y sus proteínas de unión regulan la expresión de genes inflamatorios, reclutamiento de células y liberación de citoquinas inflamatorias, y puede atenuar el curso de la inflamación, proporcionando protección contra el daño tisular (Petrey y Carol, 2015). Además, el hialuronano se relaciona en los procesos de ovulación y fertilización (Salustri y col., 1999). Las funciones del hialuronano dependen de su tamaño; el hialuronano de masa molecular alta y baja suelen tener efectos opuestos sobre la transición epitelio mesénquima, inflamación y angiogénesis (Erickson y Stern, 2012).

De acuerdo al artículo de revisión elaborado por Bordon y col. (2015), las hialuronidasas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, reportándose su presencia en venenos de animales, órganos humanos, fluidos corporales, bacterias, hongos, bacteriófagos, crustáceos, moluscos,

sanguijuelas, parásitos (anquilostoma), tejidos animales y además en algunos tumores malignos.

Las hialuronidasas son enzimas que por sí mismas no son tóxicas pero derivado de su actividad enzimática, al degradar principalmente ácido hialurónico, reducen la viscosidad del medio y originan que la matriz extracelular sea menos rígida, aumentando su permeabilidad a toxinas y facilitando su distribución. De esta forma, estas enzimas contribuyen al efecto local y sistémico del veneno de animales en sus presas o víctimas (Nagaraju y col., 2007; Ferrer y col., 2013). Por esta razón, a estas enzimas se les conoció inicialmente con el nombre de “factores de difusión” (“spreading factors”), un término introducido por Duran en 1933, que posteriormente a través de ciertas investigaciones sería comprobado por Tu y Hendon (1983). En este contexto, hay varias investigaciones que demuestran el efecto potenciador de las hialuronidasas hacia diferentes toxinas, esto con la finalidad de comprender los mecanismos de acción bajo el cual diversos venenos actúan y ejercen su efecto tóxico. La hialuronidasa presente en el veneno de la oruga *Premolis semirufa* tiene un rol muy importante en la periartritis falángica que ocasiona el envenenamiento por este animal en Brasil (Villas-Boas y col., 2013). Otro ejemplo es de una hialuronidasa recombinante del veneno de la araña *Loxosceles intermedia*, la cual incrementa el efecto dermonecrotico de la toxina, también recombinante, LiRecDT1 (Ferrer y col., 2013). Similar resultado, se presentó con la hialuronidasa de la araña *Hippasa partita* que potenció la miotoxicidad de la toxina VRP-PL-VIII (Nagaraju y col., 2007), así también hay otras investigaciones que confirman este rol de las hialuronidasas en diferentes venenos de animales (Pessini y col., 2001; Volfova y col., 2007; Horta y col., 2014).

Por otra parte, las hialuronidasas se han descrito como componentes alérgenos en venenos de artrópodos, siendo capaces de inducir reacciones anafilácticas severas en humanos mediadas por anticuerpos Ig-E; principalmente en venenos de avispas y abejas sociales. También estas enzimas pueden originar una potente inflamación en la zona de la mordedura (Lu y Kochoumian, 1995; Kolarich y col., 2005).

Hay varios reportes de actividad hialuronidasa en venenos de varias familias de arañas a la fecha, como se mostró en la Tabla 4. En lo que respecta a la Theraphosidae, a diferencia de otras familias, no hay gran variedad de reportes de hialuronidasas presentes en venenos de terafósidos. Curiosamente, la primer hialuronidasa purificada, fue proveniente del veneno de la tarántula *Dugesiella hentzi* (ahora, *Aphonopelma hentzi*). Esta enzima fue identificada como el componente mayoritario de este veneno (Schanbacher y col., 1973). Sutti y col. (2014) lograron purificar una hialuronidasa presente del veneno de *Vitalius dubius*. Algunas de las propiedades de estas dos enzimas purificadas se colocan en la Tabla 5. Además, para el veneno de *Eurypelma californicum* (Savel-Niemann, 1989) se reportó su actividad hialuronidasa y se identificó el peso molecular de hialuronidasas de ~40 kDa. Para varias tarántulas del género *Brachypelma* y *Aphonopelma serratum* se identificó actividad hialuronidasa por zimografía, presentando actividad alrededor de 40 kDa (Clement y col., 2016). Nuestro grupo de investigación recientemente reportó la actividad hialuronidasa en los venenos de *C. darlingi*, *B. epicleureanum* y *P. regalis* (Garcia y col., 2015).

En un estudio más completo se purificó una hialuronidasa del veneno de la tarántula mexicana *Brachypelma vagans*. A partir del conocimiento de una parte de su secuencia de aminoácidos se construyó su oligonucleótido y se expresó la enzima hialuronidasa en un sistema heterólogo de *E. coli*. El peso molecular de esta enzima es de 47.5 kDa (Clement y col., 2012). Además, en este mismo trabajo las estructuras primarias de dos hialuronidasas se dedujeron a partir del ARN total aislado a partir de glándulas de veneno de las tarántulas *Brachypelma vagans* y *Brachypelma verdezi* empleando transcripción inversa seguido de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). Las secuencias de aminoácidos deducidas de estas dos enzimas son homólogas a las hialuronidasas de otras arañas y también de otros insectos (Figura 9). Lo que indica la presencia de secuencias altamente conservadas de hialuronidasas entre venenos de diferentes artrópodos.

Tabla 5. Propiedades de hialuronidasas purificadas de venenos de tarántulas.

| Veneno | PROPIEDADES | | | | | | |
|------------------------|---------------|-----|--------------|-------------|---|------------------------------------|-------------------------------|
| | P.M. (kDa) | pI | pH óptimo | T óptima | Número de residuos de aminoácidos | Otras | Referencia |
| <i>Dugesia hentzi</i> | 39,600 | 6.9 | 3.5 | N/D | 356 | N/D | Schanbacher y col., , 1973 |
| <i>Vitalius dubius</i> | ~43 kDa | N/D | 4-5 | 37°C | N/D | Vmax=11.4µg/min Km= 677.0 µg/mL | Sutti y col., 2014 |

| | | |
|----------------------|---|-----|
| <i>B. vagans</i> | -----KDPQVFAVRWNVPTIQCRKTYGM | 23 |
| <i>B. verdezi</i> | -----WNVPTIQCRKTYGM | 14 |
| <i>L. intermedia</i> | -----MQTILVLTFFLSAWFLAVGFDVFWNVPSQOCKK-YGM | 36 |
| <i>A. mellifera</i> | MSRPLVITEGMMIGVLLMLAPINALLLGFVQSTPDNNKTVREFNVYWNVPTFMCHK-YGL | 59 |
| <i>V. germanica</i> | -----SERPKRVFNIVNVPTFMCHKQ-YDL | 24 |
| <i>B. vagans</i> | DFVPLLKSYGILVNSEDEFKGEVNTIFYEG--QLGLYPHLDQSGQRVNGGIPQLGDLPEH | 81 |
| <i>B. verdezi</i> | DFVPLLKSYGILVNSEDEFKGEVNTIFYES--QLGLYPHLDQSGQRVNGGIPQLGDLPEH | 72 |
| <i>L. intermedia</i> | KFVPLLEQYSILVNKEDNFKGDKITIFYES--QLGLYPHIGANDESFNNGGIPQLGDLKAH | 94 |
| <i>A. mellifera</i> | RFEEVSEKYGILQNWMDKFRGEEIALLYDPGMFPALLKDPNGNVVARNGGVFOLGNLTKH | 119 |
| <i>V. germanica</i> | YFDEVTN-FNFKRNSKDDFQGDKIAIFYDPGEFPALLSLKDGKYKRRNGGVPOEGNITIH | 83 |
| <i>B. vagans</i> | LKKAREDKAIKIPDVNFNGLGIIDWESWRPWNFNWNGALKKYQDESFEALKQHPGRNTD | 141 |
| <i>B. verdezi</i> | LKKAREDKAIKIPDVNFNGLGIIDWESWRPWNFNWNGALKKYQDESFEALKQHPGRNTD | 132 |
| <i>L. intermedia</i> | LEKSAVDIRRDILDKSATGLRIIDWEAWRPIWEFNWSLRYQDKMKKVVRFNPTAHES | 154 |
| <i>A. mellifera</i> | LQVFRDHLINQIPDKSFPVGVVIDFESWRPIFRONWASLQPYKLSVEVVRREHPFWDQ | 179 |
| <i>V. germanica</i> | LQKFIENLDKTYPNRNFSGIGVIDFERWRPIFRONWGNMKIHKNFSIDLVRNEHPTWKK | 143 |
| <i>B. vagans</i> | SLWQLAQQEWETSAKNFHLETLRRLAQTMRPNSLWCYYLFPDCYNYNGQTPQEFRCPSIVV | 201 |
| <i>B. verdezi</i> | SLWQLAQQEWETSAKNFHLETLRRLAQTMRPNSLWCYYLFPDCYNYNGQTPQEFRCPSIVV | 192 |
| <i>L. intermedia</i> | TVAKLAHNEWENSSKSWMLSTLQLGKQLRPNSVWCYYLFPDCYNYDGNVQEQFQCEAIR | 214 |
| <i>A. mellifera</i> | RVEQEAKRFEKYQLFMEETLKAAKRMRPAANWGYAYPYCYNLTPN-QPSAQCEATTM | 238 |
| <i>V. germanica</i> | MIELEASKRFEKYARFFMEETLKLAKKTRKQADWGYGYFYCFNMSPN-NLVPECDVTAM | 202 |
| <i>B. vagans</i> | TCNNQLSWLWHEKAVCPSLYVADGYLQKYTFEORTWYVDGRLKEALRVA-----PNSQL | 256 |
| <i>B. verdezi</i> | TCNNQLSWLWHEKAVCPSLYVADGYLQKYTFEORTWYVDGRLKEALRVA-----PNSQL | 247 |
| <i>L. intermedia</i> | KGNDRLKWLWEESTAVCPSEIYIKEGQLNTYTLQKRIWFTNGRLQEALRVAQ----PKARI | 270 |
| <i>A. mellifera</i> | QENDKMSWLFESQVLLPSVYLR----WNLTSGERVGLVGRVKEALRIARQMTTSRKKV | 294 |
| <i>V. germanica</i> | HENDKMSWLFNNQNVLLPSVYVR----QELTPDQRIGLVQGRVKEAVRISNNLKHS-PKV | 257 |
| <i>B. vagans</i> | YPYVGYGYVTPGAMVPEDDFWRILAQVASAGSSGTVIWGASATLRSRDNQOLLOQYVKD | 316 |
| <i>B. verdezi</i> | YPYVGYGYVTPGAMVPEDDFWRILAQVASAGSSGTVIWGASATLRSRDNQOLLOQYVKD | 307 |
| <i>L. intermedia</i> | YPYINY--SIKPGMMVPEVEFWRLIAQIASLGMGAVIWGSSASVGSKNHCQALMKYIAD | 328 |
| <i>A. mellifera</i> | LPYYWYKYQDRRDTDLRADLEATLRKITDLGADGFIIWGSSDDINTKAKLQFREYLN | 354 |
| <i>V. germanica</i> | LSYWWYVYQDETNTYLTETDVKKTFFQEIIVINGGDGIIIWGSSSDVNSLSKCKRLQDYLLT | 317 |
| <i>B. vagans</i> | ILGPSVKTVKENAERC AKTV CNGKGRCTWPNDPNVVAWRVYLDNRNKHPPQRSEITC HCV E | 376 |
| <i>B. verdezi</i> | ILGPSVKTVKENAERC AKTV CNGKGRCTWPNDPNVVAWRVYLDNRN----- | 352 |
| <i>L. intermedia</i> | VLGPATLRIKENVARC SKQAC SGRGRCTWPNDKTSVIAWKFLVEKEDYDFYLGDIETCK HCV E | 388 |
| <i>A. mellifera</i> | ELGPAVKRIALNNANDRLTVDVSVQV----- | 382 |
| <i>V. germanica</i> | VLGP----IAVN-----VTEAVN----- | 331 |
| <i>B. vagans</i> | GYSGRYCDVKSGITNQTKRVSFKLSELYTYLRRLDN | 413 |
| <i>B. verdezi</i> | ----- | 352 |
| <i>L. intermedia</i> | GYEGRYCEQKTK----- | 400 |

Figura 9. Comparación de las estructuras de dos hialuronidasas de las especies del género *Brachypelma* con hialuronidasas de otros artrópodos. *Brachypelma vagans* (tarántula, GenBank ID: AFS33217), *Brachypelma verdezi* (tarántula, no publicada), *Loxosceles intermedia* (araña, GenBank ID:AGH25912), *Apis mellifera* (abeja, Gen Bank ID: L10710.1), *Vespula germanica* (avispa, GenBank ID: CAL29818). Los residuos idénticos de marcan en color gris claro; las cisteínas se indican en color gris oscuro. Imagen tomada de Clement y col., 2016.

A. Clasificación

De acuerdo al mecanismo de reacción bajo el cual las hialuronidasas ejercen su acción enzimática sobre el ácido hialurónico, estas enzimas se clasifican en los siguientes tres grupos principales (Figura 10):

- El primer grupo (EC 3.2.1.35) incluye a las hialuronidasas presentes en mamíferos y venenos, estas enzimas son endo- β -N acetilhexosaminidasas, que hidrolizan enlaces β -1,4 glicosídicos del ácido hialurónico entre los residuos N-acetil- β -D-glucosamina (GlcNAc) y β -D-ácido glucorónico (GlcUA), generando el tetrasacárido -GlcUA-GlcNAc-GlcNAc- como el principal producto (Figura 11A). Además, esta clase de enzimas puede presentar actividad enzimática sobre el sulfato de condroitina (Stern y Jedrzejewski, 2006).
- En el segundo grupo (EC 3.2.1.36) se encuentran las enzimas endo- β -D-glucuronidasas que producen el tetrasacárido -GlcNAc-GlcUA-GlcNAc-GlcUA- (Figura 11B) derivado de la hidrólisis en el enlace β -1,3 glicosídico entre GlcUA y GlcNAc en el hialuronano. Esta clase de hialuronidasas, ha sido reportada en glándulas salivales de anélidos como sanguijuelas, anquilostomas y en ciertos crustáceos (Stern y Jedrzejewski, 2006).
- El tercer grupo (EC 4.2.2.1) se encuentra representado por N-acetyl-D-hexosaminidasas que escinden sobre el enlace β -1,4 glicosídico a través de una reacción de β -eliminación y no mediante hidrólisis como las clases anteriores y pueden actuar sobre el hialuronano, sulfato de condroitina, sulfato de dermatán, generando disacáridos insaturados con un doble enlace entre los carbonos 4 y 5 (Figura 11C). Esta clase de hialuronidasas se han aislado de varias cepas de microorganismos por ejemplo de *Clostridium*, *Micrococcus*, *Streptococcus* y *Streptomyces* (Stern y Jedrzejewski, 2006).

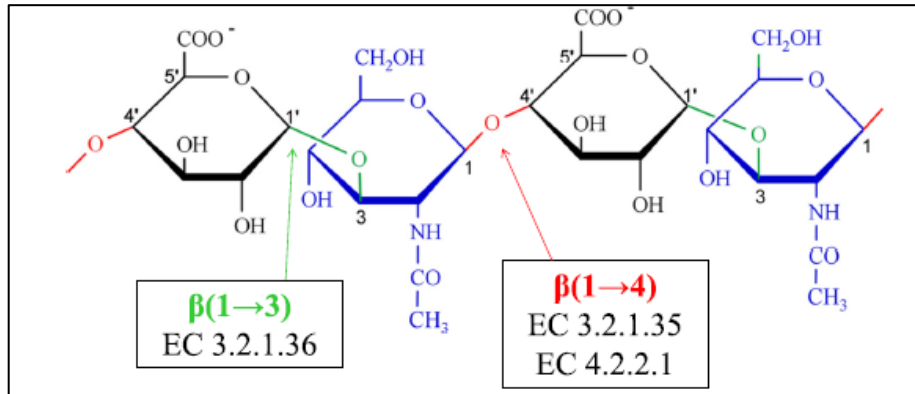


Figura 10. Estructura del hialuronano (polímero del ácido hialurónico). Las unidades repetidas del disacárido N-acetil- β -D-glucosamina (GlcNAc) y β -D-ácido glucurónico (GlcUA) unidos alternadamente por enlaces β -1,3 (marcado en verde) y β -1,4 (marcado en rojo). Las hialuronidasas EC 3.2.1.36 escinden el enlace β -1,3 glicosídico, la clase EC 3.2.1.35 escinde el enlace β -1,4 glicosídico y la clase EC 4.2.2.1 actúa sobre el enlace β -1,4 a través de una reacción de eliminación, generando un doble enlace en los residuos producidos (imagen tomada de Bordon y col., 2015).

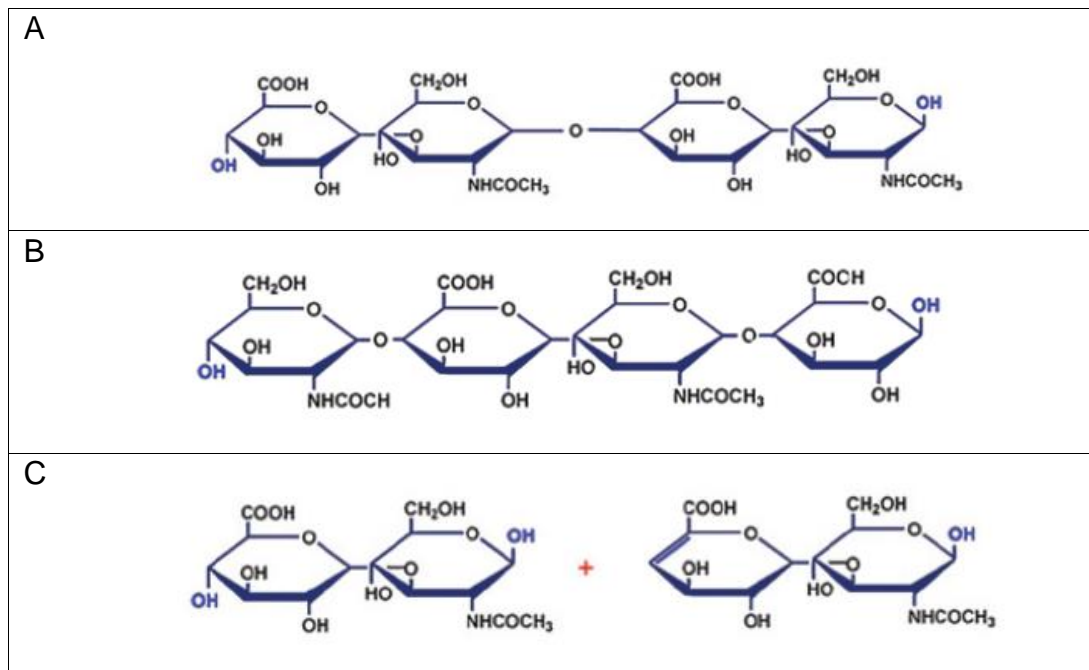


Figura 11. Principales productos generados por las diferentes clases de hialuronidasas (imagen tomada de Cavallini y col., 2013). (A) Producto de las hialuronidasas presentes en mamíferos y venenos de animales (EC 3.2.1.35). (B) Producto de las hialuronidasas presentes en anélidos (EC 3.2.1.36). (C) Producto de las hialuronidasas presentes en bacterias (EC 4.2.2.1).

B. Aplicaciones terapéuticas

Históricamente, las hialuronidasas han sido comercializadas con fines terapéuticos en los Estados Unidos de América desde 1948 (Tabla 6). Las aplicaciones médicas aprobadas para su uso están sustentadas en la propiedad de estas enzimas que, por su acción favorecen la absorción y distribución de fármacos y fluidos administrados por vía subcutánea. La terapia por vía subcutánea es limitada debido a los efectos opositores de la matriz extracelular, la cual restringe el área disponible para la absorción. El área de absorción puede aumentar en gran medida por la coadministración de hialuronidasas para degradar el ácido hialurónico presente. Esta acción enzimática permite la rápida distribución del fármaco al área blanco y la difusión de fluidos a los vasos sanguíneos. Debido a esto, los efectos locales adversos de los fármacos y fluidos pueden ser reducidos en tejidos, debido al incremento en el contacto con los vasos sanguíneos. Las hialuronidasas incrementan la difusión de moléculas de hasta 200 nm en diámetro, en una magnitud de 20 veces (Bookbinder y col., 2006).

Las soluciones aprobadas de hialuronidasa hasta hace algunos años, derivaban de extractos crudos de tejido testicular ovino o bovino. Estos extractos eran impuros (<1% de actividad enzimática/mg de proteína total) e inmunogénicos (Bookbinder y col., 2006). Frecuentemente, en estas preparaciones, las hialuronidasas estaban mezcladas con proteasas, inmunoglobulinas y factores que incrementaban la permeabilidad vascular y podían dar lugar a reacciones alérgicas mediadas por anticuerpos Ig-E tras repetidas administraciones (Pillwein y col., 1998; Eberhart y col., 2004). La última formulación de hialuronidasa introducida al mercado derivada de una hialuronidasa recombinante humana aprobada en el 2005 por la FDA, fue la enzima rHuPH20 bajo el nombre comercial de Hylenex. Esta preparación fue introducida al mercado como un intento para incrementar la seguridad y tolerabilidad, pero por la forma en que se purifica la enzima, abre la posibilidad de que genere reacciones alérgicas (Yocum y col., 2007). En este sentido, en un

estudio conducido en ratas y monos para el producto Hylenex, no se reportaron efectos adversos administrados por vía intravenosa, ocular y dérmica (Laurent y col., 1995). A la fecha, no se han documentado casos de efectos adversos para esta formulación en humanos (Dunn y col., 2010).

El uso de preparaciones de hialuronidasas están aprobados para tres indicaciones (Dunn y col., 2010):

- Adyuvantes en soluciones para incrementar la absorción y distribución de fármacos administrados por vía subcutánea.
- En la aplicación de hipodermoclisis o infusión subcutánea continua, que consiste en la administración de líquidos en la capa subcutánea de la piel, donde hay un extenso sistema linfático y vasos sanguíneos a través de los cuales los líquidos pueden ser absorbidos.
- Adyuvante en la urografía subcutánea para la mejora en la resorción de agentes radiopacos.

Además, la hialuronidasa bovina está aprobada para el tratamiento de hemorragia vítrea (Dunn y col., 2010).

Tabla 6. Formulaciones de hialuronidasas disponibles en el mercado (tomado de Dunn y col., 2010).

| Producto | Fuente | Dosis para la absorción | Dosis para la hipodermoclisis | Urografía Subcutánea |
|-----------|--------------------|-------------------------|-------------------------------|----------------------|
| Vitrasa | Liofilizado, ovino | 50-300 U/150 U* | 150 U/1 L solución | 75 U por escápula |
| Amphadase | Bovino | 30-300 U/150 U* | 150 U/1 L solución | 75 U por escápula |
| Hydase | Bovino | 50-300 U/150 U* | 150 U/1 L solución | 75 U por escápula |
| Hylenex | Humano | 50-300 U/150 U* | 150 U/1 L solución | 75 U por escápula |

* Dosis habitual para adultos.

Una unidad está definida como la cantidad de enzima que libera 1 μmol de N-acetilglucosamina del HA por minuto a 37°C a un pH de 4. (Dunn y col., 2010).

La aplicación terapéutica más importante de las hialuronidasas es su capacidad para incrementar la absorción y distribución de fármacos administrados por vía subcutánea. Estas enzimas se han empleado ampliamente como agentes de difusión junto con fármacos quimioterapéuticos, anestésicos locales y medios de contraste. En quimioterapia, las hialuronidasas son inyectadas junto con el fármaco mejorando su penetración en el tumor; por ejemplo, en los tumores cerebrales (Kohno y col., 1994). En cirugía oftálmica, las hialuronidasas son empleadas para la anestesia retrobulbar (Kempeneers y col., 1991), mientras que en la terapia del dolor, las hialuronidasas se administran junto con los anestésicos locales directamente en el sitio del dolor (por ejemplo en articulaciones o tendones) o a través de vía intratecal (Kim y col., 2009). En radiografía, las hialuronidasas se añaden al medio de contraste para mejorar la reabsorción (Schulze y col., 2008). Además, hay algunas aplicaciones no aprobadas para el uso de las formulaciones de hialuronidasas que incluyen la reducción del edema y lisis de adhesiones epidurales para tratar condiciones crónicas de dolor de espalda baja y dolor irradiado (Racz y col., 2008). Por otra parte, las hialuronidasas son empleados en la reducción del edema en el caso de parafimosis, rechazo de órganos trasplantados, hemorragia vítrea, entre otras (Dunn y col., 2010).

En el campo de la cirugía plástica y dermatología, las hialuronidasas son comúnmente empleadas para potenciar los efectos de anestésicos locales y disolver ácido hialurónico inyectado. La aplicación más importante de las hialuronidasas en el campo de cirugía plástica es la corrección de rellenos de ácido hialurónico (Figura 12) (Cavallini y col., 2013). Dependiendo de la localización y cantidad de relleno de ácido hialurónico, en la Tabla 7 se indican las dosis de hialuronidasas recomendadas dependiendo de la zona de corrección del relleno de ácido hialurónico.

Así mismo, las hialuronidasas pueden ser empleadas en complicaciones derivadas de las inyecciones de ácido hialurónico, ya que en algunos casos pueden causar isquemia cutánea por compresión o embolización del plexo subdérmico (Cavallini y col., 2013).

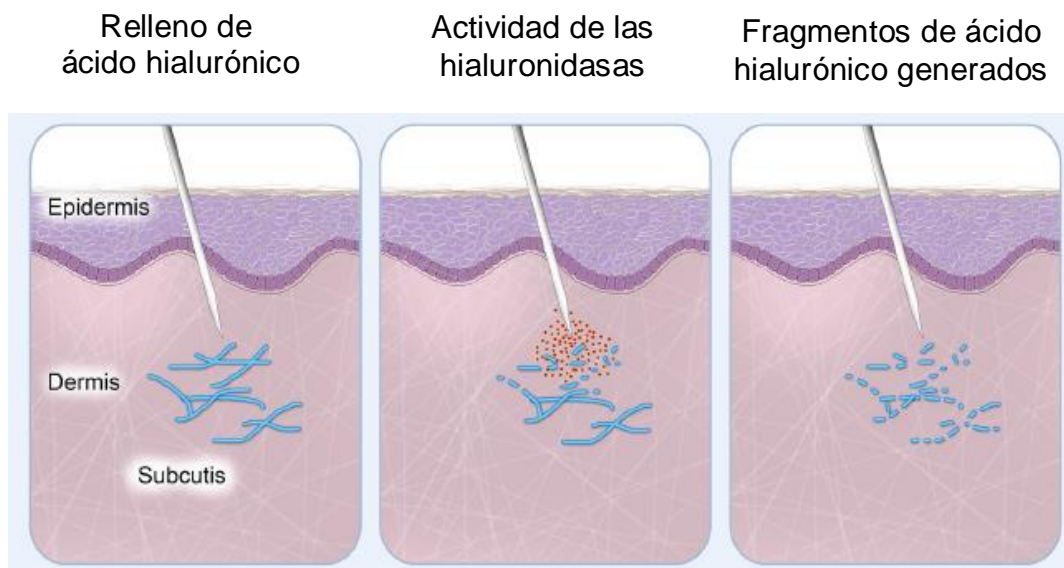


Figura 12. Degradación efectiva de hialuronidasas de rellenos dérmicos de ácido hialurónico (imagen tomada de Cavallini y col., 2013).

Tabla 7. Dosis de hialuronidasas recomendada para la corrección de relleno de ácido hialurónico (tomado de Cavallini y col., 2013).

| Región | Dosis (Unidades de hialuronidasas) |
|-----------------------|------------------------------------|
| Piel nasal y perioral | 15-30 |
| Área periorbital | 30 |
| Área infraorbital | 10-15 |
| Párpado inferior | 1.5 |

En el área de desarrollo farmacéutico, la enzima recombinante humana rHuPH20 está siendo empleada como componente de tratamientos que actualmente se encuentran en etapas clínicas; por ejemplo, esta enzima actúa como adyuvante de análogos de la insulina evaluados para el tratamiento de diabetes mellitus tipo I (Morrow y col., 2013) y para el tratamiento de cáncer pancreático metastásico, donde la hialuronidasa se administra conjuntamente con nab-paclitaxel y gemcitabina. Además, un producto farmacéutico fue aprobado en el 2014, conteniendo esta enzima para el tratamiento de inmunodeficiencia primaria en pacientes adultos (Bordon y col., 2015).

C. Potencial farmacológico y biotecnológico de hialuronidasas procedentes de artrópodos

Además de las aplicaciones médicas y usos no aprobados de las hialuronidasas ya mencionados, se encuentran algunas perspectivas interesantes para el uso de las hialuronidasas en los campos de la terapéutica y biotecnología. Entre las hialuronidasas procedentes de artrópodos se encuentra BmHYA1, una hialuronidasa aislada del veneno del escorpión *Buthus martensi*. Esta enzima indujo la reducción de la expresión del receptor CD44 variante 6 en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 (Feng y col., 2008). El hialuronano, además de que tiene su importancia en procesos fisiológicos, se involucra en procesos patológicos como ciertos tipos de cáncer, en el cual su nivel se encuentra sobreexpresado y se correlaciona con la agresividad del tumor. Así el hialuronano desempeña un papel importante en la metástasis y en la invasión de células cancerosas, esto se debe a su interacción con el receptor CD44, un miembro de la gran familia de glicoproteínas transmembranales involucradas en las conexiones célula-célula y célula-matriz extracelular (Götte y Yip, 2006).

Bitencourt y col. (2011) señalaron que la administración intranasal en ratones de la hialuronidasa (de origen bovino o aislada del veneno del escorpión *T. serrulatus*) bloquea potentemente la lesión pulmonar y la fibrosis inducida por bleomicina, presentándose un aumento de células mesenquimales en el fluido broncoalveolar y una disminución del factor de crecimiento transformante (TGF)- β y la deposición de colágeno. Este mismo grupo de investigación, ha desarrollado un sistema de administración intranasal empleando el uso de micropartículas PLGA (por sus siglas en inglés poly-D,L-lactide-co-glycolide). Sus resultados indican que con el uso de este sistema de entrega se reduce más eficientemente la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina (Bitencourt y col., 2015).

Por otro lado, hay estudios que demuestran que los antígenos recombinantes, tales como hialuronidasas, tienen un gran potencial inmunogénico en el

diagnóstico de alergias y en el campo de la inmunoterapia (Jacomini y col., 2014). Una hialuronidasa del veneno de una abeja fue acomplejada con un anticuerpo IgG, este reconocimiento del epítope de la hialuronidasa por el anticuerpo puede contribuir al desarrollo de nuevas proteínas con inmunogenicidad reducida para ser usado como un seguro alérgeno específico en la inmunoterapia (Padavattan y col., 2007). La inmunoglobulina E (IgE), presente en el suero de pacientes alérgicos al veneno de la avispa *P. polybia* puede reconocer a una hialuronidasa recombinante de este veneno (Pp-Hyal-rec) expresada en sistema de bacterias *E. coli* (Jacomini y col., 2014). Una hialuronidasa glicosilada heteróloga rVes v 2 de especies de avispas, expresada en un sistema celular de insectos, ha sido empleada para identificar a pacientes alérgicos a venenos de avispa (Balzer y col., 2014). Además, esta enzima no glicosilada expresada en un sistema de bacterias *E. coli* sirvió para discriminar las alergias de abejas y avispas, lo que permite la correcta prescripción de la inmunoterapia (Jacomini y col., 2014).

Los alérgenos recombinantes han sido utilizados con propósitos terapéuticos y de diagnóstico, ya que se obtienen con una calidad consistente y cantidad ilimitada (Valenta y Niederberger, 2007). Además de eso, pueden ser modificados para reducir su alergenicidad y promover propiedades inmunológicas beneficiosas con el objetivo de reducir efectos secundarios mediados por IgE después de la inmunoterapia (Cromwell y col., 2011).

En el futuro, se tiene como perspectivas que moléculas que constan de péptidos derivados de alérgenos unido a un vehículo viral podrían ser empleados en el tratamiento profiláctico y terapéutico de las alergias, sin efectos secundarios mediados por células T y anticuerpos IgE (Valenta y col., 2011). Finalmente, los inhibidores de la actividad hialuronidasa podrían ser empleados como agentes de primeros auxilios en las terapias antivenenos ya que las hialuronidasas tienen un rol relevante en el envenenamiento sistémico (Horta y col., 2014).

2.4 Género *Poecilotheria*

El género *Poecilotheria* constituye un grupo de tarántulas de gran tamaño, endémicas de la India y Sri Lanka. Su hábitat se limita principalmente a los bosques montañosos áridos y húmedos de estos países. La naturaleza de las tarántulas de este género es arborícola; es decir, viven en refugios bajo la corteza o en cavidades de árboles muertos, y a veces en cavidades de árboles vivos (Figura 13). En la actualidad se han descrito 14 especies de tarántulas pertenecientes a este género (Tabla 8) (Platnick, 2014).

Tabla 8. Especies de terafósidos del género *Poecilotheria*

| | |
|----------------------------|--------------------------|
| <i>P. subfusca</i> | <i>P. vittata</i> |
| <i>P. fasciata</i> | <i>P. smithi</i> |
| <i>P. formosa</i> | <i>P. rajaei</i> |
| <i>P. regalis</i> | <i>P. rufilata</i> |
| <i>P. hanumavilasumica</i> | <i>P. striata</i> |
| <i>P. metallica</i> | <i>P. tigrinawesseli</i> |
| <i>P. miranda</i> | <i>P. ornata</i> |

El comportamiento de las especies de tarántulas de este género suele ser muy tímido y tienden a esconderse. Cuando se sienten en peligro, muestran una postura amenazante, elevando sus patas delanteras, mostrando así sus coloridas rayas en los lados laterales de estas extremidades. Por el contrario, el patrón del color dorsal de estas tarántulas corresponde a su camuflaje. Peculiarmente, corren muy rápido y su velocidad puede ser confundida con la agresividad. La situación poblacional silvestre del género es desconocida, ya que

no se han realizado estudios científicos en la naturaleza sobre ninguna de las especies (Von Wirth, 2006).

La mayoría de las especies de tarántulas del género *Poecilotheria* se comercializan como mascotas. En una intensa búsqueda bibliográfica, 26 informes de mordeduras fueron verificados y rastreados, trece casos de mordeduras se refieren a *P. regalis*, cuatro a *P. fasciata*, dos a *P. pederseni* (actualmente aceptado como *P. vittata*), y un caso para *P. rufilata*, *P. subfusca*, *P. striata* y *P. ornata*. En tres casos el nombre de la especie no se refirió. En todos los casos, las mordeduras se presentaron debido a la incorrecta manipulación de las tarántulas por parte de los coleccionistas. Un total de 13 mordeduras se presentaron en algún dedo, 7 casos en la mano o en el brazo, y en una ocasión en la mejilla, en la pierna y en el hombro; en tres reportes no se referenció el lugar de la mordedura. De este análisis, para todas las mordeduras se reportaron los síntomas, pero no se informó de algún caso de una víctima mortal. Con base en sus síntomas, las víctimas se pueden clasificar en dos clases: las víctimas que presentaron calambres musculares y los que no. Un 42% de las mordeduras no provocaron calambres musculares, presentándose los siguientes síntomas: Inflamación local, eritema y dolor moderado con una severidad promedio de 1.1 (escala 1-3). Otros síntomas presentados son sensaciones como náuseas, sudoración, rodillas rígidas, picazón o ardor en los dedos, el cuello o en los hombros y respiración lenta (una mención cada uno). Después de 1-4 horas de la mordedura (un paciente después de un día) los pacientes ya no presentaron síntoma alguno. Por otra parte, un 58% de las mordeduras provocaron calambres musculares. En este grupo, los síntomas presentados fueron inflamación local, eritema y dolor severo con una severidad media de 2.3 (escala 1-3). Otros síntomas adicionales que se presentaron fueron sensaciones de ardor, calor, fiebre, mialgia similar a la de la gripe, respiración pesada, aumento del ritmo cardíaco y pérdida de la conciencia. Los calambres comenzaron en promedio 10 horas después de la mordedura (rango 0-24 horas, además, dos registros de 6 y 7 días). Terminaron en promedio 7.6 días después de la mordedura (rango 1-14 días, además, en un caso se registró la duración de

hasta 4 semanas). Para contrarrestar estos síntomas las víctimas de las mordeduras tomaron varias medidas que van desde apretar la zona de la mordedura para expulsar el veneno, mantener la parte mordida con hielo o colocarse parches calientes para destruir el veneno; todos fueron poco efectivos. De igual manera algunas víctimas se administraron dosis altas de magnesio y de calcio para reducir los calambres musculares (Fuchs y col., 2014).

Los estudios relacionados con la toxicidad de las especies del género *Poecilotheria* son escasos. En un estudio publicado en el 2002, se observó que, de 55 especies de tarántulas de diferentes regiones, las especies arborícolas de los géneros *Poecilotheria*, *Heteroscodra* y *Stromatopelma* indujeron una muerte en segundos después de la inyección de 0.1 μ L por vía i.c.v. en ratones. Esta observación de mayor toxicidad concuerda con lo reportado para algunas de estas especies. La alta toxicidad podría correlacionarse con la necesidad para paralizar rápidamente a sus presas, ya que las especies arborícolas al enfrentarse a una presa grande en un ambiente aéreo sin el uso de dispositivos de inmovilización como la seda, el efecto paralítico de su veneno debe ser extremadamente rápido (Escoubas y Rash, 2004). En un estudio reciente, nuestro grupo de trabajo realizó un trabajo en el que abarcó ciertos aspectos farmacológicos del veneno de *P. regalis*, en el que reportó la toxicidad en grillos, actividad hialuronidasa, y evaluó su actividad edematogénica y nociceptiva (García y col., 2015).



Figura 13. Imágenes de especies de tarántulas del género *Poecilotheria* (tomadas de Von Wirth, 2006).

3. JUSTIFICACIÓN

Los venenos provenientes de tarántulas están constituidos por mezclas extremadamente complejas de compuestos con efectos biológicos y propiedades estructurales interesantes. La mayor parte de estos compuestos tiene la peculiaridad de actuar con gran eficacia sobre algún blanco celular específico. Es por esto que los venenos de tarántulas son considerados como fuentes importantes de nuevos compuestos bioactivos que podrían ser aprovechados como modelos en el desarrollo de nuevos fármacos, así como de herramientas biotecnológicas. Sin embargo, de la gran cantidad de especies de tarántulas que se conocen hasta el momento, muy pocas han sido estudiadas con el fin de investigar la composición y propiedades de sus venenos. De esos estudios, la mayor parte se han enfocado en el aislamiento y caracterización de las toxinas peptídicas. En contraste, las enzimas contenidas en estos venenos han recibido relativamente poca atención. Las principales enzimas que se han reportado en los venenos de tarántulas son las hialuronidasas. Estas enzimas, por su capacidad de hidrolizar el ácido hialurónico de la matriz extracelular, facilitan la difusión de toxinas en los tejidos de las presas, potenciando de manera indirecta el efecto global del veneno.

Las hialuronidasas han sido empleadas como adyuvantes para incrementar la absorción y distribución de fármacos que son administrados por vía subcutánea. Además, se ha propuesto su uso potencial para otras aplicaciones como la reducción de edema; en cosmetología se ha utilizado con fines estéticos correctivos y en inmunología para el diagnóstico de alergias. Es por esto que algunos grupos de investigación han resaltado la importancia de buscar en la naturaleza nuevas fuentes de hialuronidasas, destacando a los venenos de artrópodos como una fuente potencial de este tipo de enzimas. Por otro lado, el conocer las propiedades estructurales y funcionales de las hialuronidasas provenientes de venenos, podría ser de utilidad para comprender mejor el papel que juegan estas enzimas en el proceso de envenenamiento de las presas.

4. HIPÓTESIS

Los venenos de las especies del género *Poecilotheria* presentan una mezcla de diferentes isoformas de enzimas con actividad de hialuronidasa.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

- Caracterizar las propiedades bioquímicas de hialuronidasas presentes en los venenos de tarántulas del género *Poecilotheria*.

5.2 Objetivos específicos

- Comparar la actividad enzimática de hialuronidasa de los venenos de las especies del género *Poecilotheria* con venenos de otros géneros de tarántulas.
- Identificar el peso molecular relativo de las hialuronidasas presentes en los diferentes venenos estudiados.
- Establecer las condiciones de pH y temperatura óptimos de la actividad de hialuronidasa de los venenos de las especies del género *Poecilotheria*.
- Determinar si los venenos de las especies del género *Poecilotheria* presentan diferentes isoformas de hialuronidasas.
- Identificar de una manera parcial la estructura primaria de algunas hialuronidasas presentes en los venenos del género *Poecilotheria*.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Obtención y mantenimiento de los especímenes

Las diferentes especies de tarántulas estudiadas en este trabajo fueron adquiridas en Tarántulas de México® (SEMARNAT-UMA-IN-0062-JAL) y en la Unidad de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre ARACHNIDA® (DGVS-PIMVS-CR-IN-0977-DV08). Estos ejemplares se mantuvieron individualmente en jaulas de acrílico con fibra de coco molida como sustrato y un recipiente para agua. Las tarántulas se alimentaron semanalmente con grillos (*Acheta domesticus*). En la Tabla 9, se muestran las diferentes especies de tarántulas que fueron estudiadas en este trabajo, sus hábitos de caza y se indica el país en donde se encuentran distribuidas de manera natural.

Tabla 9. Especies de tarántulas estudiadas.

| ESPECIE | DISTRIBUCIÓN | HÁBITOS DE CAZA |
|--------------------------------|---|------------------------|
| <i>Poecilotheria omata</i> | India y Sri. Lanka | Arborícola |
| <i>Poecilotheria vittata</i> | | |
| <i>Poecilotheria regalis</i> | | |
| <i>Poecilotheria rufilata</i> | | |
| <i>Brachypelma boehmei</i> | México | Terrestre |
| <i>Brachypelma smithi</i> | | |
| <i>Brachypelma epicureanum</i> | | |
| <i>Lasiodora klugi</i> | Brasil | Terrestre y arborícola |
| <i>Nhandu chromatus</i> | | Terrestre |
| <i>Grammostola porteri</i> | Chile | Terrestre |
| <i>Ceratogyrus darlingi</i> | Países del sur de África | Terrestre |
| <i>Aphonopelma</i> sp. | Sur de Estados Unidos, Norte de México, países de Centroamérica | Terrestre |

6.2 Extracción del veneno

Los venenos se extrajeron mediante estimulación eléctrica bajo las condiciones previamente reportadas por nuestro grupo de investigación (García y col., 2015). Para ello, la tarántula se anestesió en una atmósfera de isoflurano al 15% en éter etílico. El tiempo de exposición varió de acuerdo al tamaño del ejemplar (10 min. en promedio). Una vez anestesiada, la tarántula se colocó en una cama de esponja adecuada sujeta con ligas de goma. Las puntas de los colmillos se posicionaron en tubos para microcentrífuga de 1.5 mL de capacidad previamente pesados, evitando cualquier tipo de contaminación con la saliva de las tarántulas. Con el apoyo de dos electrodos humedecidos con amortiguador de corrida para electroforesis, se aplicaron varios periodos de estimulación eléctrica entre 12-15 V en los quelíceros. Una vez obtenido el veneno, se pesó el microtubo para determinar el peso del veneno obtenido. Inmediatamente después, se almacenó en un ultracongelador a una temperatura de -70° C. La extracción del veneno para cada tarántula se realizó mensualmente con la finalidad de dar tiempo suficiente para que este se restableciera en las cantidades adecuadas.

6.3 Cuantificación de proteína

El contenido de proteína del veneno de cada extracción se determinó mediante el método colorimétrico de Bradford (1976), preparando una curva de calibración por triplicado con albúmina sérica bovina (Bio-Rad) como estándar. Para la preparación de la muestra, por cada mg de veneno obtenido en la extracción se agregaron 70 μ L de agua grado HPLC.

6.4 Determinación de la actividad de hialuronidasa

La actividad de hialuronidasa se determinó de acuerdo al método turbidimétrico de Di Ferrante (1956) con algunas modificaciones. Para ello, se prepararon soluciones de diferentes concentraciones del veneno (0.0, 1.0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 15.0, 20.0 y 25.0 μ g proteína/mL) disueltas en 150 μ L de amortiguador de acetato (acetato de sodio 0.2 M, pH 6.0, NaCl 0.15 M) y

adicionadas con 100 μ L de sustrato (1 mg de ácido hialurónico de *Streptococcus equi* disuelto en 1 mL de agua destilada); dando un volumen final de reacción de 250 μ L. Posteriormente, estas muestras se incubaron a una temperatura de 37 °C durante 15 minutos. Después de este periodo de incubación, con la finalidad de detener la actividad enzimática, se agregó 1 mL de una solución al 2.5% de hexadecil-trimetil-amonio en NaOH al 2%. La turbidez resultante fue leída a 400 nm en un espectrofotómetro de microplacas (Benchmark Plus, Bio-Rad) después de 30 min de reposo a temperatura ambiente. Como referencia de la actividad de hialuronidasa, se empleó como control positivo la hialuronidasa de testículos bovinos tipo IV-S (Sigma). La actividad enzimática se expresó como la media \pm SEM ($n=3$) en unidades de reducción de turbidez (TRU) por mg de sustrato. Una unidad de actividad corresponde a la cantidad de enzima que reduce en un 50% la turbidez generada por 0.1 mg de sustrato bajo las condiciones descritas anteriormente.

6.5 Determinación de las condiciones óptimas para la actividad de hialuronidasa

Se establecieron las condiciones óptimas de pH y temperatura para los venenos de las cuatro tarántulas del género *Poecilotheria*. El pH se determinó mediante la evaluación de la actividad de hialuronidasa en un rango de 3 a 8. Se emplearon diferentes soluciones amortiguadoras: Para pH 3, citrato de sodio 0.1 M; para los pH 4, 5 y 6 acetato de sodio 0.2 M; para pH 7 y 8 Tris-HCl 0.1 M (todas estas soluciones con 0.15 M de NaCl). Para la determinación de temperatura óptima, la actividad enzimática se evaluó modificando la temperatura de incubación (a un pH de 6). Las diferentes temperaturas evaluadas fueron 20, 30, 37, 50, 60 y 70 °C.

6.6 Electroforesis en gel de poliacrilamida Tricina-SDS-PAGE

Con la finalidad de obtener un perfil electroforético que permitiera observar una buena resolución de la zona de bajo peso molecular, se corrieron las muestras en geles de electroforesis de tricina-SDS-PAGE, siguiendo la

metodología establecida en el protocolo de Schagger (2006). Para ello, 15 µg de cada veneno diluidos 1:1 con amortiguador de muestra bajo condiciones no reductoras, fue colocada en geles constituidos en tres partes: un gel concentrador al 4% de poliacrilamida, un gel resolovedor al 16% de poliacrilamida con 6 M de urea, y un gel espaciador al 10% de poliacrilamida entre estos dos. Los geles se corrieron empleando como amortiguador de ánodo Tris-HCl 0.1 M, pH 8.8 y como amortiguador de cátodo Tricina 0.1 M/ Tris-HCl 0.1 M. Las muestras se corrieron a 30 V hasta que esta saliera del gel concentrador, posteriormente a 90 V hasta terminar la corrida; todo a una temperatura de 4 C. Como referencia de peso molecular, se empleó un marcador de amplio rango de peso molecular preteñido (Bio-Rad, Cat #161-0377). Las bandas en los geles se visualizaron mediante la tinción de Coomassie, empleando azul de Coomassie G-250 (Bio-Rad, Cat #161-0787).

6.7 Zimografía en una dimensión

Con la finalidad de determinar el peso molecular relativo de las hialuronidasas de los diferentes venenos de tarántulas se empleó la técnica de zimografía (Kupai y col., 2010) basada en las condiciones previamente reportadas por da Silveira y col. (2007), con algunas modificaciones. Se prepararon geles convencionales de poliacrilamida SDS-PAGE al 14% (Laemmli, 1970) con ácido hialurónico incorporado a una concentración final de 340 µg/mL. Los venenos (10 µg de proteína para el veneno de *C. darlingi* y 5 µg de proteína para el resto de los venenos) se diluyeron en el amortiguador de muestra en razón 1:1, bajo condiciones no reductoras y se corrieron a 120 V a una temperatura de 4 C. Posteriormente, los geles se lavaron dos veces con solución al 2.5% de Tritón X-100 durante 30 min para remover el SDS; se realizaron dos lavados con agua destilada por 15 min para remover el excedente de Tritón y finalmente se incubaron a 37 C en una solución de Tris-HCl 50 mM (pH 6) durante 7 horas. Al finalizar el proceso de incubación, los geles se tiñeron durante 3 h con una solución al 0.5% del colorante azul alcan en etanol al 30% y ácido acético al 10%. Las zonas claras resultantes indicaron la actividad enzimática de

hialuronidasa. Como control positivo se empleó la hialuronidasa de testículos bovinos tipo IV-S en una cantidad de 40 µg y como control negativo se utilizaron 40 µg de albúmina sérica bovina. Para referencia del peso molecular, se utilizó un marcador preteñido de amplio rango (Bio-Rad, Cat #161–0318).

6.8 Electroforesis bidimensional

Para obtener el perfil proteico bidimensional de los venenos de las cuatro especies del género *Poecilotheria* se emplearon tiras IPG de 7 cm con un rango lineal de pH de 3-10 (Bio-Rad, Cat #163-2001). Se disolvieron 85 µg de proteína de cada veneno, previamente liofilizado, en 125 µL de amortiguador de rehidratación bajo condiciones no reductoras (urea 8 M, CHAPS 2%, anfolitos 3/10 0.5%). Posteriormente, las muestras de cada veneno se aplicaron en las tiras IPG y se colocaron en la cámara de isoelectroenfoque (Protean i12 IEF system). Para la etapa de rehidratación de las tiras, el equipo se programó a 12 h a una corriente constante de 50 V. Terminada esta etapa, el isoelectroenfoque se llevó acabo empleando el siguiente programa de corrida:

| Etapa | Voltaje | Gradiente | Corriente (mA) | Tiempo | Unidades |
|----------|-------------|------------------|----------------|--------------|----------------|
| 1 | 250 | Lineal | 50 | 0:20 | HH:MM |
| 2 | 4000 | Lineal | 50 | 2:00 | HH:MM |
| 3 | 4000 | Rápido | 50 | 10000 | Volt hr |
| 4 | 500 | Sostenido | 50 | | |

Después de la etapa de isoelectroenfoque, las tiras IPG se lavaron durante 20 min con amortiguador de equilibrio (urea 6 M, SDS 2%, Tris-HCl 75 mM pH 8.8, glicerol 30%). Para la etapa de la segunda dimensión, las tiras se colocaron en geles de poliacrilamida al 14% (Laemmli, 1970) y se corrieron a 150 V y a una temperatura de 4°C. Los geles resultantes se lavaron dos veces con agua destilada durante 15 min y se tiñeron con azul de Coomassie G-250 (Bio-Rad, Cat #161-0787).

6.9 Zimografía en dos dimensiones

Para determinar si los venenos de las cuatro especies del género *Poecilotheria* presentan diferentes isoformas de hialuronidasas, se realizó la zimografía en dos dimensiones. Para esto, se emplearon muestras 85 µg de proteína de cada veneno, previamente liofilizado, y se llevaron a cabo los procesos de rehidratación y de isoelectroenfoque bajo las mismas condiciones descritas en el punto anterior. Al término del proceso de isoelectroenfoque las tiras IPG fueron lavadas durante 20 min en amortiguador de equilibrio bajo condiciones no reductoras (SDS 2%, Tris-HCl 75 mM pH 8.8, glicerol 30%). Para la etapa de la segunda dimensión, las tiras se colocaron en geles de poliacrilamida al 14% (Laemmli, 1970) con ácido hialurónico incorporado, a una concentración final de 340 µg/mL, y se corrieron a 150 V a una temperatura de 4°C. Después de la electroforesis, los geles se lavaron dos veces con solución al 2.5% de Tritón X-100 durante 30 min para remover el SDS. Posteriormente, se realizaron dos lavados con agua destilada por 15 min para remover el excedente de Tritón y finalmente se incubaron a 37 °C en una solución de Tris-HCl 50 mM (pH 6) durante 15 min. Después de este proceso, estos geles se tiñeron de la misma manera que en la zimografía en una dimensión. Las zonas claras resultantes indicaron la actividad enzimática de hialuronidasa.

6.10 Purificación y secuenciación parcial de las hialuronidasas

Por cantidad de muestra, este procedimiento se realizó únicamente con el veneno de *P. vittata*. Se tomaron 1,100 µg de proteína del veneno liofilizado y se disolvieron en 4.9 mL de agua grado HPLC. Esta solución se fraccionó con filtros Amicon® de 0.5 mL con un punto de corte de 30 kDa bajo las condiciones recomendadas para estos filtros (11,000 xg durante 15 min a 4 °C). Para evitar la saturación de la membrana, al finalizar el primer filtrado se agregaron 450 µL de agua para remover el contenido del filtro, este proceso se repitió tres veces más. Para recuperar la fracción que contenía los componentes mayores de 30 kDa, se agregaron 300 µL de agua al tubo donde se encuentra la membrana y se centrifugó a 1,000 xg durante 5 min a 4°C. La fracción de alto peso molecular

obtenida se liofilizó y se cuantificó la concentración de proteína para determinar el rendimiento. Esta fracción se sometió a un proceso de separación mediante electroforesis bidimensional siguiendo la metodología previamente descrita. Se realizó una tinción de Coomassie para visualizar las proteínas y se cortaron los puntos proteicos más prominentes que correspondían a la zona en donde se encuentran las hialuronidasas.

Los puntos seleccionados se analizaron mediante Cromatografía de Líquidos acoplado a Espectrometría de Masas (CL-EM). Para ello, las muestras fueron previamente reducidas con ditioneitol (DTT) (Sigma-Aldrich) y alquiladas con iodoacetamida (Sigma-Aldrich). Posteriormente se digirieron con tripsina (Promega Sequencing Grade Modified Trypsin; Madison, WI, USA). En el procesamiento de la muestra con tripsina, se utilizó una solución de reacción conteniendo 50 mM bicarbonato de amonio (pH 8.2). El proceso de incubación fue de 18 horas a 37 °C. Así también, cada muestra fue digerida con la proteasa del ácido glutámico (Glu-C), grado secuenciación (Roche, No. catálogo 11047817001). Los péptidos obtenidos por clivaje enzimático fueron desalados con Zip Tip C18 (Millipore; Billerica, MA, USA) y aplicados en un sistema LC-EM, compuesto de una bomba de nanoflujo EASY-nLC II (Thermo-Fisher Co.; San Jose, CA, USA) acoplado a un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap Velos (Thermo-Fisher Co., San Jose, CA, USA) con fuente de ionización tipo nano-electrospray (ESI). En la cromatografía de líquidos de nanoflujo en línea se utilizó un sistema gradiente de 10-80% de solvente B (agua/acetonitrilo con 0.1% de ácido fórmico) en 120 min utilizando una columna capilar hecha (ID 0.75 µm y 10 cm largo RP-C18). El flujo del sistema fue de 300 nanolitros/minuto. La fragmentación de los péptidos se realizó aplicando los métodos de CID (Collision-Induced Dissociation) y HCD (High-energy Collision Dissociation). Todos los espectros fueron adquiridos en modo de detección positivo.

La ejecución y captura de los datos de fragmentación fueron realizados de forma dependiente del escaneo total de iones, según las cargas pre-determinadas con un ancho de aislamiento de 3.0 (m/z), energía de colisión normalizada de 35 unidades arbitrarias, activación Q de 0.250, tiempo de

activación de 10 milisegundos y tiempo máximo de inyección de 10 milisegundos por micro-escaneo. Durante la captura automática de los datos se utilizó la exclusión dinámica de iones: (i) lista de exclusión de 400 iones, (ii) tiempo de pre-exclusión de 30 segundos y (iii) tiempo de exclusión de 300 segundos. Los datos fueron sometidos a búsqueda a través el software Proteome Discoverer 1.4 (Thermo Scientific).

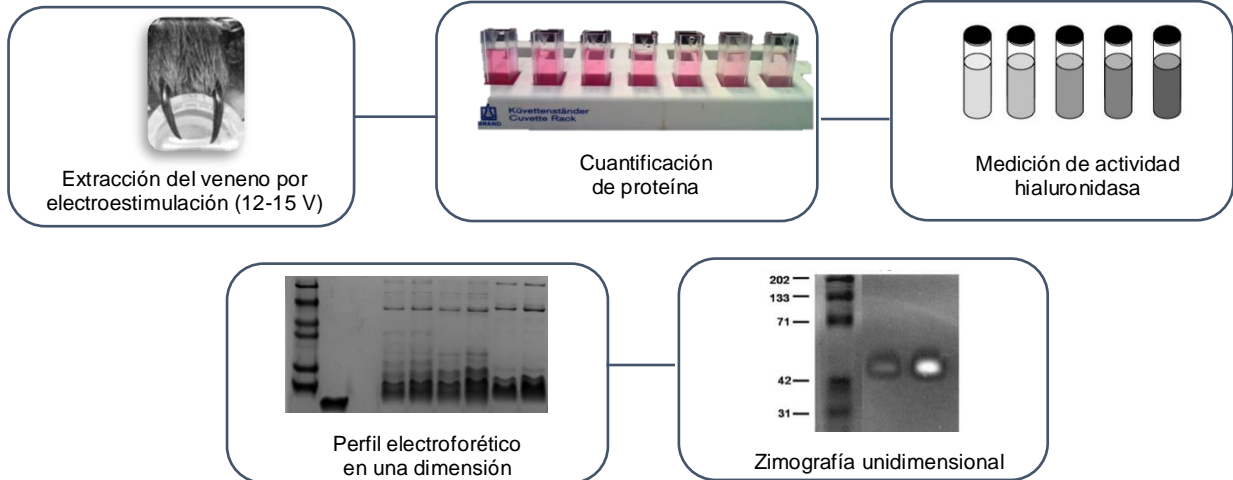
6.11 Adquisición de imágenes y análisis estadísticos

Todas las imágenes de los geles de electroforesis y zimogramas fueron tomadas con un sistema para captura de imágenes “ChemiDoc MP” asistido por el software “Imagelab” de Bio-Rad.

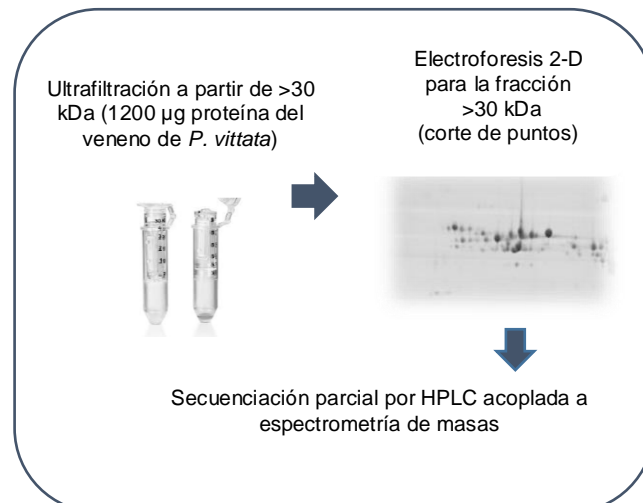
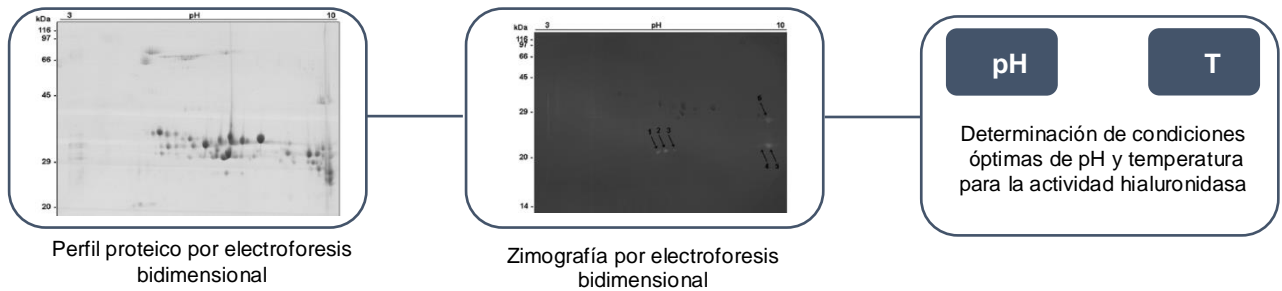
Todos los resultados se expresaron como la media \pm el error estándar de la media (SEM) de tres repeticiones ($n=3$). Los valores de actividad enzimática se estimaron mediante el programa estadístico “Prism 5.0” utilizando un ajuste no lineal. Las comparaciones múltiples se realizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido por un análisis de Tukey ($p<0.05$).

7. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para los venenos de las 12 especies de diferentes géneros:



Para los venenos de las tarántulas del género *Poecilotheria*:



8. RESULTADOS

8.1 Determinación de la actividad de hialuronidasa

Mediante la determinación de la actividad de hialuronidasa de los venenos se encontró que todos ellos presentan mayor actividad que la hialuronidasa de testículos bovinos empleada como control positivo, con excepción del veneno de *B. boehmei* (ver Tabla 10). El veneno de *P. ornata* fue el que presentó mayor actividad enzimática, con un valor de 27.560 ± 0.9073 ($n=3$). En el caso particular del veneno de *G. porteri*, no se encontró actividad de hialuronidasa bajo las concentraciones y condiciones empleadas en este trabajo. Poniendo atención en los venenos de las tarántulas del género *Poecilotheria*, seguido de *P. ornata*, el veneno de *P. rufilata* presentó mayor actividad enzimática, mientras que los venenos de *P. regalis* y *P. vittata* mostraron estadísticamente la misma actividad enzimática.

Tabla 10. Resultados de actividad hialuronidasa.

| Especie | Actividad hialuronidasa (TRU/mg) $n=3$ | Especie | Actividad hialuronidasa (TRU/mg) $n=3$ |
|-----------------------|--|------------------------|--|
| <i>P. regalis</i> | 73.920 ± 1.3710^c | <i>B. boehmei</i> | 199.500 ± 1.5420^f |
| <i>P. ornata</i> | 27.560 ± 0.9073^a | <i>G. porteri</i> | N/D |
| <i>P. vittata</i> | 75.170 ± 1.6660^c | <i>L. klugi</i> | 73.210 ± 1.6720^c |
| <i>P. rufilata</i> | 50.150 ± 1.3620^b | <i>C. darlingi</i> | $99.700 \pm 1.9000^{*,d}$ |
| <i>B. smithi</i> | 50.200 ± 1.4580^b | <i>N. chromatus</i> | 48.900 ± 0.6608^b |
| <i>B. epicureanum</i> | $99.600 \pm 1.9000^{*,d}$ | <i>Aphonopelma</i> sp. | 75.510 ± 3.2990^c |
| Control | 149.100 ± 1.5370^e | | |

Letras diferentes indican diferencia estadísticamente significativa (ANOVA de una vía seguido de Tukey, $p<0.05$). N/D = No determinada
 *Valores tomados del artículo publicado por nuestro grupo de investigación (García y col., 2015).

8.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida (Tricina-SDS-PAGE)

Con la finalidad de analizar la complejidad de los venenos y como apoyo en la determinación del peso molecular relativo de sus hialuronidasas, se obtuvieron sus perfiles electroforéticos. En la Figura 14 se muestran los perfiles proteicos de los 12 venenos. Se puede apreciar que, de manera general, los venenos presentan riqueza proteica en dos zonas de peso molecular: una zona que se encuentra en el rango de peso entre 6 a 15 kDa y la otra alrededor de 38 a 100 kDa. Particularmente se observa que para todos los venenos se encuentra una banda proteica muy prominente alrededor de 40 kDa (área marcada en la Figura 14), con excepción del veneno de *C. darlingi*.

8.3 Zimografía en una dimensión

Al estandarizar los parámetros adecuados para realizar la zimografía en una dimensión para estos venenos, se logró detectar la actividad de hialuronidasa. En la Figura 15, se aprecian los zimogramas obtenidos de ambos controles (positivo y negativo) y de los venenos. La actividad de hialuronidasa de los venenos se observa con halos de actividad enzimática que abarcan una zona de peso molecular entre 33 y 41 kDa. En esta figura, se indica el peso molecular relativo obtenido del valor medio de la zona de actividad para cada veneno. A diferencia del resto de los venenos, el veneno de *N. chromatus* mostró actividad enzimática de también en la zona de 60 kDa. Estos resultados indican, que la banda muy marcada alrededor de 40 kDa, observada en los perfiles electroforéticos de cada veneno (Figura 14), se encuentra presente una o más enzimas con actividad de hialuronidasa.

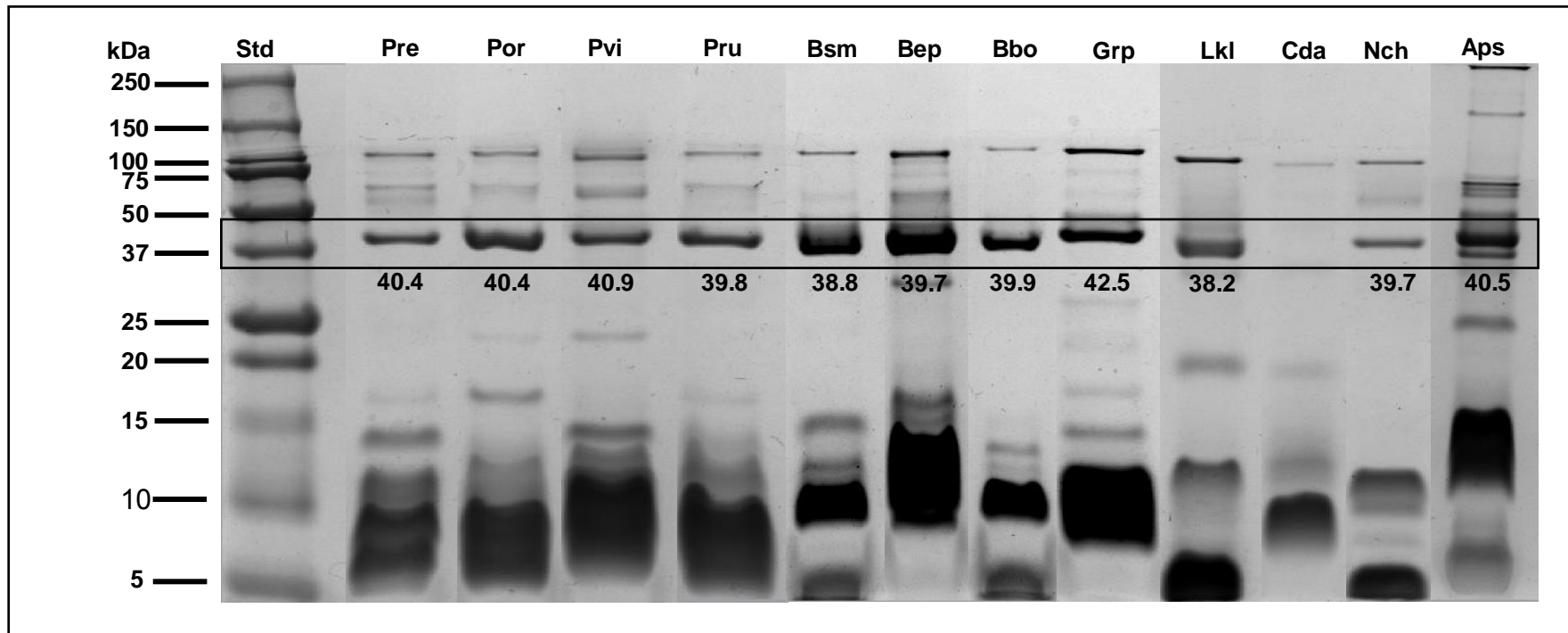


Figura 14. Perfiles electroforéticos en una dimensión de los venenos. Geles de electroforesis mixtos de 10 y 14% de poliacrilamida teñidos con azul de Coomassie. Std (marcador de peso molecular). Venenos de *P. regalis* (Pre), *P. ornata* (Por), *P. rufilata* (Pru), *P. vittata* (Pvi), *B. smithi* (Bsm), *B. epicureanum* (Bep), *B. boehmei* (Bbo), *G. porteri* (Gpo), *L. klugi* (Lkl), *C. darlingi* (Cda), *N. chromatus* (Nch), *Aphonopelma* sp (Aps).

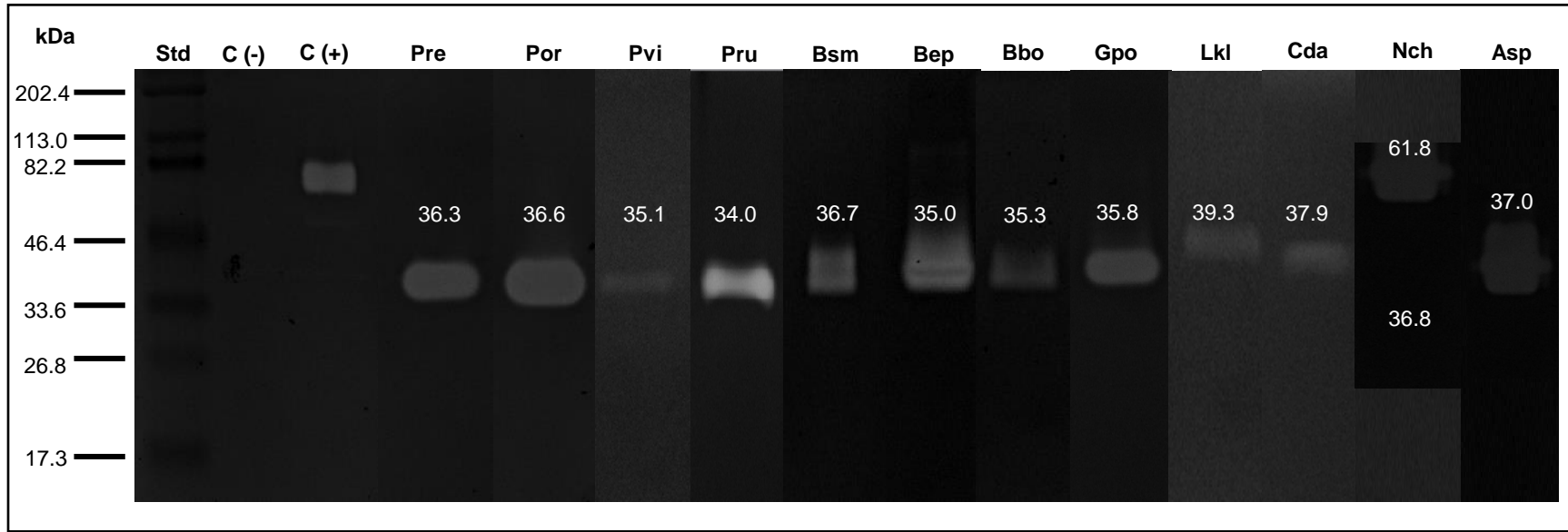


Figura 15. Zimogramas en una dimensión para la actividad hialuronidasa de los venenos. Geles de electroforesis al 14% de poliacrilamida adicionados con ácido hialurónico. Std (marcador de peso molecular), albúmina de suero bovino (C -), hialuronidasa de testículos bovinos tipo IV-S (C+). Venenos de *P. regalis* (Pre), *P. ornata* (Por), *P. rufilata* (Pru), *P. vittata* (Pvi), *B. smithi* (Bsm), *B. epicureanum* (Bep), *B. boehmei* (Bbo), *G.porteri* (Gpo), *L. klugi* (Lkl), *C. darlingi* (Cda), *N. chromatatus* (Nch), *Aphonopelma* sp. (Aps).

8.4 Determinación de condiciones óptimas para la actividad de hialuronidasa

Se determinaron las condiciones óptimas de pH y temperatura de la actividad de hialuronidasa para los venenos de las especies del género *Poecilotheria*. En cuanto a la temperatura óptima, el veneno de *P. ornata* mostró mayor actividad al incubarse a 37°C, los venenos de *P. regalis* y *P. vittata* a 50 °C; el veneno de *P. rufilata* se encontró una actividad enzimática estable a un rango de temperaturas evaluadas; desde 30 a 70°C (Figura 16).

En cuanto al pH óptimo, los cuatro venenos mostraron tener mayor actividad enzimática en los valores de 3, 4 y 5, sin mostrar diferencia significativa entre los valores obtenidos en este rango de pH. A partir de un valor de pH de 6 la actividad disminuyó considerablemente, de tal forma que a un pH de 8 la actividad fue nula (Figura 17). Los valores de TRU/mg obtenidos para estas gráficas se muestran como material adicional en los anexos.

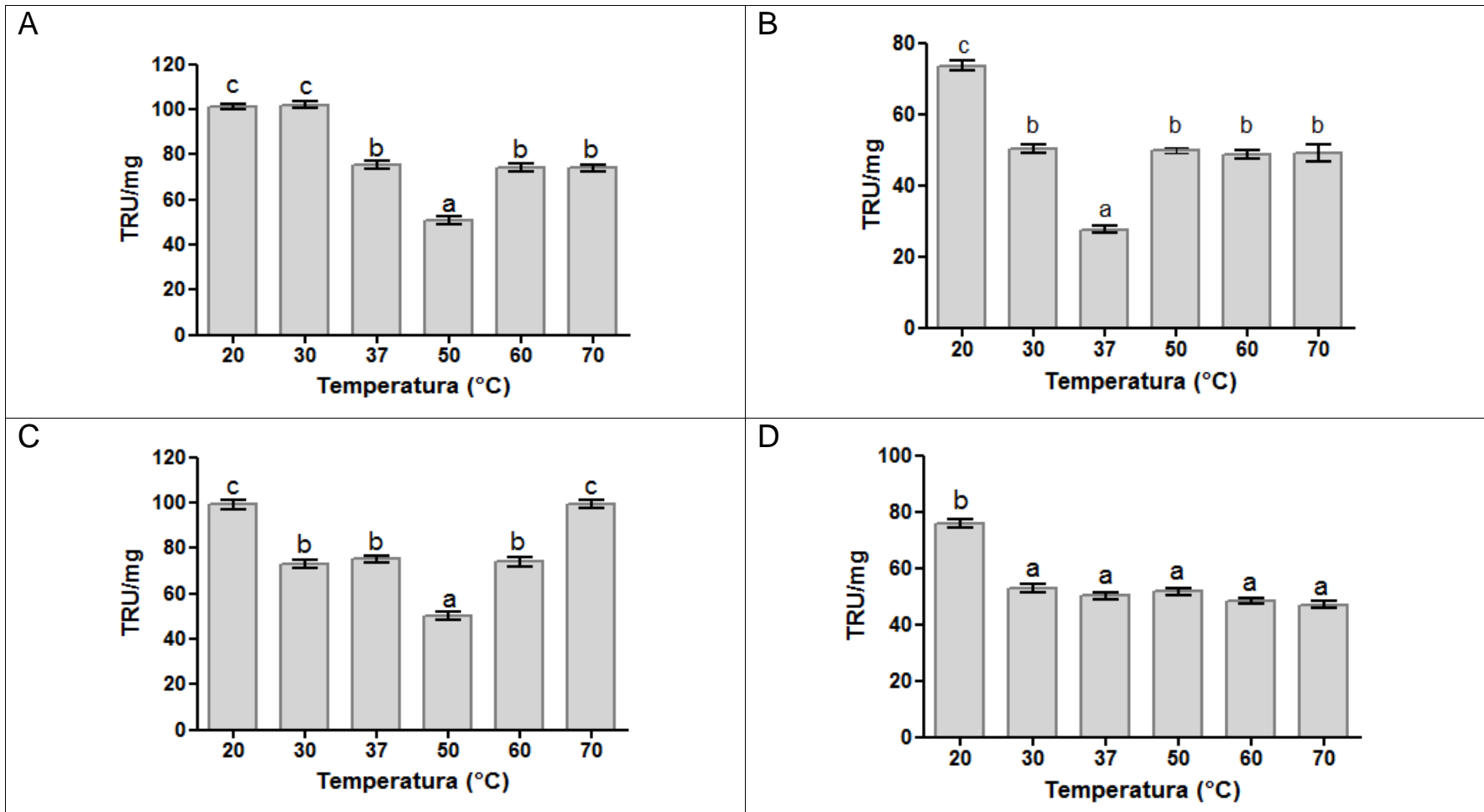


Figura 16. Gráficas del comportamiento de la actividad hialuronidasa evaluada a diferentes temperaturas (pH 6) para los venenos de tarántulas del género *Poecilotheria*. A. *P. regalis*, B. *P. ornata*, C. *P. rufilata*, D. *P. vittata*. Letras diferentes indican diferencia estadísticamente significativa (ANOVA de una vía seguido de Tukey, $p < 0.05$).

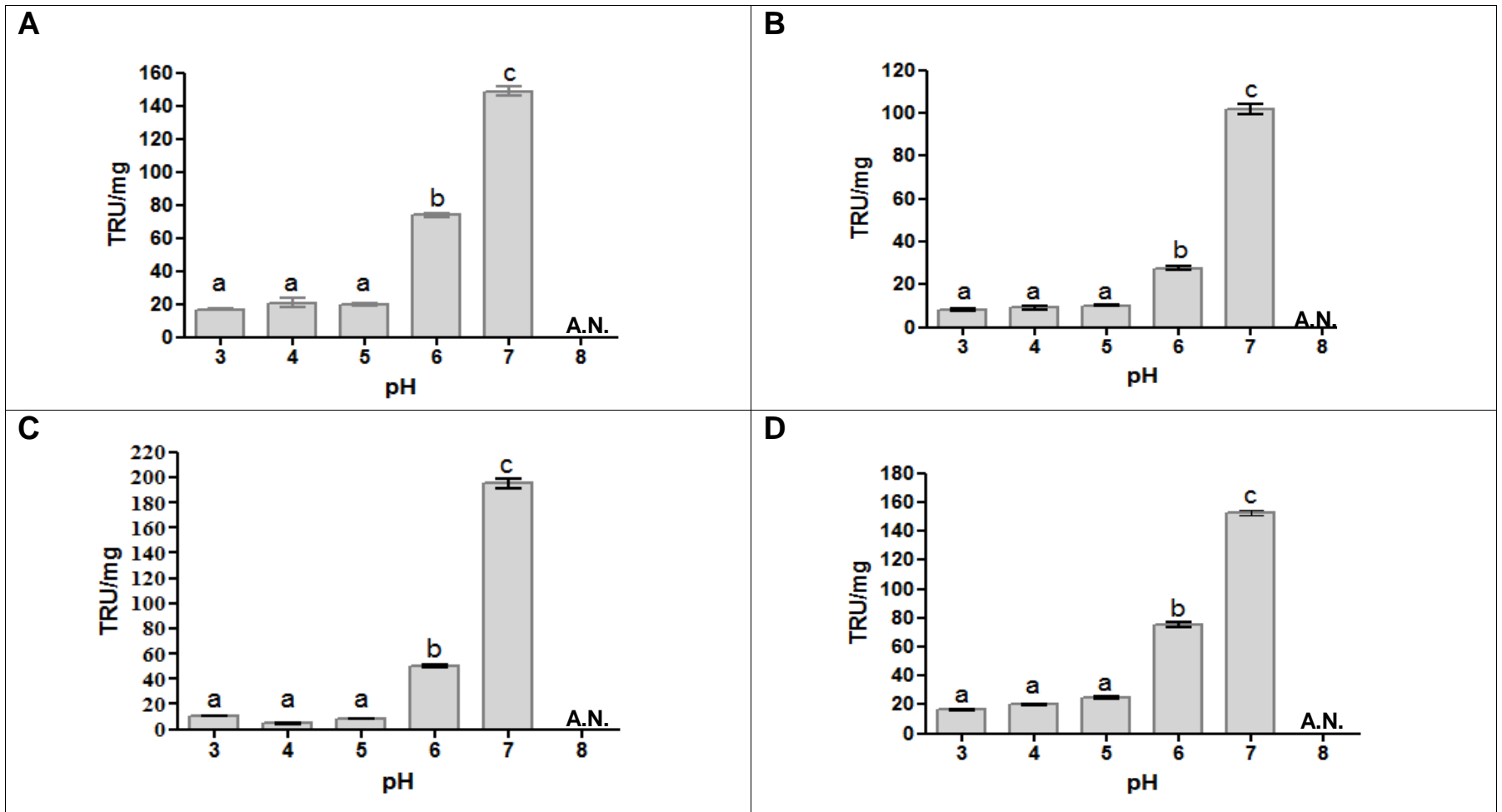


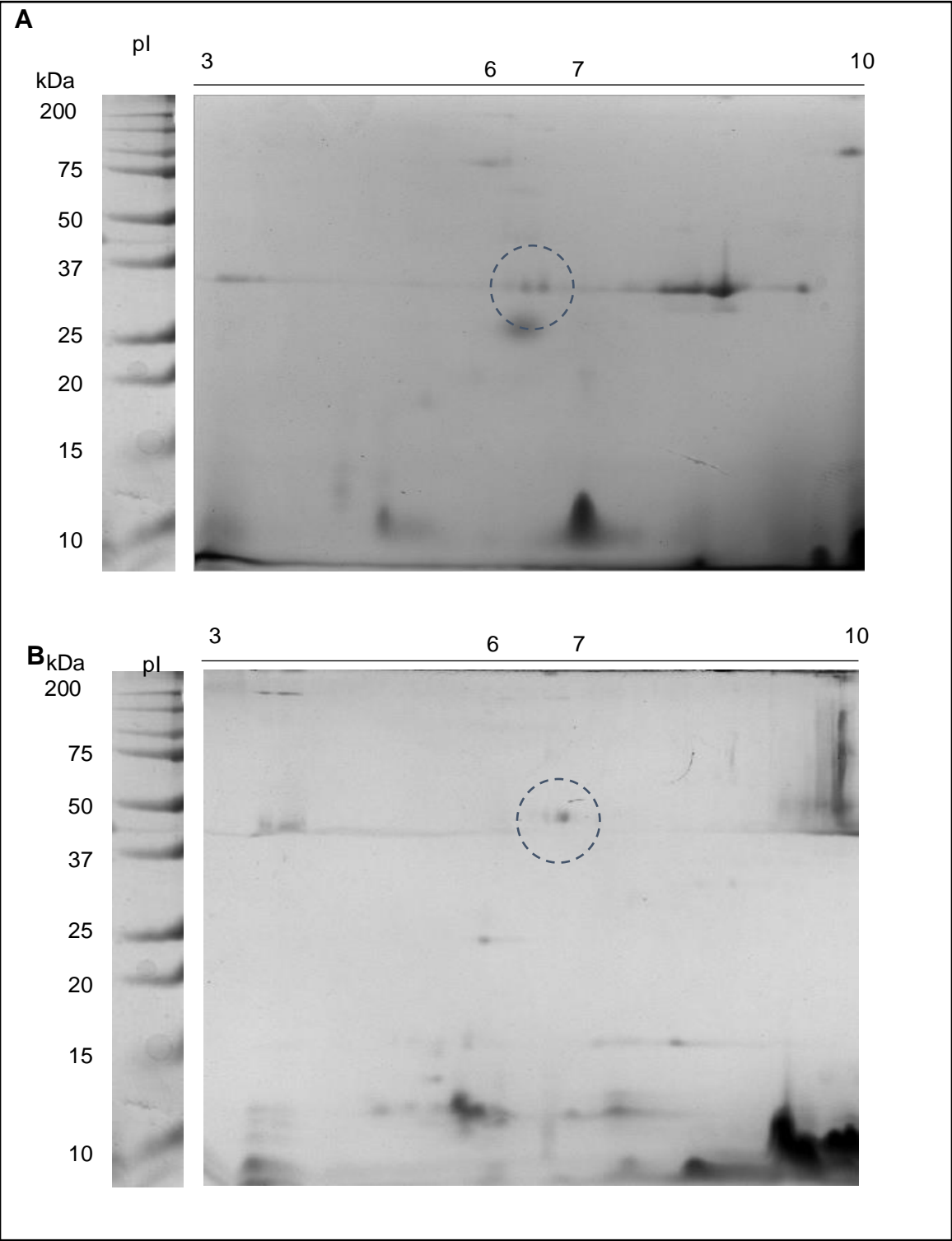
Figura 17. Gráficas del comportamiento de la actividad hialuronidasa evaluada a diferentes valores de pH (37 °C) para los venenos de tarántulas del género *Poecilotheria*. A. *P. regalis*, B. *P. ornata*, C. *P. rufilata*, D. *P. vittata*. A.N.: Actividad nula. Letras diferentes indican diferencia estadísticamente significativa (ANOVA de una vía seguido de Tukey, $p < 0.05$).

8.5 Electroforesis bidimensional

Se obtuvieron los perfiles de electroforesis bidimensional de los venenos de las especies del género *Poecilotheria*, con la finalidad de analizar a profundidad el grado de complejidad de los venenos. Como se esperaba, los cuatro venenos presentaron una riqueza peptídica importante. En la zona de alrededor 40 kDa, destacó la presencia de manchas con un punto isoeléctrico en un rango de 6 a 7 (Figura 18). Los hallazgos obtenidos hasta esta etapa sugirieron la existencia de al menos dos isoformas de hialuronidasas altamente conservadas entre los venenos de tarántulas del género *Poecilotheria*.

8.6 Zimogramas obtenidos por electroforesis bidimensional para la actividad hialuronidasa de los venenos de tarántulas del género *Poecilotheria*

Al estandarizar las condiciones adecuadas para realizar la zimografía bidimensional, con los geles resultantes se comprobó la existencia de varias isoformas de hialuronidasas en los venenos de las cuatro especies de tarántulas del género *Poecilotheria*, con un peso molecular relativo de 40 kDa y con pI entre 6 y 8 (Figura 19).



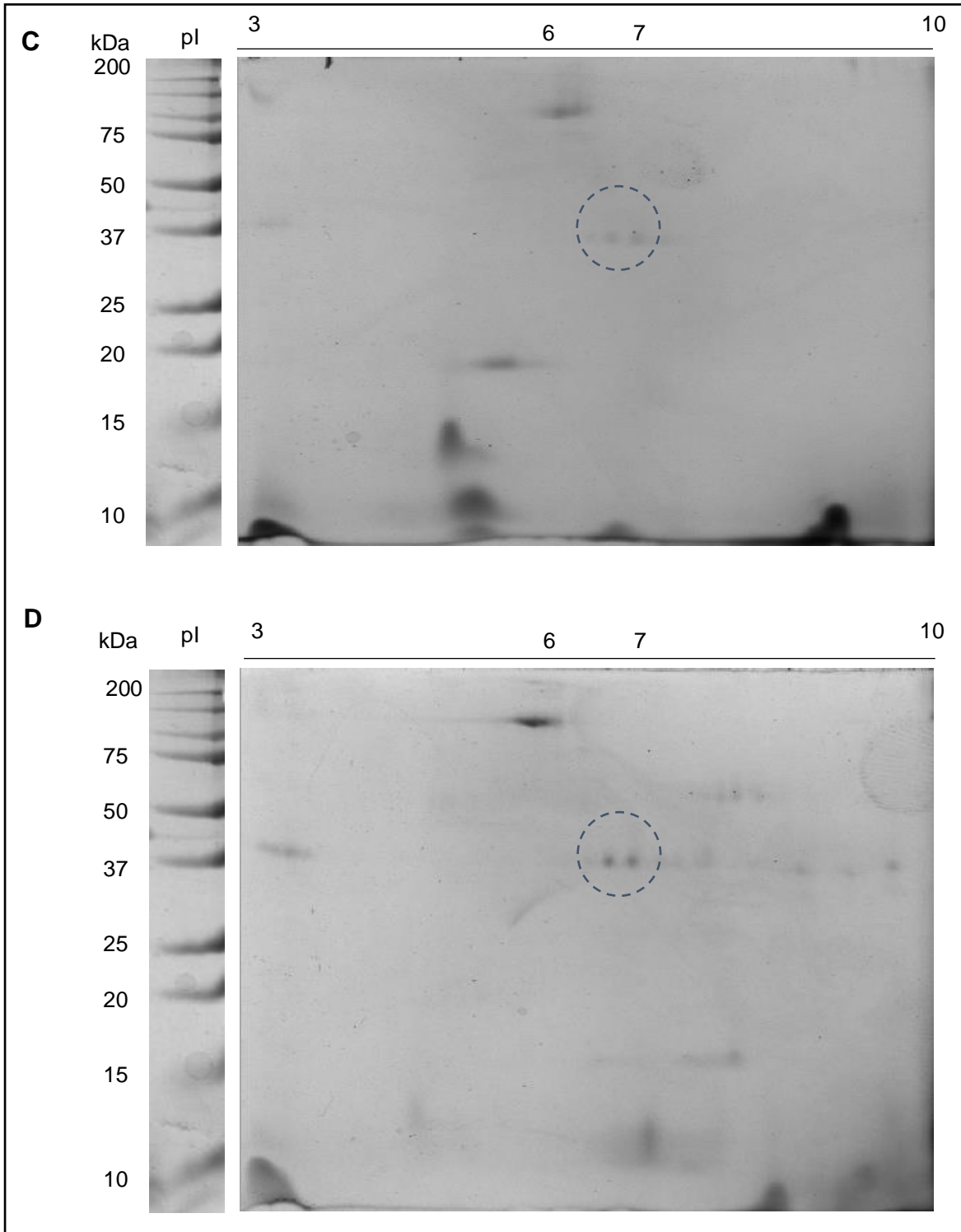
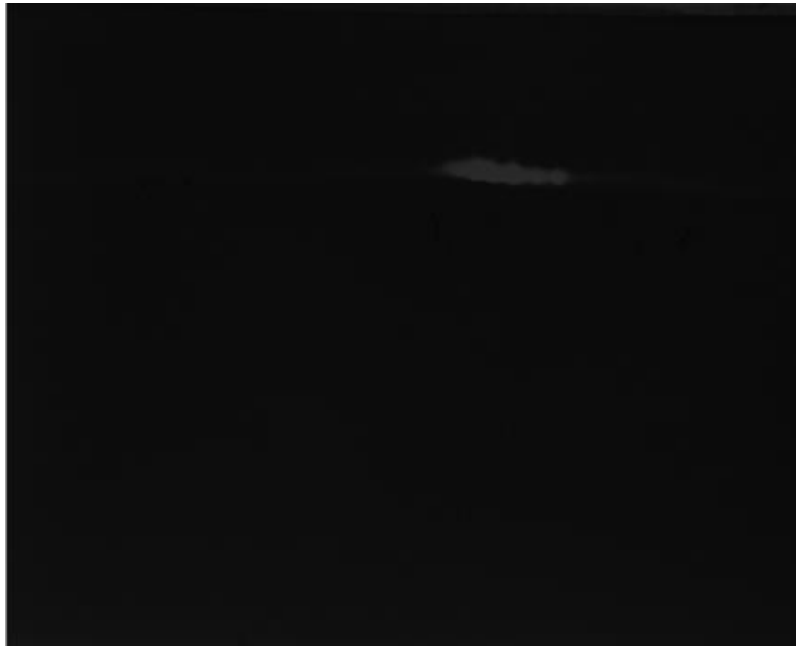
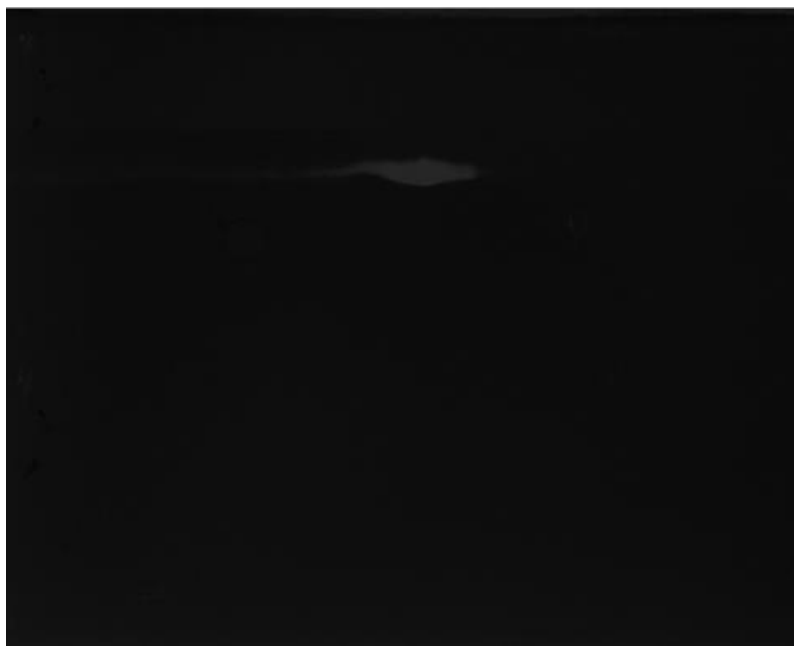


Figura 18. Perfil de electroforesis bidimensional para los venenos de las tarántulas del género *Poecilotheria*. **A.** *P. regalis*, **B.** *P. ornata*, **C.** *P. rufilata* y **D.** *P. vittata*.

A pl 3 6 7 8 10



B pl 3 6 7 8 10



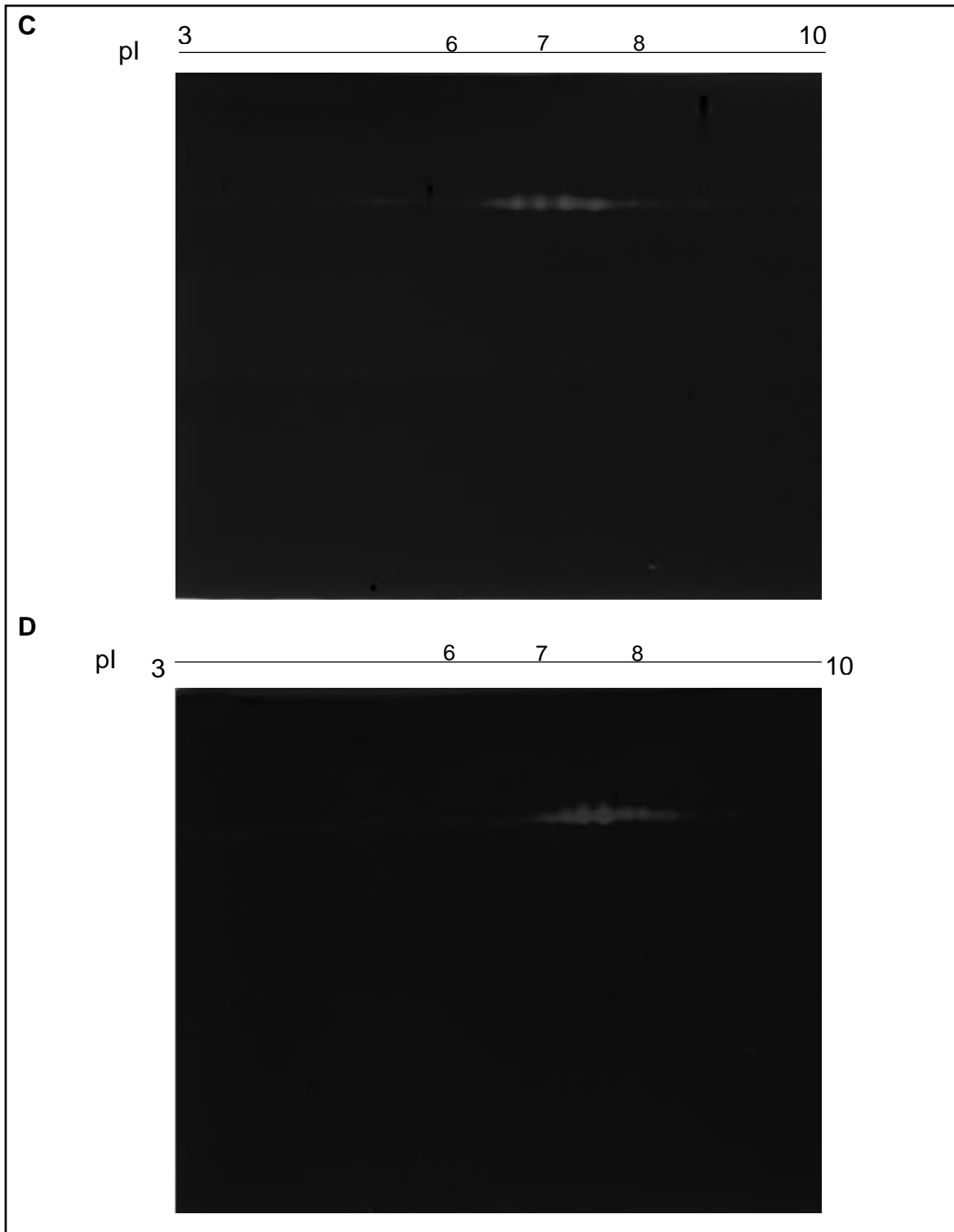


Figura 19. Zimogramas bidimensionales obtenidos para la actividad hialuronidasa de los venenos de tarántulas del género *Poecilotheria*. **A.** *P. regalis*, **B.** *P. ornata*, **C.** *P. rufilata* y **D.** *P. vittata*.

8.7 Purificación y secuenciación parcial de hialuronidasas

La efectividad del fraccionamiento mediante filtración en membranas con punto de corte de 30 kDa se verificó mediante electroforesis unidimensional (imagen pequeña de la Figura 20). Se observó que, efectivamente, la presencia de péptidos en la fracción de alto peso molecular disminuyó de manera considerable. Esta fracción se sometió a un análisis por electroforesis bidimensional. En la zona donde se detectó la presencia de hialuronidasas, en base a los resultados anteriores, se observaron varios puntos proteicos con un valor de punto isoeléctrico entre 6 y 8; se seleccionaron los dos más prominentes (señalados como A y B en la Figura 20). Cabe mencionar que en este gel se observaron compuestos menores de 30 kDa, por lo que el empleo de los filtros no garantiza una óptima separación. Estas dos muestras se analizaron por cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas con la finalidad de determinar su secuencia parcial.

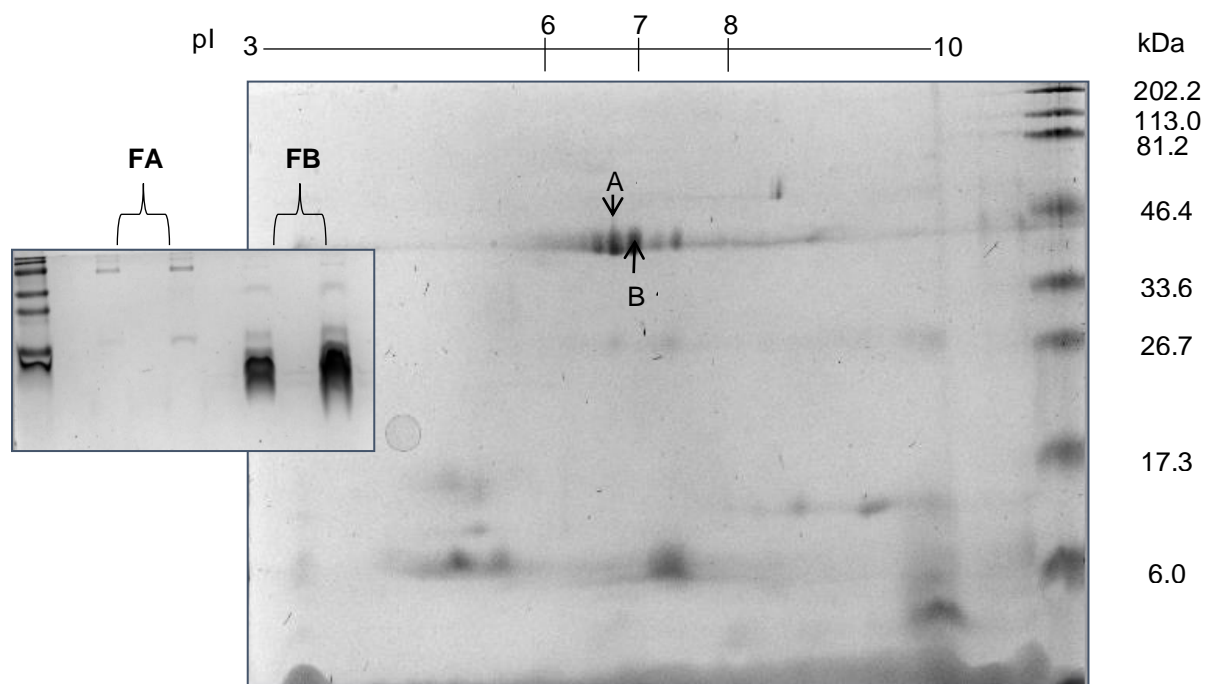


Figura. 20. Gel de electroforesis bidimensional de la fracción de alto peso molecular (110 μ g de proteína) obtenida por centrifugación en membranas con punto de corte de 30 kDa del veneno de *P. vittata*. La efectividad del fraccionamiento por filtración con membranas se verificó mediante electroforesis

en una dimensión. FA = fracción de alto peso molecular, FB = fracción de bajo peso molecular.

En las Figuras 21 y 22 se muestran respectivamente los resultados de la secuencia parcial de las muestras A y B obtenidas de la electroforesis bidimensional de la fracción de alto peso molecular del veneno de *P. vittata*. En cada una de estas figuras, se muestra en la parte inferior la secuenciación de *novo* de los fragmentos obtenidos en la digestión enzimática de cada muestra. Al lado de cada secuencia se observa la identidad que presentó cada fragmento con las secuencias de otras proteínas mediante un análisis en BLAST. En ambos casos, se indica que la mayoría de las secuencias obtenidas presentaron similitud con secuencias de una hialuronidasa de *Brachypelma vagans* previamente secuenciada. En la parte superior de las figuras se muestra un análisis con el programa Proteome Discoverer 1.4 que muestra la secuencia de la hialuronidasa del veneno de *B. vagans*, sombreando en verde las partes de la secuencia con las que los fragmentos de la muestra presentan identidad. Estos resultados, confirman que cada veneno presenta diferentes isoformas de hialuronidasas.

- **Identificación parcial de la proteína a través del programa Proteome Discoverer 1.4**

Hialuronidasa, parcial *Brachypelma vagans*

KDPQVFVAVR **NVPTIQCR**KT YGMDFVPLLK SYGILVNSEDE EFKGEVNTIF YEGQLGLYPH
 LDQSGQRVNG GIPQLGDLPE HLKKAREDIN KAIPDVNFNG LGIIDWESWR PVWNFNWGAL
 KKYQDESFEE ALKQHPGRTN DSLWQLAQQE WETSAKNFML ETLRLAQTMR PNSLWCYYLF
 PDCYNYNGQT PQEFRCPSIV VTGNNQLSWL WHESK**AVCPS** **LYVADGYLQK** YTFEQRWYV
 DGRLKEALRV APNSQLYPYV GYGYGVTPGA MVEDDFWRI LAQVASAGSS GTVIWGASAT
 LRSRDNCQLL QQYVKDILGP SVKTVKENAE RCAKTVCNGK GR**CTWPNDPN** **VVAWR**VYLDR
 NKHPFQRSEI TCHCVEGYSG RYCDVKSGIT NQTKRVSFKL SELYTYLRRL LDN

| Acceso | Descripción | Score | Cobertura | # Péptidos |
|-----------|---|--------------------|-----------|------------|
| 406065863 | hialuronidasa, parcial (<i>Brachypelma vagans</i>) | 494.23 | 8.95 | 7 |
| MW (kDa) | Secuencia | Modificaciones | Carga | MH+ [Da] |
| 47.5 | AVCPSLYVADGYLQK | C3(Carbamidometil) | 2 | 1683.83525 |
| | WNVPTIQCR | C8(Carbamidometil) | 2 | 1173.57903 |
| | CTWPNDPNVVAWR | C1(Carbamidometil) | 2 | 1614.74285 |

- **Secuenciación manual de novo**

| Íón (m/z) | Secuencia | Homología |
|-----------|-----------------------------|-----------------------------------|
| 574.80 | EDPTVFSVR | Sin homología |
| 587.29 | VPTLQCR | Hialuronidasa-Pk1a |
| | VPTLQCR (BLAST) | (<i>Phoneutria keyserlingi</i>) |
| 681.35 | VWNFNWGTLK | Parcial de hialuronidasa |
| | VWNFNWGALK (BLAST) | (<i>Brachypelma vagans</i>) |
| 753.92 | DDDLLGPSVVTVK | Sin homología |
| 927.39 | LTSYGILVNNGDEFK | Parcial de hialuronidasa |
| | LKSYGILVNSEDEFK (BLAST) | (<i>Brachypelma vagans</i>) |
| 960.47 | YLETQLAQNMR | Parcial de hialuronidasa |
| | YLETQLRLAQTMR (BLAST) | (<i>Brachypelma vagans</i>) |
| 1097.09 | QTASAGSSGTVIWGASATLK | Parcial de hialuronidasa |
| | QVASAGSSGTVIWGASATL (BLAST) | (<i>Brachypelma vagans</i>) |
| 1132.52 | GLTPQMELANYGNR | Sin homología |
| 1390.68 | VPLLSYGILVNN | Parcial de hialuronidasa |
| | VPLLSYGILVN (BLAST) | (<i>Brachypelma vagans</i>) |

Figura 21. Resultados de la secuenciación parcial de la muestra A obtenida mediante electroforesis bidimensional de la fracción de alto peso molecular del veneno de *P. vittata*.

- **Identificación parcial de la proteína a través del programa Proteome Discoverer 1.4**

Hialuronidasa, parcial *Brachypelma vagans*

```

KDPQVFAVRW NVPTIQCRKT YGMDFVPLLK SYGILVNSD EFKGEVNTIF YEGQLGLYPH
LDQSGQRVNG GIPQLGDLPE HLKKAREDIN KAIPDVNFNG LGIIDWESWR PVWNFNWGAL
KKYQDESFEI ALKQHPGRTN DSLWQLAQOE WETSAKNFML ETLRLAQTMR PNSLWCYYLF
PDCYNYNGQT PQEFRCPSIV VTGNNQLSWL WHESKAVCPSS LYVADGYLQK YTFEQRITWYV
DGRILKEALRV APNSQLYPYV GYGYGVTPGA MVEDDFWRI LAQVASAGSS GTVIWGASAT
LRSRDNCQLL QQYVKDILGP SVKTVKENAE RCAKTVCNGK GRCTWPNDPN VVAWRVYLDR
NKHPFQRSEI TCHCVEGYSG RYCDVKSGIT NQTKRVSFKL SELYTYLRRL LDN

```

| Acceso | Descripción | Score | Coertura | # Peptidos |
|-----------|---|---|----------|------------|
| 406065863 | Hialuronidasa, parcial de <i>Brachypelma vagans</i> | 448.74 | 12.10 | 6 |
| MW (kDa) | Secuencia | Modificaciones | Carga | MH+ [Da] |
| 47.5 | AVCPSSLYVADGYLQK | C3(Carbamidomethyl); Q14(Deamidated) | 2 | 1684.84416 |
| | CTWPNDPNVVAWR | C1(Carbamidomethyl) | 2 | 1614.74736 |
| | WNVPTIQCR | C8(Carbamidomethyl) | 2 | 1173.58269 |
| | TWYVDGR | | 2 | 896.42467 |
| | LKEALR | | 2 | 729.46105 |

- **Secuenciación manual de novo**

| Íon (m/z) | Secuencia | Homología |
|-----------|--------------------------------------|---|
| 574.80 | DPTVFSVR | Sin homología |
| 587.30 | NVPTLQCR NVPTLQCR (BLAST) | Hialuronidasa-Pk1a (<i>Phoneutria keyserlingi</i>) |
| 682.86 | VWNFNWGTTLK VWNFNWGAALK (BLAST) | Parcial de hialuronidasa (<i>Brachypelma vagans</i>) |
| 753.92 | DDDLLGPSVVTVK | Sin homología |
| 752.42 | DDDLLGPSVVTVK | Sin homología |
| 1021.83 | TLVTYWLWSESK QTASAGSSGTVIWGASATLK | Sin homología |
| 1096.60 | QVASAGSSGTVIWGASATL (BLAST) | Parcial de hialuronidasa (<i>Brachypelma vagans</i>) |
| 1391.18 | LTSYGILVNN LKSYGILVN (BLAST) | Parcial de hialuronidasa (<i>Brachypelma vagans</i>) |

Figura 22. Resultados de la secuenciación parcial de la muestra B obtenida mediante electroforesis bidimensional de la fracción de alto peso molecular del veneno de *P. vittata*.

9. DISCUSIÓN

Las hialuronidasas son enzimas que se encuentran distribuidas ampliamente en la naturaleza y han sido reportadas en animales venenosos, tejidos humanos, organismos patógenos, tumores malignos, entre otros. El sustrato principal de las hialuronidasas es el ácido hialurónico, también llamado hialuronano, un componente mayoritario presente en la matriz extracelular de tejido conectivo blando (Bordon y col., 2015). El ácido hialurónico desempeña un papel importante como lubricante de articulaciones, protector de impactos y en el mantenimiento de la microarquitectura de la matriz extracelular (El-Safory y col., 2010).

La principal función de las hialuronidasas en los venenos de animales, es la de facilitar la difusión de componentes tóxicos a través de los tejidos de las presas, potenciando su efecto y contribuyendo así a los efectos locales y sistémicos del veneno (Ferrer y col., 2013). Las hialuronidasas procedentes de venenos de tarántulas actúan como endo- β -N acetilhexosaminidasas, que hidrolizan enlaces β -1,4 glicosídicos del ácido hialurónico entre los residuos N-acetil- β -D-glucosamina (GlcNAc) y β -D-ácido glucurónico (GlcUA), generando el tritasacárido -GlcUA-GlcNAc-GlcNAc- como el principal producto (da Silveira y col., 2007; Bordon y col., 2015).

En este estudio, enfocado al estudio de las hialuronidasas presentes en los venenos del género *Poecilotheria*, se comparó la actividad de hialuronidasa de los venenos de las especies de este género con especies de otros géneros. El veneno de *P.ornata* fue el que presentó mayor actividad enzimática en las condiciones del ensayo descritas. Una mayor actividad de hialuronidasa está asociada con venenos integrados por abundantes componentes de alto peso molecular porque se cree que requiere una mayor actividad enzimática para tener mayor permeabilidad para promover tales componentes. En cambio, cuando un veneno presenta un predominio de compuestos de bajo peso molecular como péptidos, no se requiere una actividad alta de hialuronidasa (Sutti y col., 2014). En este sentido, en todos los perfiles electroforéticos de los venenos (Figura 14) se observan dos bandas de proteínas de ~64 y 107 kDa, con un rango variable de péptidos. Esto podría ser la razón de que los venenos de las tarántulas tengan una mayor

actividad de hialuronidasa que otras especies de arañas. A la fecha, proteínas con actividad biológica de peso molecular alto (110-140 kDa) han sido reportadas en venenos de arañas de los géneros *Latrodectus*, *Steatoda* y *Achaearanea* (Kuhn-Nentwig y col., 2011). Particularmente las arañas del género *Latrodectus*, conocidas comúnmente como “viudas negras”, poseen proteínas llamadas latrotoxinas con un rango de masa entre 110 y 140 kDa. Las α -LTX (α -latrotoxinas), selectivas a vertebrados, forman un poro en la membrana lipídica de células del nervio, que actúa como un canal catiónico no selectivo que permite un flujo masivo de Ca^{+2} . Esto conduce a una exhaustiva liberación de neurotransmisores en una gran cantidad de nervios, lo que agota las vesículas sinápticas, bloqueando la neurotransmisión y causando finalmente parálisis (Rohou y col., 2007).

Como era de esperarse, los perfiles proteicos obtenidos en una dimensión para los diferentes venenos muestran la riqueza de péptidos que se muestran distribuidos entre 6 y 15 kDa. Particularmente, se observó una banda proteica de aproximadamente 40 kDa muy marcada para todos los venenos. Los resultados obtenidos por zimografía en una dimensión (Figura 16) mostraron que los doce venenos presentan hialuronidasas con un rango de peso molecular de alrededor de 38 a 42 kDa. Esto demuestra que los venenos de las tarántulas son una rica fuente de enzimas con esta actividad. En particular, los cuatro venenos del género *Poecilotheria* tienen hialuronidasas de alrededor de 40 a 41 kDa. Este rango de masa molecular es muy similar al que presentan las hialuronidasas de varios venenos de tarántulas del género *Brachypelma* y de *Aphonopelma serratum* identificadas por zimografía (Clement y col., 2016) y con la enzima de *Eurypelma californicum* (Savel-Niemann, 1989) con masas moleculares de ~40 kDa, similar a las hialuronidasas purificadas de los venenos de *Dugesiella hentzi*, *Vitalius dubius*, y *Brachypelma vagans* con masas de 39.6, 43 y 45 kDa respectivamente (Schanbacher y col., 1973; Sutti y col., 2014; Clement y col, 2012). Además de la zona de actividad enzimática común entre estas especies, el veneno de *N. chromatus* presentó una segunda zona de actividad de alrededor de 60 kDa. El

veneno de *C.darlingi* no mostró esa zona marcada de actividad como el resto de los venenos.

Mediante el perfil electroforético y la zimografía bidimensional, se identificó la presencia de al menos dos isoformas de hialuronidasas conservadas para los cuatro venenos de *Poecilotheria*, las cuales presentan similar peso molecular y un punto isoeléctrico de valor de pH alrededor de 6 y 7. Particularmente en el zimograma del veneno de *P. rufilata*, se observaron cuatro halos bien definidos de actividad enzimática en formas circulares consecutivas con un valor de punto isoeléctrico entre 6.5 y 7.5 (Figura 19C). Para precisar los valores de pI, podrían emplearse tiras IPG con un rango de pH adecuado más cerrado, que se encuentre entre 6 y 8. El rango de pI de las hialuronidasas de los venenos de *Poecilotheria* es similar al de la hialuronidasa de *Dugesiella hentzi* con un valor de 6.9 (Schanbacher y col., 1973). Es importante señalar que no hay reportes previos a esta investigación, que indiquen la presencia de isoformas de hialuronidasas en venenos de tarántulas. En un estudio proteómico del veneno de la avispa social *Polybia bautista*, se identificaron cuatro isoformas de hialuronidasas de similar peso molecular (~45 kDa) con un valor de pI de 9 (dos Santos y col., 2010).

Con la secuenciación de los dos puntos proteicos seleccionados, procedentes de la fracción de alto peso molecular del veneno de *P. vittata*, se determinó que ambos presentaron homología con la secuencia de la hialuronidasa del veneno de la tarántula mexicana *B. vagans*. Este resultado confirma la presencia de diferentes isoformas de hialuronidasas en el veneno de *P. vittata*. Cabe mencionar que la hialuronidasa de *B. vagans* presenta homología con enzimas de los venenos de otros artrópodos (Clement y col., 2016).

Los cuatro venenos de tarántulas del género *Poecilotheria* mostraron un pH óptimo de actividad hialuronidasa en el rango de 3 a 5. En comparación con hialuronidasas purificadas de venenos de otras tarántulas, se presenta un comportamiento similar. La hialuronidasa aislada del veneno de la tarántula *V. dubius* tiene un pH óptimo entre 4 y 5 (Sutti y col., 2014), el mismo descrito que para las hialuronidasas de los venenos de los escorpiones *Buthus martensi* y *Palamneus gravimanus* (Morey y col., 2006; Feng y col., 2008). El pH óptimo de la

hialuronidasa de la tarántula *Dugesiella hentzi* es de 3.5 (Schanbacher y col., 1973). Las hialuronidasas comúnmente son clasificadas en dos grupos principales, como enzimas ácido activas con un pH óptimo de actividad entre 3 y 4, y en enzimas neutro activas, con un pH óptimo de actividad entre 5 y 6 (Girish y Kemparaju, 2007). El comportamiento del pH óptimo de actividad para los venenos del género *Poecilotheria* se ajustan a esta clasificación.

Para el veneno de *P. ornata*, la temperatura óptima de la actividad hialuronidasa fue de 37 °C, la misma que para las hialuronidasas purificadas de la tarántula *V. dubius* (Sutti y col., 2014) y de la araña *Hipassa partita* (Nagaraju y col., 2007). Los mamíferos pequeños como los roedores también mantienen una temperatura corporal de 37 °C y suelen ser presas de las tarántulas (Dias y Brecovit, 2003). Los venenos de *P. regalis* y *P. vittata* presentaron una temperatura de máxima actividad de 50 °C, igual que las enzimas BmHYA1 del escorpión *Buthus martensi* y la hialuronidasa testicular bovina (Feng y col., 2008). Por último, el veneno de *P. rufilata* tuvo una actividad enzimática estable en el rango de temperaturas evaluadas de 30 a 70 °C. Cabe mencionar que en el rango de temperatura evaluado no se anuló la actividad hialuronidasa, como sí ocurrió con la evaluación a un pH de 8 en la determinación del pH óptimo. Esto nos indica la estabilidad de las hialuronidasas a altas temperaturas. En cambio, hay hialuronidasas aisladas de escorpiones en las que se pierde su actividad enzimática al rebasar los 40 °C (Bordon y col., 2015). En el caso de la enzima aislada de *V. dubius*, a 60 °C se perdió completamente su actividad (Sutti y col., 2014).

10. CONCLUSIONES

Los hallazgos encontrados en este estudio muestran que los venenos de tarántulas representan una fuente importante de enzimas con actividad de hialuronidasa, todas con pesos moleculares relativos entre 38 y 42 kDa. Además, el veneno de *N. chromatus*, presentó hialuronidasas de aproximadamente 60 kDa. Los venenos de las tarántulas del género *Poecilotheria* poseen varias isoformas de hialuronidasas con un rango de pI entre 6 y 8 y pesos moleculares cercanos a 40 kDa. Estas enzimas actúan en condiciones de pH y temperatura similares a otras hialuronidasas ya reportadas, con pH de 3 a 5 y temperatura variable entre 20 y 70 °C.

En este trabajo, se establecieron por primera vez las condiciones para analizar los venenos del género *Poecilotheria* mediante electroforesis bidimensional y zimografía en dos dimensiones. Esto abre la perspectiva para continuar con los procesos de purificación y análisis de las hialuronidasas de los venenos de estas especies.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Ahmed**, N, Pinkham, M, Warrell, D A, **2009**. Symptom in search of a toxin: muscle spasms following bites by Old World tarantula spiders (*Lampropelma nigerrimum*, *Pterinochilus murinus*, *Poecilotheria regalis*) with review. QJM, 851-857.
- Akhunov**, A A, Makevnina, L G, Golubenko, Z, Paskhina, T S, **1996**. Kininase of the *Latrodectus tredecimguttatus* venom: a study of its enzyme substrate specificity. Immunopharmacology 32, 160-162.
- Anand**, P, Bley, K, **2011**. Topical capsaicin for pain management: therapeutic potential and mechanisms of action of the new high-concentration capsaicin 8% patch. Br J Anaesth.107, 490-502.
- Arias**, R L, Sung, M L A, Vasylyev, D, Zhang, M Y, Albinson, K, Kubek, K, Zaleska, M M, **2008**. Amiloride is neuroprotective in an MPTP model of Parkinson's disease. Neurobiol Dis. 31, 334-341.
- Bae**, C, Sachs, F, Gottlieb, P A, **2011**. The mechanosensitive ion channel Piezo 1 is inhibited by the peptide GsMTx4. Biochemistry 50, 6295-6300.
- Balzer**, L, Pennino, D, Blank, S, Seismann, H, Darsow, U, Schnedler, M, Ring, J, **2014**. Basophil activation test using recombinant allergens: highly specific diagnostic method complementing routine tests in wasp venom allergy. PLoS One. 9, e108619, 1-9.
- Benemei**, S, De Cesaris, F, Fusi, C, Rossi, E, Lupi, C y Geppetti, P, **2013**. TRPA1 and other TRP channels in migraine. J headache Pain. 14, 1-8.
- Bitencourt**, C S, Gelfuso, G M, Pereira P A, Assis, P A, Tefé-Silva, C, Ramos, S G, **2015**. Hyaluronidase-loaded PLGA microparticles as a new strategy for the treatment of pulmonary fibrosis. Tissue Eng Part A., 246-256.
- Bitencourt**, C S, Pereira, P A, Ramos, S G, Sampaio, S V, Arantes, E C, Aronoff, D M, Faccioli, L H, **2011**. Hyaluronidase recruits mesenchymal-like cells to the lung and ameliorates fibrosis. Fibrogenesis Tissue Repair. 4, 1-14.
- Bookbinder**, L H, Hofer, A, Haller, M F, Zepeda, M L, Keller, G A, Lim, J E, Frost, G I, **2006**. A recombinant human enzyme for enhanced interstitial transport of therapeutics. J Control Release 114, 230-241.

- Bordon**, K C, Wiezel, G A, Amorim, F G, Arantes, E C, **2015**. Arthropod venom Hyaluronidases: biochemical properties and potential applications in medicine and biotechnology. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 21, 1-12.
- Bradford**, M, **1976**. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal Biochem*. 72, 248-254.
- Brust**, A., Palant, E, Croker, D E, Colless, B, Drinkwater, R, Patterson, B, Alewood, D, **2009**. χ -Conopeptide Pharmacophore Development: Toward a Novel Class of Norepinephrine Transporter Inhibitor (Xen2174) for Pain. *J Med Chem*. 52, 6991-7002.
- Buchner**, E, Buchner, S, Burg, M G, Hofbauer, A, Pak, W L, Pollack, I, **1993**. Histamine is a major mechanosensory neurotransmitter candidate in *Drosophila melanogaster*. *Cell Tissue Res*. 273, 119-125.
- Burnstock**, G, **2002**. Purinergic signalling and vascular cell proliferation and death. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 22, 364-373.
- Burnstock**, G, **2007**. Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci*. 64, 1471-1483.
- Buvinic**, S, Briones, R, Huidobro-Toro, J P, **2002**. P2Y(1) and P2Y(2) receptors are coupled to the NO/cGMP pathway to vasodilate the rat arterial mesenteric bed. *Br J Pharmacol*. 136 ,847-856.
- Cao**, E, Liao, M, Cheng, Y, Julius, D, **2013**. TRPV1 structures in distinct conformations reveal activation mechanisms. *Nature* 504, 113-118.
- Cavallini**, M, Gazzola, R, Metalla, M, Vaienti, L, **2013**. The role of hyaluronidase in the treatment of complications from hyaluronic acid dermal fillers. *Aesthet Surg J*. 33, 1167-1174.
- Chan**, T K, Geren, C R, Howell, D E and Odell, G V, **1975**. Adenosine triphosphate in tarantula spider venoms and its synergistic effect with the venom toxin. *Toxicon* 13, 61-66.
- Chi**, V, Pennington M W, Norton, R S, Tarcha, E J, Londono, L M, Sims-Fahey B, Upadhyay, S K, Lakey, J T, Iadonato, S, Wulff, H, Beeton C, Chandy K G,

- 2012.** Development of a sea anemone toxin as an immunomodulator for therapy of autoimmune diseases. *Toxicon* 59, 529-546.
- Clement, H, Barraza, G, Herrera, E, García, F, Diego-García, E, Villegas, E, Corzo, G, 2016.** Antimicrobial, Insecticides, Analgesics, and Hyaluronidases from the Venom Glands of *Brachypelma* Spiders. *Spider Venoms*, 345-360.
- Clement, H, Olvera, A, Rodríguez, M, Zamudio, F, Palomares, L A, Possani, L D, Sánchez-López, R, 2012.** Identification, cDNA cloning and heterologous expression of a hyaluronidase from the tarantula *Brachypelma vagans* venom. *Toxicon* 60, 1223-1227.
- Cromwell, O, Häfner, D, Nandy, A, 2011.** Recombinant allergens for specific immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol.* 127, 865-872.
- da Silveira, R, Chaim, O, Mangili, O, Gremski, W, Dietrich, C, Nader, H, Sanches S, 2007.** Hyaluronidases in *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom are endo- β -N-acetyl-D-hexosaminidases hydrolases. *Toxicon* 49 758-768.
- David, E, Tramontin, T, Zimmel, R, 2009.** Pharmaceutical R&D: the road to positive returns. *Nat Rev Drug Discov.* 8, 609-610.
- De Souza, A H, Lima, M C, Drewes, C C, Da Silva, J F, Torres, K C L, Pereira, E M R, Gomez, R S, 2011.** Antiallodynic effect and side effects of Ph α 1 β , a neurotoxin from the spider *Phoneutria nigriventer*: Comparison with ω -conotoxin MVIIA and morphine. *Toxicon* 58, 626-633.
- Deval, E, Gasull, X, Noël, J, Salinas, M, Baron, A, Diochot, S, Lingueglia, E, 2010.** Acid-sensing ion channels (ASICs): pharmacology and implication in pain. *Pharmacol Ther.* 128, 549-558.
- Deval, E., Noël, J., Lay, N., Alloui, A., Diochot, S., Friend, V, Lingueglia, E, 2008.** ASIC3, a sensor of acidic and primary inflammatory pain. *EMBO J.* 27, 3047-3055.
- Di Ferrante, N, 1956.** Turbidimetric measurement of acid mucopolysaccharides and hyaluronidase activity. *J Biol Chem.* 220, 303-306.
- Dias, S, C, Brescovit, A D, 2003.** Notes on the behavior of *Pachistopelma rufonigrum* Pocock (Araneae, Theraphosidae, Aviculariinae). *Revista brasileira de zoología* 20, 13-17.

- Diochot, S, Baron, A, Salinas, M, Douguet, D, Scarzello, S, Dabert-Gay, A S, Lingueglia, E, 2012.** Black mamba venom peptides target acid-sensing ion channels to abolish pain. *Nature* 490, 552-555.
- dos Santos, L D, Santos, K S, Pinto, J R A, Dias, N B, Souza, B M D, dos Santos, M F, Palma, M S, 2010.** Profiling the proteome of the venom from the social wasp *Polybia paulista*: a clue to understand the envenoming mechanism. *J Proteome Res.* 9, 3867-3877.
- Dunn, A L, Heavner, J E, Racz, G, Day, M, 2010.** Hyaluronidase: a review of approved formulations, indications and off-label use in chronic pain management. *Expert Opin Biol Ther.* 10, 127-131.
- Duran, F, 1933.** Studies on a certain spreading factor existing in bacteria and its significance for bacterial invasiveness. *J Exp Med.* 58, 161-181.
- Eberhart, A H, Weiler, C R, Erie, J C, 2004.** Angioedema related to the use of hyaluronidase in cataract surgery. *Am J Ophthalmol.* 138, 142-143.
- Eid, R, 2011.** Therapeutic Targeting of TRP Channels-The TR (i) P to Pain Relief. *Curr Top Med Chem.* 11, 2118-2130.
- El-Safory, N S, Fazary, A E, Lee, C K, 2010.** Hyaluronidases, a group of glycosidases: current and future perspectives. *Carbohydrate Polymers* 81, 165-181.
- Erickson, M, Stern, R, 2012.** Chain gangs: new aspects of hyaluronan metabolism. *Biochem Res Int.*, 1-9.
- Escoubas, P, Rash L, 2004.** Tarantulas: eight-legged pharmacist and combinatorial chemist. *Toxicon* 43, 555-574.
- Escoubas, P, Sollod, B, King, G F, 2006.** Venom landscapes: mining the complexity of spider venoms via a combined cDNA and mass spectrometric approach. *Toxicon* 47, 650-663.
- Estrada, S, Vargas, L, Castillo J, 2013.** Extraction and partial characterization of venom from the Colombian spider *Pamphobeteus aff. Nigricolor* (Aranae: Theraphosidae). *Toxicon* 76, 301-309.

- Feng, L, Gao, R, Gopalakrishnakone, P, 2008:** Isolation and characterization of a hyaluronidase from the venom of Chinese red scorpion *Buthus martensi*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 148, 250-257.
- Ferreira, F R B, da Silva, P M, Soares, T, Machado, L G, de Araújo, L C C, da Silva, T G, Zingali, R B, 2016.** Evaluation of antimicrobial, cytotoxic, and hemolytic activities from venom of the spider *Lasiadora* sp. *Toxicon* 122, 119-126.
- Ferrer, V P, de Mari, T L, Gremski, L H, Silva, D T, da Silveira, R B, Gremski, W, Veiga, S S, 2013.** A novel hyaluronidase from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom (Dietrich's Hyaluronidase): from cloning to functional characterization. *PLoS Negl Trop Dis.* 7, e2206,1-12.
- Flórez, J.** *Farmacología Humana.* Quinta edición. España: Editorial Elsevier, **2008:** 20-32.
- Fry, B G, Roelants, K, Champagne, D E, Scheib, H, Tyndall, J D, King, G F, Renjifo, C, 2009.** The toxicogenomic multiverse: convergent recruitment of proteins into animal venoms. *AnnU Rev Genomics Hum Genet.* 10, 483-511.
- Fuchs, J, von Dechend, M, Mordasini, R, Ceshi, A, Nentwig, W, 2014.** A verified spider bite and review of the literatura confirm ornamental tree spider (*Poecilotheria* species) as underestimated theraposids of medical importance. *Toxicon* 77, 73-77.
- García, A, Rodríguez, L, Díaz, L, Vega, R, 2015.** Pharmacological characterization of venoms from three theraphosid spiders: *Poecilotheria regalis*, *Ceratogyrus darlingi* and *Brachypelma epicureanum*. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* 21, 1-9.
- Geren, C R, Chan, T K, Howell, D E, Odell, G V, 1976.** Isolation and characterization of toxins from brown recluse spider venom (*Loxosceles reclusa*). *Arch Biochem Biophys.* 174, 90-99.
- Girish, K S, Kemparaju, K, 2007.** The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: a biological overview. *Life Sci.* 80, 1921-1943.
- Götte, M, Yip, G W, 2006.** Heparanase, hyaluronan, and CD44 in cancers: a breast carcinoma perspective. *Cancer Res.* 66, 10233-10237.

- Gottlieb**, P A, Suchyna, T M, Ostrow, L W, Sachs, F, **2004**. Mechanosensitive ion channels as drug targets. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord.* 3, 287-295.
- Grishin**, E V, **1998**. Black widow spider toxins: the present and the future. *Toxicon* 36, 1693-1701.
- Gui**, J, Liu, B, Cao, G, Lipchik, A M, Perez, M, Dekan, Z, King, G F, **2014**. A tarantula-venom peptide antagonizes the TRPA1 nociceptor ion channel by binding to the S1–S4 gating domain. *Current Biology*, 24: 473-483.
- Heck**, S D, Siok, C J, Krapcho, K J, Kelbaugh, P R, Thadeio, P F, Welch, M J, Williams, R D, Ganong, A H, Kelly, M E, Lanzetti, A J, Gray, W R, Phillips, D, **1994**. Functional consequences of posttranslational isomerization of Ser-46 in a calcium channel toxin. *Science* 266, 1065-1068.
- Heitz**, J R, Norment, B R, **1974**. Characteristics of an alkaline phosphatase activity in brown recluse venom. *Toxicon* 12, 181-187.
- Herzig** V, King G, **2013**. The neurotoxic mode of action of venoms from the spider family Theraposidae. En Nentwig W. Ed. *Spider Ecophysiology*, Springer, Berlín, 203-215.
- Herzig**, V, King, G F, **2015**. The cystine knot is responsible for the exceptional stability of the insecticidal spider toxin ω -Hexatoxin-Hv1a. *Toxins* 7, 4366-4380.
- Herzig**, V, Wood, D, Newell, F, Chaumeil, P, Kaas, Q, Binford, G, Nicholson, G, Gorse, D, King G. ArachnoServer 2.0, an updated online resource for spider toxin sequences and structures. *Nucleic acids research* 39. [monografía en Internet]. **2011**. [consultado Octubre 4 2016]. Disponible en <http://www.arachnoserver.org>.
- Hess**, C N, Kou, R, Johnson, R P, Li, G K, Michel, T, **2009**. ADP signaling in vascular endothelial cells: ADP-dependent activation of the endothelial isoform of nitric-oxide synthase requires the expression but not the kinase activity of AMP-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 284, 32209-32224.
- Holzer**, P, **2011**. Transient receptor potential (TRP) channels as drug targets for diseases of the digestive system. *Pharmacol Ther.* 131,142-170.

- Hong**, H, Zhang, Y, Sun, J, Cai, W, **2010**. Positron emission tomography imaging of prostate cancer. *Amino Acids* 39, 11-27.
- Horta**, C C R, de Freitas Magalhães, B, Oliveira-Mendes, B B R, do Carmo, A O, Duarte, C G, Felicori, L F, Kalapothakis, E, **2014**. Molecular, immunological, and biological characterization of *Tityus serrulatus* venom hyaluronidase: New insights into its role in envenomation. *PLoS Negl Trop Dis.* 8, e2693, 1-14.
- Horta**, C C, Rezende, B A, Oliveira, R R R, Carmo, A O, Capettini, L S A, Silva, J F, Gomes, M T, Chávez, C, Bravo, C E S, Lemos, V S, Kalapothakis E. **2013**. ADP is a vasodilator component from *Lasiodora* sp. mygalomorph spider venom. *Toxicon* 72,102-112.
- Hostomska**, J, Cerny, M, Votypka, J, Volf, P, **2008**. Hyaluronidase of bloodsucking insects and its enhancing effect on leishmania infection in mice. *PLoS Negl Trop Dis* 2, e294, 1-8.
- Isbister**, G K, Seymour, J E, Gray, M R, Raven, R J, **2003**. Bites by spiders of the family Theraphosidae in humans and canines. *Toxicon* 41, 519-524.
- Izumi**, M, Ikeuchi, M, Ji, Q, Tani, T, **2012**. Local ASIC3 modulates pain and disease progression in a rat model of osteoarthritis. *J Biomed Sci.* 19, 1-8.
- Jacomini**, D L J, Moreira, S M G, Pereira, F D C, de Lima Zollner, R, Braga, M R B, **2014**. Reactivity of IgE to the allergen hyaluronidase from *Polybia paulista* (Hymenoptera, Vespidae) venom. *Toxicon* 82, 104-111.
- Jasys**, V J, Kelbaugh, P R, Nason, D M, Phillips, D, Rosnack, K J, Saccomano, N A, Stroh, J G, Volkmann, R A, **1990**. Isolation, structure elucidation, and synthesis of novel hydroxylamine-containing polyamines from the venom of the *Agelenopsis aperta* spider. *J Am Chem Soc.* 112, 6696-6704.
- Julius**, D, **2013**. TRP channels and pain. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 29, 355-384.
- Karczewski**, J, Spencer, R H, Garsky, V M, Liang, A, Leidl, M D, Cato, M J, Urban, M O, **2010**. Reversal of acid-induced and inflammatory pain by the selective ASIC3 inhibitor, APETx2. *Br J Pharmacol.* 161, 950-960.

- Kempeneers**, A, Dralands, L, Ceuppens, J, **1991**. Hyaluronidase induced orbital pseudotumor as complication of retrobulbar anesthesia. *Bull Soc Belge Ophtalmol.* 243, 159-166.
- Kesavan**, K, Ratliff, J, Johnson, E W, Dahlberg, W, Asara, J M, Misra, P, Jacoby, D B, **2010**. Annexin A2 is a molecular target for TM601, a peptide with tumor-targeting and anti-angiogenic effects. *J Biol Chem.* 285, 4366-4374.
- Kim**, J H, Choi, G S, Ye, Y M, Nahm, D H, Park, H S, **2009**. Acute urticarial caused by the injection of goat-derived hyaluronidase. *Allergy Asthma Immunol Res,* 48-50.
- King**, G F, **2011**. Venoms as a platform for human drugs: translating toxins into therapeutics. *Expert Opin Biol Ther.* 11:1469-1484.
- King**, G F, **2013**. Venoms to drugs: translating venom peptides into therapeutics. *Biochemistry* 44.
- King**, G F, Gentz, M C, Escoubas, P, Nicholson, G M, **2008**. A rational nomenclature for naming peptide toxins from spiders and other venomous animals. *Toxicon* 52:264-276.
- King**, G F, Hardy, M C, **2013**. Spider-venom peptides: structure, pharmacology, and potential for control of insect pests. *Annu Rev Entomol.* 58, 475-496.
- King**, G. (ed). *Therapeutic Applications of Spider-Venom Peptides. En Venoms to Drugs: Venom as a Source for the Development of Human Therapeutics.* Royal Society of Chemistry, Reino Unido, **2015**: 221-244.
- Kitaguchi**, T, Swartz, K J, **2005**. An inhibitor of TRPV1 channels isolated from funnel web spider venom. *Biochemistry* 44, 15544-15549.
- Klint**, J K, Berecki, G, Durek, T, Mobli, M, Knapp, O, King, G F, Rash, L D, **2014**. Isolation, synthesis and characterization of ω -TRTX-Cc1a, a novel tarantula venom peptide that selectively targets L-type Ca V channels. *Biochem Pharmacol.* 89, 276-286.
- Klint**, J K, Senff S, Rupasinghe, D B, Er, S Y, Herzig, V, Nicholson, G M, King, G F, **2012**. Spidervenom peptides that target voltage-gated sodium channels: pharmacological tools and potential therapeutic leads. *Toxicon* 60,478-491.

- Kohno**, N., Ohnuma, T, Truog, P, **1994**. Effects of hyaluronidase on doxorubicin penetration into squamous carcinoma multicellular tumor spheroids and its cell lethality. *J Cancer Res Clin Oncol.* 120, 293-297.
- Kolarich**, D, Léonard, R, Hemmer, W, Altmann, F, **2005**. The N-glycans of yellow jacket venom hyaluronidases and the protein sequence of its major isoform in *Vespa vulgaris*. *FEBS J.* 272, 5182-5190.
- Koloso**v, A, Goodchild, C S, Cooke, I, **2010**. CNSB004 (Leconotide) causes antihyperalgesia without side effects when given intravenously: a comparison with ziconotide in a rat model of diabetic neuropathic pain. *Pain Med.* 11, 262-273.
- Kostrewa**, D, Wyss, M, D'Arcy, A, van Loon, A P, **1999**. Crystal structure of *Aspergillus niger* pH 2.5 acid phosphatase at 2.4 Å resolution. *J Mol Biol.* 288, 965-974.
- Kuhn-Nentwig**, L, Schaller, J, Nentwig, W, **1994**. Purification of toxic peptides and the amino acid sequence of CSTX-1 from the multicomponent venom of *Cupiennius salei* (Araneae: Ctenidae). *Toxicon* 32, 287-302.
- Kuhn-Nentwig**, L, Stöcklin, R, Nentwig, W, **2011**. Venom composition and strategies in spiders: is everything possible?. *Adv in Insect Phys.* 40, 1-86.
- Kupai**, K, Szucs, G, Cseh, S, Hajdu, I, Csonka, C, Csont, T, Ferdinandy, P, **2010**. Matrix metalloproteinase activity assays: Importance of zymography. *J Pharmacol Toxicol Methods* 62, 205-209.
- Laemmli**, U K, **1970**. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Laurent**, T C, Laurent, U B, Fraser, J R, **1995**. Functions of hyaluronan. *Ann Rheum Dis.* 54, 429.
- Lee** C, Chen H H, Lisy, O, **2009**. Pharmacodynamics of a novel designer natriuretic peptide, CD-NP, in a first-in-human clinical trial in healthy subjects. *J Clin Pharmacol.* 49, 668-673
- Lu**, G, Kochoumian, L, **1995**. Sequence identity and antigenic cross-reactivity of white face hornet venom allergen, also a hyaluronidase, with other proteins. *J Biol Chem.* 270, 4457-4465.

- Lucas, S M, Da Silva, P I, Bertani, Cardoso, J C, 1994.** Mygalomorph spider bites: a report on 91 cases in the state of Sao Paulo, Brazil. *Toxicon* 32, 1211-1215.
- Marsh, N, Williams, V, 2005.** Practical applications of snake venom toxins in haemostasis. *Toxicon* 45, 1171-1181.
- Medcalf, R L, 2012.** Desmoteplase: discovery, insights and opportunities for ischaemic stroke. *Br J Pharmacol.* 165, 75-89.
- Morey S S, Kiran K M, Gadag, J R, 2006.** Purification and properties of hyaluronidase from *Palamneus gravimanus* (Indian black scorpion) venom. *Toxicon* 47, 188-195.
- Morrow, L, Muchmore, D B, Hompesch, M, Ludington, E A, Vaughn, D E, 2013.** Comparative pharmacokinetics and insulin action for three rapid-acting insulin analogs injected subcutaneously with and without hyaluronidase. *Diabetes Care* 36, 273-275.
- Munos, B, 2009.** Lessons from 60 years of pharmaceutical innovation. *Nat Rev Drug Discov.* 8, 959-968.
- Nagaraju, S, Devaraja, S, Kemparaju, K, 2007.** Purification and properties of hyaluronidase from *Hippasa partita* (funnel web spider) venom gland extract. *Toxicon* 50, 383-393.
- Nässel, D R, 1999.** Histamine in the brain of insects: a review. *Microsc. Res Tech.* 44, 121-136.
- Nelsen, D R, Nisani, Z, Cooper, A M, Fox, G A, Gren, E C, Corbit, A G, Hayes, W K, 2014.** Poisons, toxins, and venoms: redefining and classifying toxic biological secretions and the organisms that employ them. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 89, 450-465.
- Nentwig, W, Kuhn-Nentwig, L, 2013.** Main components of spider venoms. In *Spider Ecophysiology.* Springer Berlin Heidelberg 191-202.
- Newman, D J, Cragg, G M, 2007.** Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. *J Nat Prod.* 70, 461-477.
- Nimmrich, V, Gross, G, 2012.** P/Q-type calcium channel modulators. *Br J Pharmacol.* 167, 741-759.

- Norton**, R S, Pallaghy, P K, **1998**. The cystine knot structure of ion channel toxins and related polypeptides. *Toxicon* 36, 1573-1583.
- Odell**, G V, Hudiburg, S A, Herrero, M, Cabbiness, S G, Chan, T K, Aird, S D, Kaiser, I, **1989**. Tarantula venom components: *Brachypelma smithii*, *Brachypelma emilia*, *Dugesiella hentzi* and *Aphonopelma seemanni*. *Toxicon* 27, 67.
- Oldrati**, Vera, Bianchi, E, Stöcklin, R, **2013**. Spider venom components as drug candidates. *Spider Ecophysiology*. Springer Berlin Heidelberg, 491-503.
- Ortholand**, J Y, **Ganesan**, A, **2004**. Natural products and combinatorial chemistry: back to the future. *Curr Opin Chem Biol*. 8, 271-280.
- Padavattan**, S, Schirmer, T, Schmidt, M, Akdis, C, Valenta, R, Mittermann, I, Markovic-Housley, Z, **2007**. Identification of a B-cell epitope of hyaluronidase, a major bee venom allergen, from its crystal structure in complex with a specific Fab. *J Mol Biol*. 368, 742-752.
- Park**, S P, Kim, B M, Koo, J Y, Cho, H, Lee, C H, Kim, M, Oh, U, **2008**. A tarantula spider toxin, GsMTx4, reduces mechanical and neuropathic pain. *Pain* 137, 208-217.
- Paterson**, I, Anderson, E A, 2005. The renaissance of natural products as drug candidates. *Science* 310, 451- 453.
- Peng**, K, Shu, Q, Liu, Z, Liang, S, **2002**. Function and solution structure of huwentoxin-IV, a potent neuronal tetrodotoxin (TTX)-sensitive sodium channel antagonist from Chinese bird spider *Selenocosmia huwena*. *J Biol Chem*. 277, 47564-47571.
- Pennington**, M W, Beeton, C, Galea, C A, Smith, B J, Chi, V, Monaghan, K P, Crossley, G, **2009**. Engineering a stable and selective peptide blocker of the Kv1. 3 channel in T lymphocytes. *Mol Pharmacol*. 75, 762-773.
- Pessini**, A C, Takao, T T, Cavalheiro, E C, Vichnewski, W, Sampaio, S V, Giglio, J R, Arantes, E C, **2001**. A hyaluronidase from *Tityus serrulatus* scorpion venom: isolation, characterization and inhibition by flavonoids. *Toxicon* 39, 1495-1504.

- Petrey**, A C, Carol, A, **2015**. Hyaluronan, a crucial regulator of inflammation. *Front Immunol.*, 1-13.
- Pignataro**, G, Simon, R P, Xiong, Z G, **2007**. Prolonged activation of ASIC1a and the time window for neuroprotection in cerebral ischaemia. *Brain* 130, 151-158.
- Pillwein**, K, Fuiko, R, Slavic, I, Czech, T, Hawliczek, G, Bernhardt, G y Köller, U, **1998**. Hyaluronidase additional to standard chemotherapy improves outcome for children with malignant brain tumors. *Cancer Lett.* 131, 101-108.
- Pineda**, S S, Undheim, E A, Rupasinghe, D B, Ikonopoulou, M P, King G F, **2014**. Spider venomics: Implications for drug discovery. *Future Med Chem.* 6, 1699-1714.
- Platnick** N. The World Spider Catalog, Version 15.5 [Monografía en Internet]. New York: American Museum of Natural History, **2014** [consultado 2016 Octubre 4]. Disponible en: <http://research.amnh.org/iz/spiders/catalog/INTRO1.html/>.
- Racz**, G B, Heavner, J E, Trescot A, **2008**. Percutaneous lysis of epidural adhesions—evidence for safety and efficacy. *Pain Pract.* 8, 277-286.
- Rash**, L D, Hodgson, W C, **2002**. Pharmacology and biochemistry of spider venoms. *Toxicon* 40, 225-254.
- Reid**, P F, **2007**. Alpha-cobratoxin as a possible therapy for multiple sclerosis: a review of the literature leading to its development for this application. *Crit Rev Immunol.* 27, 291-302.
- Reid**, P F, Raymond, L N, **2010**. U.S. Patent No. 7,758,894. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Rocha-e-Silva**, T, Rostelato, S, Leite G, da Silva, P, Hyslop, S, Rodrigues, L, **2013**. VdTX-1, a reversible nicotinic receptor antagonist isolated from venom of the spider *Vitalius dubius* (Theraphosidae). *Toxicon* 70: 135-141.
- Rocha-e-silva**, T, Sutti, R, Hyslop S, **2009**. Milking and partial and characterization of venom the Brazilian spider *Vitalius dubius* (Theraposidae). *Toxicon* 53, 153-161.

- Rodrigues**, M C, Guimaraes, L H, Liberato, J L, de Lourdes, Teixeira, de Moraes Polizeli, M, dos Santos, W F, **2006**. Acid and alkaline phosphatase activities of a fraction isolated from *Parawixia bistriata* spider venom. *Toxicon* 47, 854-858.
- Rohou**, A, Nield, J, Ushkaryov, Y A, **2007**. Insecticidal toxins from black widow spider venom. *Toxicon* 49, 531-549.
- Roop**, A K, McNicholas, C M, Bartoszewski, R, Bebok, Z, Benos, D J, Fuller, C M, **2012**. Glioma-specific cation conductance regulates migration and cell cycle progression. *J Biol Chem*. 287, 4053-4065.
- Saez**, N J, Mobli, M, Bieri, M, Chassagnon, I R, Malde, A K, Gamsjaeger, R, King, G F, **2011**. A dynamic pharmacophore drives the interaction between psalmotoxin-1 and the putative drug target acid-sensing ion channel 1a. *Mol Pharmacol*. 80, 796-808.
- Saez**, N J, Senff, S, Jensen, J E, Er, S Y, Herzig, V, Rash, L D, King, G F, **2010**. Spider-venom peptides as therapeutics. *Toxins* 2, 2851-2871.
- Salustri** A, Camaioni, A, Di Giacomo, M, Fulop, C, Hascall, V C, **1999**. Hyaluronan and proteoglycans in ovarian follicles. *Hum Reprod Update* 5, 293-301.
- Savel-Niemann**, A, **1989**. Tarantula (*Eurypelma californicum*) venom, a multicomponent system. *Biol Chem Hoppe Seyler*. 370, 485-498.
- Schägger**, H, **2006**. Tricine-SDS-PAGE. *Nature Protoc*. 1, 16-22.
- Schanbacher**, F L, Lee, C K, Hall, J E, Wilson, I B, Howell, D E, Odell, G V, **1973**. Composition and properties of tarantula *Dugesiella hentzi* (Girard) venom. *Toxicon* 11, 21-29.
- Schenone**, H, Suarez, G, **1978**. Venoms of Scytodidae. Genus *Loxosceles*. In: *Arthropod Venoms. Handbook of Experimental Pharmacology*, 247-275.
- Schulze**, C, Bittorf, T, Walzel, H, Kundt, G, Bader, R, Mittelmeier, W, **2008**. Experimental evaluation of hyaluronidase activity in combination with specific drugs applied in clinical techniques of interventional pain management and local anaesthesia. *Pain Physician* 11, 877-883.

- Shikata**, Y, Watanabe, T, Teramoto, T, Inoue, A, Kawakami, Y, Nishizawa, Y, Katayama, K, Kuwada, M, **1995**. Isolation and characterization of a peptide isomerase from funnel web spider venom. *J. Biol. Chem.* 270, 16719-16723.
- Shu**, Q, Lu, S Y, Gu, X C, Liang, S P, **2002**. The structure of spider toxin huwentoxin-II with unique disulfide linkage: evidence for structural evolution. *Protein Sci.* 11, 245–252.
- Sollod** B L, Wilson D, Zhaxybayeva O, Gogarten J P, Drinkwater R, King G F, **2005**. Were arachnids the first to use combinatorial peptide libraries? *Peptides* 26, 131-139.
- Souza**, A H, Ferreira, J, do Nascimento Cordeiro, M, Vieira, L B, De Castro, C J, Trevisan, G, Prado, V F, **2008**. Analgesic effect in rodents of native and recombinant Ph α 1 β toxin, a high-voltage-activated calcium channel blocker isolated from armed spider venom. *Pain* 140, 115-126.
- Stern**, R, Jedrzejewski M J, **2006**. Hyaluronidases: their genomics, structures, and mechanisms of action. *Chem Rev.* 106, 818-839.
- Sutti**, R, Rosa, B B, Wunderlich, B, da Silva Junior, P I, **2015**. Antimicrobial activity of the toxin VdTX-I from the spider *Vitalius dubius* (Araneae, Theraphosidae). *Biochemistry and Biophysics Reports*, 324-328.
- Sutti**, R, Tamascia, M L, Hyslop, S, Rocha-e-Silva, T A A, **2014**. Purification and characterization of a hyaluronidase from venom of the spider *Vitalius dubius* (Araneae, Theraphosidae). *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* 20,1-7.
- Takacs**, Z, Nathan, S, **2014**. Animal venoms in medicine. *Encyclopedia of toxicology*, 3rd ed. London: Elsevier, 252-259.
- Toki**, T, Yasuhara, T, Aramaki, Y, Osawa, K, Miwa, A, Kawai, N, Nakajima, T, **1988**. Isolation and chemical characterization of a series of new spider toxin nephilatoxins in the venom of joro spider *Nephila clavata*. *Biomed. Res.* 9, 421-428.
- Triggs-Raine**, B, Natowicz, M R, **2015**. Biology of hyaluronan: Insights from genetic disorders of hyaluronan metabolism. *World J Biol Chem.* 6, 110.

- Tu, A T, Hendon, R R, 1983.** Characterization of lizard venom hyaluronidase and evidence for its action as a spreading factor. *Comp Biochem Physiol B.* 76, 377-383.
- Ugawa, S, Ueda, T, Ishida, Y, Nishigaki, M, Shibata, Y, Shimada, S, 2002.** Amiloride-blockable acid-sensing ion channels are leading acid sensors expressed in human nociceptors. *J Clin Invest.* 110, 1185-1190.
- Usherwood, P N R, Blagbrough, L S, 1991.** Spider toxins affecting glutamate receptors: polyaminas in therapeutic neurochemistry. *Pharmacol. Ther.* 52, 245-268.
- Valenta, R, Niederberger, V, 2007.** Recombinant allergens for immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol.* 119, 826-830.
- Valenta, R, Niespodziana, K, Focke-Tejkl, M, Marth, K, Huber, H, Neubauer, A, Niederberger, V, 2011.** Recombinant allergens: what does the future hold?. *J Allergy Clin Immunol.* 127, 860-864.
- Vay, L, Gu, C, McNaughton, P A, 2012.** The thermo-TRP ion channel family: properties and therapeutic implications. *Br J Pharmacol.* 165, 787-801.
- Vergo, S, Craner, M J, Etzensperger, R, Attfield, K, Friese, M A, Newcombe, J, Fugger, L, 2011.** Acid-sensing ion channel 1 is involved in both axonal injury and demyelination in multiple sclerosis and its animal model. *Brain* 134, 571-584.
- Veiseh, M, Gabikian, P, Bahrami, S B, 2007.** Tumor paint: a chlorotoxin: Cy5.5 bioconjugate for intraoperative visualization of cancer foci. *Cancer Res.* 67, 6882-6888.
- Vieira, L B, Kushmerick, C, Hildebrand, M E, Garcia, E, Stea, A, Cordeiro, M N, Snutch, T P, 2005.** Inhibition of high voltage-activated calcium channels by spider toxin PnTx3-6. *J Pharmacol Exp Ther.* 314, 1370-1377.
- Villas-Boas, I M, Gonçalves-de-Andrade, R M, Squaiella-Baptistão, C C, Sant'Anna, O A, Tambourgi, D V, 2013.** Characterization of phenotypes of immune cells and cytokines associated with chronic exposure to *Premolis semirufa* caterpillar bristles extract. *PLoS One* 8, e71938, 1-12.

- Volfova V, Veiseh, M, Gabikian, P, Bahrami, S B, Veiseh, O, Zhang, M, Hackman, R C, Kwok, D, 2007.** Tumor paint: a chlorotoxin: Cy5. 5 bioconjugate for intraoperative visualization of cancer foci. *Cancer Res.* 67, 6882-6888.
- Von Wirth, V.** Tarántulas fascinantes y exóticas. 1ra Edición. España: Editorial Hispano Europea, **2006**: 32-34.
- Wei, J M, Zhu, M W, Zhang, Z T, Jia, Z G, He, X D, Wan, Y L, Xu, J Y, 2010.** A multicenter, phase III trial of hemocoagulase Agkistrodon: hemostasis, coagulation, and safety in patients undergoing abdominal surgery. *Chin Med J.* 123, 589.
- Weisel-Eichler, A, Libersat, F, 2004.** Venom effects on monoaminergic systems. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol.* 190, 683-690.
- Windley, M J, Herzig, V, Dziemborowicz, S A, Hardy, M C, King, G F, Nicholson, G M, 2012.** Spider-venom peptides as bioinsecticides. *Toxins* 4, 191-227.
- Wong, H K, Bauer, P O, Kurosawa, M, Goswami, A, Washizu, C, Machida, Y, Nukina, N, 2008.** Blocking acid-sensing ion channel 1 alleviates Huntington's disease pathology via an ubiquitin-proteasome system-dependent mechanism. *Hum Mol Genet* 17, 3223-3235.
- Wullschlegel, B, Nentwig, W, Kuhn-Nentwig, L, 2005.** Spider venom: enhancement of venom efficacy mediated by different synergistic strategies in *Cupiennius salei*. *J Exp Biol.* 208, 2115–2121.
- Xiong, Z G, Zhu, X M, Chu, X P, Minami, M, Hey, J, Wei, W L, Simon, R P, 2004.** Neuroprotection in ischemia: blocking calcium-permeable acid-sensing ion channels. *Cell* 118, 687-698.
- Yocum, R C, Kennard, D, Heiner, L S, 2007.** Assessment and Implication of the Allergic Sensitivity to a Single Dose of Recombinant Human Hyaluronidase Injection: A Double-blind, Placebo-controlled Clinical Trial. *J Infus Nurs.* 30, 293-299.
- Zarychanski, R, Schulz, V P, Houston, B L, Maksimova, Y, Houston, D S, Smith, B, Gallagher, P G, 2012.** Mutations in the mechanotransduction protein PIEZO1 are associated with hereditary xerocytosis. *Blood* 120, 1908-1915.

12. ANEXOS

12.1 Valores de la Actividad hialuronidasa para el veneno de *P. ornata* a diferentes valores de pH y Temperatura.

| Temperatura (°C) | Actividad hialuronidasa TRU/mg (<i>n</i> =3) | Valor de pH | Actividad hialuronidasa TRU/mg (<i>n</i> =3) |
|------------------|---|-------------|---|
| 20 | 73.560 ± 1.4030 | 3 | 8.122 ± 0.4779 |
| 30 | 52.250 ± 1.2600 | 4 | 9.113 ± 1.0470 |
| 37 | 27.560 ± 0.9073 | 5 | 10.270 ± 0.5218 |
| 50 | 49.950 ± 0.7803 | 6 | 27.560 ± 0.9073 |
| 60 | 48.750 ± 1.1310 | 7 | 101.800 ± 2.1100 |
| 70 | 49.220 ± 2.3780 | 8 | Actividad nula |

12.2 Valores de la actividad hialuronidasa para el veneno de *P. regalis* a diferentes valores de pH y Temperatura.

| Temperatura (°C) | Actividad hialuronidasa TRU/mg (<i>n</i> =3) | Valor de pH | Actividad hialuronidasa TRU/mg (<i>n</i> =3) |
|------------------|---|-------------|---|
| 20 | 101.200 ± 1.2160 | 3 | 16.900 ± 0.5770 |
| 30 | 102.000 ± 1.3630 | 4 | 20.920 ± 2.7990 |
| 37 | 75.400 ± 1.6610 | 5 | 19.900 ± 0.8171 |
| 50 | 50.960 ± 1.7410 | 6 | 73.920 ± 1.3710 |
| 60 | 74.410 ± 1.7960 | 7 | 148.900 ± 2.9230 |
| 70 | 73.920 ± 1.3710 | 8 | Actividad nula |

12.3 Valores de la actividad hialuronidasa para el veneno de *P. rufilata* a diferentes valores de pH y Temperatura.

| Temperatura (°C) | Actividad hialuronidasa TRU/mg (n=3) | Valor de pH | Actividad hialuronidasa TRU/mg (n=3) |
|-------------------------|---|--------------------|---|
| 20 | 75.860 ± 1.4750 | 3 | 10.500 ± 0.2971 |
| 30 | 52.950 ± 1.5970 | 4 | 4.7970 ± 0.3009 |
| 37 | 50.150 ± 1.3620 | 5 | 8.5140 ± 0.4040 |
| 50 | 51.610 ± 1.4140 | 6 | 50.1500 ± 1.3620 |
| 60 | 48.150 ± 1.0020 | 7 | 195.2000 ± 3.9660 |
| 70 | 47.0600 ± 1.1930 | 8 | Actividad nula |

12.4 Valores de la actividad hialuronidasa para el veneno de *P. vittata* a diferentes valores de pH y Temperatura.

| Temperatura (°C) | Actividad hialuronidasa TRU/mg (n=3) | Valor de pH | Actividad hialuronidasa TRU/mg (n=3) |
|-------------------------|---|--------------------|---|
| 20 | 99.130 ± 1.9540 | 3 | 16.460 ± 0.6692 |
| 30 | 72.930 ± 1.9130 | 4 | 20.150 ± 0.3348 |
| 37 | 75.170 ± 1.6660 | 5 | 24.720 ± 1.0950 |
| 50 | 50.210 ± 1.5140 | 6 | 75.170 ± 1.6660 |
| 60 | 73.990 ± 1.8980 | 7 | 152.600 ± 1.9540 |
| 70 | 99.390 ± 1.6190 | 8 | Actividad nula |