



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES**

Centro de Ciencias Básicas

Departamento de Farmacología y Fisiología

Tesis

**Análisis comparativo del veneno de la *Latrodectus mactans* y su efecto
biológico en *Gromphadorhina portentosa* y rata**

**Tesis que presenta Alfonso Maximiliano Claros Guzmán para
optar por el
grado de: “*Doctorado en Ciencias Biológicas*”**

Tutor: Dr. Martín Gerardo Rodríguez

Asesor: Dr. Gerardo Alfonso Corzo Burguete

Asesor: Dr. Rodolfo González Segovia

Aguascalientes, Ags, 18/12/2020



M. en C. JORGE MARTÍN ALFÉREZ CHÁVEZ
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

PRESENTE

Por medio del presente como **Miembros del Comité Tutorial** designado del estudiante **Alfonso Maximiliano Claros Guzmán** con ID 69226 quien realizó la *tesis* titulado: **Análisis comparativo del veneno de la *Latrodectus mactans* y su efecto biológico en *Gromphadorhina portentosa* y rata**, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia damos nuestro consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que nos permitimos emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que *él* pueda proceder a imprimirlo así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Ponemos lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, le enviamos un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 17 de Diciembre de 2020

Dr. Martín Gerardo Rodríguez
Tutor de tesis

Dr. Gerardo Corzo Burguete
Asesor de tesis

Dr. Rodolfo González Segovia
Asesor de tesis

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado



DICTAMEN DE LIBERACION ACADEMICA PARA INICIAR LOS TRAMITES DEL EXAMEN DE GRADO



Fecha de dictaminación dd/mm/aa: 31-may-21

NOMBRE: ALFONSO MAXIMILIANO CLAROS GUZMAN **ID** 69226

PROGRAMA: DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS **LGAC (del posgrado):** TOXICOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA AMBIENTAL

TIPO DE TRABAJO: () Tesis () Trabajo práctico

TÍTULO: Análisis comparativo del veneno de la *Latrodectus mactans* y su efecto biológico en *Gromphadorhina portentosa* y rata
IMPACTO SOCIAL (señalar el impacto logrado):

ESTUDIO QUE PERMITE DETERMINAR EL EFECTO QUE TIENE EL VENENO DE LA LOMBRIZ DE TIERRA SOBRE LA CUCARACHA Y LA RATA, COMO UN POSIBLE CONTROL EN EL FUTURO PARA PLAGAS

INDICAR SI/NO SEGÚN CORRESPONDA:

Elementos para la revisión académica del trabajo de tesis o trabajo práctico:

- SI El trabajo es congruente con las LGAC del programa de posgrado
- SI La problemática fue abordada desde un enfoque multidisciplinario
- SI Existe coherencia, continuidad y orden lógico del tema central con cada apartado
- SI Los resultados del trabajo dan respuesta a las preguntas de investigación o a la problemática que aborda
- SI Los resultados presentados en el trabajo son de gran relevancia científica, tecnológica o profesional según el área
- SI El trabajo demuestra más de una aportación original al conocimiento de su área
- SI Las aportaciones responden a los problemas prioritarios del país
- NO Generó transferencia del conocimiento o tecnológica

El egresado cumple con lo siguiente:

- SI Cumple con lo señalado por el Reglamento General de Docencia
- SI Cumple con los requisitos señalados en el plan de estudios (créditos curriculares, optativos, actividades complementarias, estancia, predoctoral, etc)
- SI Cuenta con los votos aprobatorios del comité tutorial, en caso de los posgrados profesionales si tiene solo tutor podrá liberar solo el tutor
- SI Cuenta con la carta de satisfacción del Usuario
- SI Coincide con el título y objetivo registrado
- SI Tiene congruencia con cuerpos académicos
- SI Tiene el CVU del Conacyt actualizado
- SI Tiene el artículo aceptado o publicado y cumple con los requisitos institucionales (en caso que proceda)

En caso de Tesis por artículos científicos publicados:

- SI Aceptación o Publicación de los artículos según el nivel del programa
- SI El estudiante es el primer autor
- SI El autor de correspondencia es el Tutor del Núcleo Académico Básico
- SI En los artículos se ven reflejados los objetivos de la tesis, ya que son producto de este trabajo de investigación.
- SI Los artículos integran los capítulos de la tesis y se presentan en el idioma en que fueron publicados
- SI La aceptación o publicación de los artículos en revistas indexadas de alto impacto

Con base a estos criterios, se autoriza se continúen con los trámites de titulación y programación del examen de grado

Sí
 No

FIRMAS

Elaboró:

* NOMBRE Y FIRMA DEL CONSEJERO SEGÚN LA LGAC DE ADSCRIPCIÓN:

DRA. ALMA LILIAN GUERRERO BARRERA

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO TÉCNICO:

DRA. ALMA LILIAN GUERRERO BARRERA

* En caso de conflicto de intereses, firmará un revisor miembro del NAB de la LGAC correspondiente distinto al tutor o miembro del comité tutorial, asignado por el Decano.

Revisó:

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO:

DRA. HAYDÉE MARTÍNEZ RUVÁLCABA

Autorizó:

NOMBRE Y FIRMA DEL DECANO:

M. en C. JORGE MARTÍN ALFÉREZ CHÁVEZ

Nota: procede el trámite para el Depto. de Apoyo al Posgrado

En cumplimiento con el Art. 105C del Reglamento General de Docencia que a la letra señala entre las funciones del Consejo Académico: Cuidar la eficiencia terminal del programa de posgrado y el Art. 105F las funciones del Secretario Técnico, llevar el seguimiento de los alumnos.



Three-dimensional analysis of the heart function and effect cholinergic agonists in the cockroach *Gromphadorhina portentosa*

Alfonso Claros-Guzmán¹ · Martín G. Rodríguez¹ · Birmania Heredia-Rivera¹ · Rodolfo González-Segovia²

Received: 29 May 2019 / Revised: 16 August 2020 / Accepted: 19 August 2020
© The Author(s) 2020

Abstract

Many relevant aspects of mammal's cardiac physiology have been mainly investigated in insect models such as *Drosophila melanogaster* and *Periplaneta americana*. Cardiac function has been poorly studied in the cockroach *Gromphadorhina portentosa*, which has some advantages for experimental purposes such as an easier culture, bigger organs and a robust physiology. On the other hand, the study of cardiac physiology in insects has been largely improved since the arrival of digital imaging technologies for recording purposes. In the present work, we introduce a methodology of video recording coupled to an isotonic transducer for a three-dimensional analysis of the heart and intracardiac valves of *G. portentosa*. We used this methodology for assessing the physiological responses of the cockroach heart upon the application of different cholinergic neurotransmitters (acetylcholine, nicotine and muscarine). We recorded in detail the relationship between intracardiac valves movement, hemolymph flow, diastole and systole. Acetylcholine and nicotine induced a biphasic effect on the cardiac frequency. Acetylcholine increased the diastolic opening. Nicotine at high concentration caused paralysis. Muscarine induced no major effects. These findings suggest a combined action of cholinergic agonists for a finely tuned the cardiac frequency, intracardiac valves function and cardiac cycle.

Keywords Dorsal vessel · Intracardiac valves · Acetylcholine · Cardiovascular · Nicotine

Introduction

Although mammals and insects are phylogenetically very distant, their physiology is unexpectedly very similar. For example, the heart activity assessment by current electronic recording techniques have demonstrated that pulsations of insect and human hearts are regulated by similar myogenic mechanisms based on the depolarisation of myocardial cells (Sláma 2012). Therefore, the study of the cardiovascular system in insect models remains relevant biological research.

These similarities between insects and vertebrates extend to basic elements of development, functions and aging (Berh et al. 2018), for instance various studies indicate a number of genes in *D. melanogaster* implicated in cardiac function regulation, muscle contractile proteins and ion channels that are similar to those in mammals (Akasaka et al. 2006; Malloy et al. 2016).

The main propulsion organ in insect circulatory system is the dorsal vessel this cavity is located underneath the dorsal epidermis and circulates insect hemolymph between the three major body compartments (head, thorax, and abdomen) which are mutually interconnected and form the so called "hemocoelic cavity". Likewise to mammalian blood, the hemolymph provides nutrients, gas exchange and signalling molecules to different the body compartments. The dorsal vessel in adult insects consists of a narrow elastic tube called the thoracic aorta and a larger abdominal portion that is called heart. Its myogenic function is characterised by a very regular reversal flow with three distinctive phases: (a) a backward oriented (retrograde) cardiac pulsation; (b) a forward-oriented (anterograde) pulsation with faster frequency; and (c) shorter or longer periods of temporary cardiac

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00359-020-01443-5>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Martín G. Rodríguez
romag18@hotmail.com

¹ Department of Pharmacology and Physiology, Autonomous University of Aguascalientes, 940 Av. Universidad, Aguascalientes 20130, México

² Department of Microbiology, Autonomous University of Aguascalientes, 940 Av. Universidad, Aguascalientes 20130, México

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo no solo es producto de mi esfuerzo; si no que es el conjunto de apoyos que recibí tanto de instituciones, como de personas que fueron fundamentales para que este proyecto se llevara a cabo. Por lo tanto, es mi deber agradecer de todo corazón primeramente a la Universidad Autónoma de Aguascalientes y al CONACyT por el gran apoyo que me brindaron para terminar este doctorado; así mismo debo agradecer a mi tutor el Doctor Martín Gerardo Rodríguez; mi asesor el Doctor Rodolfo González Segovia y al Doctor Gerardo Corzo Burguete. Su ayuda fue indispensable tanto para llevar a cabo el proyecto, como para poder mantenerme. También quiero agradecer a la coordinación del doctorado y apoyo al postgrado de la Universidad Autónoma de Aguascalientes por su apoyo y la inmensa paciencia que me tuvieron. Finalmente, también aprovecho para agradecer a las técnicas del laboratorio María Espino López, Cecilia Muñoz Ríos y a Elizabeth Verónica Moreno Córdova, por su muy apreciable ayuda. A mi estimado estudiante Israel Alejandro Muñoz por los buenos, divertidos y perturbadores ratos en el laboratorio. A mi querida hermana Fátima Humelia Claros Guzmán, quien me ayudó mucho con las ilustraciones y calidad de las imágenes; a mis queridas amigas Cristina González Ramírez y Lia Isaura Arteaga Sandoval quienes siempre me apoyaron moralmente; a mis padres Manuel Ricardo Claros Negrete y María de Jesús Guzmán García, así como, a mi hermano Manuel Ricardo Claros Guzmán, de quienes les agradezco inmensamente darme fuerzas para sacar este trabajo adelante.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo primeramente a Dios; a mis padres María de Jesús Guzmán García y Manuel Ricardo Claros Negrete, a mis amados hermanos Fátima Humelia Claros Guzmán y Manuel Ricardo Claros Guzmán. A mis queridos amigos Cristina González Ramírez, Lia Isaura Arteaga Sandoval, Leobardo David González Cabrera, y a todos aquellos que me han inspirado a seguir adelante en este trabajo.



INDICE GENERAL

Resumen	7
Abstract	9
Introducción	11
I. Marco teórico	13
1. Los insectos	13
1.1 Importancia de los insectos	13
1.2 Anatomía general de <i>Gromphadorina portentosa</i> .	14
1.3 Anatomía y fisiología del sistema cardiovascular de los insectos.	17
2. Generalidades del sistema cardiovascular de los mamíferos.	21
2.1 Características generales del corazón.	21
2.2 Control del corazón por los nervios simpáticos y parasimpáticos.	30
2.3 Mecanismo de los efectos vagales	32
2.4 Efecto de la estimulación simpática sobre el ritmo y la conducción del corazón.	32
2.5 Breve descripción sobre la arteria caudal de la rata.	33
2.6 Medición de la presión arterial en ratas.	35
2.7 Oximetría de pulso.	38
3. Veneno de <i>Latrodectus mactans</i> .	41
3.1 Características del veneno de <i>Latrodectus mactans</i> .	41
II. Hipótesis	46
III. Objetivos	46
IV Materiales y Método	47
4.1 Obtención de los organismos	47

4.2 Extracción del veneno de <i>L. mactans</i>	48
4.3 Caracterización del veneno de <i>L. mactans</i>	49
4.3.1 Preparación de gel de Electroforesis	49
4.3.2 Preparación de Westernblot	50
4.4 Preparación fisiológica semi-aislada del vaso dorsal de <i>G. portentosa</i>	51
4.5 Análisis en 3 dimensiones del vaso dorsal de <i>G. portentosa</i>	51
4.6 Evaluación funcional de la preparación cardiaca semi-aislada de <i>G. portentosa</i>	52
4.7 Pruebas del veneno crudo de <i>L. mactans</i> sobre la preparación cardiaca semi-aislada de <i>G. portentosa</i> y rata	54
4.7.1 Pruebas en el corazón de <i>G. portentosa</i>	54
4.7.2 Análisis del veneno de <i>L. mactans</i> en rata	56
4.8 Análisis estadístico	59
V. Resultados	59
5.1 Caracterización y separación del veneno de <i>L. mactans</i>	59
5.2 Caracterización de la preparación cardiaca de <i>G. portentosa</i>	73
5.3 Efectos del veneno crudo y fraccionado de <i>L. mactans</i> sobre la preparación cardiaca semi-aislada de <i>G. portentosa</i>	82
5.4 Efectos del veneno en el sistema cardiovascular de la rata	94
VI. Discusión	97
6.1 Obtención y análisis del veneno de <i>L. mactans</i>	97
6.2 Análisis tridimensional de la función cardíaca	98
6.3 Un modelo conveniente: <i>Gromphadorhina portentosa</i>	99
6.4 Caracterización de las respuestas colinérgicas en <i>G. portentosa</i>	100
6.5 Efectos del veneno en rata y <i>G. portentosa</i>	103
VII. Conclusión	105
VIII. Bibliografía	106

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
Figura 1.	Anatomía externa de las cucarachas de la especie <i>G. portentosa</i> masculina y femenina.	15
Figura 2.	Diagrama anatomía externa del grillo <i>Achaeta domesticus</i> .	16
Figura 3.	Vista ventral del vaso dorsal de <i>G. portentosa</i> .	19
Figura 4.	Anatomía interna del corazón de la rata.	22
Figura 5.	Potenciales de acción rítmicos (en mV) de una fibra de Purkinje y de una fibra muscular ventricular.	25
Figura 6.	Acontecimientos del ciclo cardíaco en humanos.	27
Figura 7.	Nervios simpáticos y parasimpáticos cardíacos.	31
Figura 8.	Diagrama de las arterias mayores de la rata y diagrama de una vista en sección transversal de una cola de rata.	34
Figura 9.	Presión del brazalete con sonidos de Korotkoff superpuestos y oscilaciones amplificadas en la presión del cuffer.	37
Figura 10.	<i>Gromphadorina portentosa</i> y espécimen de <i>Latrodectus mactans</i> .	48
Figura 11.	Tanque de CO2 modificado.	49
Figura 12.	Preparación cardíaca semi-aislada de <i>G. portentosa</i> .	53
Figura 13.	Representación esquemática de la preparación fisiológica cardíaca semi-aislada de <i>G. portentosa</i> .	53
Figura 14.	Preparación cardíaca semi-aislada de <i>G. portentosa</i> (con electrodos).	56
Figura 15.	Acomodo de la rata para registrar los efectos del veneno de <i>L. mactans</i> sobre el sistema cardiaco.	58

Figura 16a.	Análisis del veneno crudo de <i>L. mactans</i> por Westernblot.	60
Figura 16b.	Electroforesis SDS PAGE del veneno de <i>L. mactans</i> .	61
Figura 16c.	Westernblot con muestras de veneno de <i>L. mactans</i> .	62
Figura 17a.	Cromatograma de HPLC intercambio iónico.	64
Figura 17b.	Electroforesis de las muestras obtenidas por el HPLC de intercambio iónico.	65
Figura 18.	Cromatograma de las muestras obtenidas por el HPLC de exclusión de tamaño.	68
Figura 19a.	Geles de electroforesis de las muestras obtenidas por el HPLC de exclusión de tamaño (parte 1).	69
Figura 19b.	Geles de electroforesis de las muestras obtenidas por el HPLC de exclusión de tamaño (parte 2).	70
Figura 19c.	Placas de Westernblot de las muestras obtenidas por el HPLC de exclusión de tamaño.	72
Figura 20.	Grabación sincronizada de diástole y sístole cardíaca con el Biopac MP150 y las fotos de la grabación de video	74
Figura 21.	Efectos de ACh en el corazón y la válvula intracardíaca, registrados por transductor isotónico sincronizado y acoplado al Biopac MP150	76
Figura 22.	Efectos de la adición de ACh (1 mM y 5,5 mM) en las preparaciones de corazón semi-aisladas de <i>G. portentosa</i>	77
Figura 23.	Efectos de la adición de nicotina (0,53 μ M y 5,3 μ M) a las preparaciones de corazón semi-aisladas de <i>G. portentosa</i>	79
Figura 24.	Efectos de la adición de muscarina (0,01 mM, 1 mM y 5,5 mM) a las preparaciones de cardíaca semi-aisladas de <i>G. portentosa</i>	81
Figura 25.	Efectos del veneno crudo de <i>L. mactans</i> en el corazón semi-aislado de <i>G. portentosa</i>	84

Figura 26.	Efectos de las fracciones de veneno de <i>L. mactans</i> en el pulso cardiaco del corazón de <i>G. portentosa</i>	86
Figura 27.	Efectos de las fracciones de veneno de <i>L. mactans</i> en la apertura diastólica del corazón de <i>G. portentosa</i> con la fracción del tubo 15	86
Figura 28.	Efectos del veneno fraccionado de <i>L. mactans</i> en la frecuencia cardiaca de la preparación semi-aislada de <i>G. portentosa</i>	88
Figura 29.	Efectos del veneno fraccionado de <i>L. mactans</i> sobre la apertura diastólica cardiaca de la preparación semi-aislada de <i>G. portentosa</i>	89
Figura 30.	Efectos del veneno fraccionado de <i>L. mactans</i> sobre la amplitud de la onda diastólica, de la preparación cardiaca semi-aislada de <i>G. portentosa</i>	90
Figura 31.	Efectos del veneno fraccionado de <i>L. mactans</i> sobre la frecuencia eléctrica cardiaca, de la preparación cardiaca semi-aislada de <i>G. portentosa</i>	91
Figura 32.	Trazos de las fracciones de los tubos 18 y 17 sobre el corazón de la preparación cardiaca semi-aislada de <i>G. portentosa</i>	93
Figura 33.	Gráficas de la adición de la mezcla de veneno con antiveneno: frecuencia cardiaca (mecánica)	94
Figura 34.	Efectos del veneno de <i>L. mactans</i> en el ritmo cardiaco de la rata	95
Figura 35.	Efectos del veneno de <i>L. mactans</i> en la presión diastólica de la rata	96

INDICE DE TABLAS

Tabla		Página
Tabla 1.	Cuantificación de proteínas por microespectrofotometría (nanodrop) de cada una de las muestras sacadas por HPLC de intercambio iónico.	63
Tabla 2.	Muestras de veneno crudo obtenidas de <i>L. mactans</i> .	66
Tabla 3.	Determinación de la concentración de proteínas de las fracciones del veneno de <i>L. mactans</i> por NanoDrop.	67

RESUMEN

Los componentes activos de los venenos de algunas especies de arañas se han estudiado ampliamente debido a su potencial para el desarrollo de nuevos insecticidas biológicos y fármacos clínicos. Entre ellas, están las arañas pertenecientes al género *Latrodectus*, que comúnmente son conocidas como "arañas viudas", y se encuentran entre las más venenosas.

Las arañas del género *Latrodectus* ("arañas viudas" o "viudas negras") se distribuyen en todo el mundo. La toxicidad del veneno de estas arañas se conoce desde el comienzo de la historia de la medicina, por los diversos síntomas que pueden presentar sus víctimas humanas. Sin embargo, también se han registrado sus efectos en insectos. Por lo que, en base a los síntomas observados en vertebrados e invertebrados envenenados, el veneno de las arañas del género *Latrodectus* es comúnmente clasificado como neurotóxico.

Los componentes proteicos del veneno así clasificados son neurotoxinas conocidas como latrotoxinas de alto peso molecular (>110 kDa) y causan la liberación de neurotransmisores de la terminal nerviosa. Las latrotoxinas, tienen efectos para vertebrados, insectos y crustáceos. La mayoría de ellas son contra insectos, denominadas como Latroinsectotoxinas y se conocen 5 tipos (α , β , γ , δ y ϵ); α -Latrocrutotoxina, específica para crustáceos y α -Latrotoxina específica contra vertebrados.

En este trabajo se presenta el análisis de los efectos del veneno de la especie *Latrodectus mactans* del estado de Aguascalientes, México. Estos análisis fueron enfocados a los efectos que los venenos de estas arañas pueden causar en el funcionamiento cardíaco de vertebrados e insectos. Cabe mencionar que estos efectos han sido muy poco estudiados. Además, se desarrolló métodos novedosos para análisis de los efectos biológicos del veneno en la función cardíaca de dos modelos animales, el modelo cardiovascular de la rata y el modelo cardíaco semi-aislado de *Gromphadorina portentosa*.

Con el propósito de registrar cualquier efecto del veneno de araña *L. mactans*, sobre la fisiología mecánica cardíaca, se desarrolló un método novedoso que nos permitió analizar la función cardíaca de *G. portentosa* en tres dimensiones. Para ello, primero se realizaron experimentos donde se registraron los efectos de agonistas colinérgicos sobre la función del corazón y las válvulas intracardiacas. Los resultados sugieren que estos compuestos inducen respuestas bifásicas sobre la frecuencia cardíaca, el ciclo cardíaco y la función de los músculos de las válvulas intracardiacas. Esto representa un enfoque sólido y más detallado para explorar cambios dinámicos en la fisiología del sistema circulatorio en insectos.

Los efectos del veneno crudo de *L. mactans* tuvieron diversos efectos sobre la función cardíaca de *G. portentosa*, las cuales consistieron de una respuesta bifásica en la frecuencia cardíaca y alteraciones en la diástole del corazón. Mientras que las fracciones de del veneno, mostraron la posibilidad de un componente proteico de bajo peso molecular que está entre 15 y 20 kDa, el cual es capaz de disminuir la frecuencia cardíaca y provocar paro de la función del corazón.

Para registrar los efectos del veneno de *L. mactans* en la función cardíaca de la rata, se desarrolló un nuevo sistema no invasivo, basado en el uso de oxímetro de pulso y un brazalete inflable. Ambos sistemas adaptados a la cola de la rata y registrados por el sistema Biopac MP36. Este sistema nos permitió determinar que el veneno es capaz de aumentar la frecuencia cardíaca y la presión arterial de la rata.

ABSTRACT

Some species of spiders have components in their venom which have been extensively studied, due to their potential for the development of new biological insecticides and clinical drugs. Among them are spiders belonging to the genus *Latrodectus*. They are known as "widow spiders", and are among the most poisonous.

The genus *Latrodectus* ("widow spiders" or "black widow spiders") are widely distributed in the world. The venom toxicity of these spiders are known since the beginning of the medicine history, due to the different symptoms that its human victims may present. However, its effects on insects have also been recorded. Therefore, based on the symptoms observed in poisoned vertebrates and invertebrates, the venom of spiders of the genus *Latrodectus* is commonly classified as neurotoxic.

The protein components of the venom, thus classified as neurotoxins, are known like latrotoxins with high molecular weight (>110 kDa) and cause the release of neurotransmitter of the nerve terminal. The latrotoxins cause effects to vertebrates, insects and crustacean. Most of them are against insects, called Latroinsectotoxins and 5 types are known (α , β , γ , δ y ϵ); α -Latrocrustotoxin, specific for crustacean and α -Latrotoxin, specific for vertebrates.

The present thesis work, we show an analysis of the venom effects of the specie *Latrodectus mactans* from Aguascalientes, Mexico. These analyzes were focused on the effects that the venoms of these spiders can cause on the heart function of vertebrates and insects. Moreover, the effects of *L. mactans* venom reported in this work have been few studied. In addition, we develop new methods to analyze the biological effects of venom on the cardiac function from two animal models, the rat cardiovascular model and the semi-isolate cardiac model of *Gromphadorina portentosa*.

In order to record any effect of the *L. mactans* spider venom on cardiac physiology, a novel method was developed. This last one allowed us to analyze the cardiac function of *G.*

portentosa in three dimensions. Consecutively, the first experiments were carried out recording the effects of cholinergic agonist on the cardiac function and the intracardiac valves.

Our results suggested that these compounds induce biphasic responses on heart rate, cardiac cycle, and function of intracardiac valve muscle function. Thus, it represents a robust and more detailed approach to explore dynamic changes in the physiology of the circulatory system in insects.

The effects of the crude extract of *L. mactans* venom had various effects on cardiac function of *G. portentosa*, which consisted of a biphasic response on the heart rate and alterations in the diastole of the heart. While the fractions of the venom showed the possibility of a low molecular weight protein component, between 15 and 20 kDa, which is capable of slowing the heart rate and causing arrest of the heart function.

In the experiments to record the effects of *L. mactans* venom on rat cardiac function, a new non-invasive system was developed, based on the use of a pulse oximeter and an inflatable cuff. Both systems were adapted to the tail of the rat. The tests were recorded by the Biopac MP36 system. This system allowed us to determine that the venom is capable of increasing the heart rate and blood pressure of the rat.

INTRODUCCIÓN

Las arañas son típicamente depredadores de insectos, incluidas plagas como cucarachas, moscas, saltamontes, pulgones, escarabajos, grillos y polillas. Por lo tanto, las arañas son agentes eficientes de control biológico de plagas. El veneno de araña paraliza, mata y digiere eficazmente a las presas. Los componentes activos de los venenos de algunas especies de arañas se han estudiado ampliamente debido a su potencial para el desarrollo de nuevos insecticidas biológicos y fármacos clínicos. Las arañas *Latrodectus*, comúnmente conocidas como "arañas viudas", se encuentran entre las más venenosas (Wang y col. 2019).

Debido a su potente toxicidad tanto para los mamíferos como para los insectos, y el daño frecuente a los humanos, estas arañas se han estudiado durante años. En los últimos años, debido a los avances en bioquímica y otras técnicas relevantes, *Latrodectus* spp. han sido objeto de varias investigaciones, que le han dado un lugar de importancia científica al estudio de estas arañas (Wang y col. 2019).

Las arañas del género *Latrodectus* ("arañas viudas" o "viudas negras") se distribuyen en todo el mundo. La toxicidad de sus picaduras se conoce desde el comienzo de la historia de la medicina. Los reportes médicos señalan que las picaduras provocan un dolor severo en el sitio de inoculación del veneno, que irradia, provocando calambres musculares, espasmos, malestar motor, salivación, sudoración, opresión precordial, hipertensión, abdomen en forma de tabla, oliguria, ansiedad, excitación mental y agonía. dolor; además, estos síntomas son responsables tanto del "pavor mortis" que experimentan algunos pacientes tras la mordedura como de la prolongada convalecencia. La muerte no es común, pero si ocurre, generalmente se debe a edema pulmonar e insuficiencia cardíaca (de Roodt y col. 2017).

En base a los síntomas observados en vertebrados e invertebrados envenenados, el veneno de las arañas del género *Latrodectus* es clasificado como neurotóxico (Vicari y col. 1965; Krasnoperov y col. 1997; de Roodt y col. 2017; Wang y col. 2019). Las neurotoxinas del veneno de las arañas son de naturaleza proteica y se clasifican de acuerdo a su peso molecular

en (>110 kDa) y causan la liberación de neurotransmisores (norepinefrina y acetil colina) (Dulubova y col. 1996; Wang y col. 2019). Las toxinas a la que se le atribuye ser la responsable de la mayoría de la neurotoxicidad asociada con el veneno de las arañas viudas son conocidas como latrotoxinas, que pueden inducir un incremento en la secreción de neurotransmisores de las terminales nerviosas, y tienen efectos para vertebrados, insectos y crustáceos. La mayoría de ellas son contra insectos, denominadas como Latroinsectotoxinas y se conocen 5 tipos (α , β , γ , δ y ϵ) (Umbach y col.1998; Dulubova y col. 1996); α -Latrocrutotoxina, específica para crustáceos y α -Latrotoxina específica contra vertebrados, de la cual esta última, es la más caracterizada (Silva y col. 2009). Estos pueden inducir un incremento en la secreción de neurotransmisores de las terminales nerviosas, las cuales pueden ser específicos para vertebrados, insectos y crustáceos (Wang y col. 2007).

Aunque los mamíferos y los insectos son filogenéticamente muy distantes, su fisiología es inesperadamente muy similar. Por ejemplo, la evaluación de la actividad cardíaca mediante las técnicas de registro electrónico actuales ha demostrado que las pulsaciones de los corazones de insectos y humanos están reguladas por mecanismos miogénicos similares basados en la despolarización de las células miocárdicas (Sláma 2012). Por lo que el estudio del sistema cardiovascular en modelos de insectos sigue siendo una investigación biológica relevante.

El análisis fisiológico de la función cardíaca comparada en los insectos, se ha estudiado más en las moscas Drosófilidas. Sin embargo, estudiar este tipo de organismos puede ser una tarea desafiante porque son pequeños y tienen un pulso cardíaco elevado. Las cucarachas son una alternativa interesante ya que son más grandes, económicas, resistentes a enfermedades y traumas, insensibles al dolor, y se pueden hacer muchos análogos funcionales entre los sistemas de cucarachas y mamíferos. La mayoría de los reportes sobre la función cardíaca se han realizado en *Periplaneta americana* (Krijgsman y Krijgsman-Berger, 1951; Ludwig y col. 1957; Miller 1968 a, b; Collins y Miller, 1977; Pass y col. 1988). Por el contrario, la cucaracha silbante de Madagascar (*Gromphadorhina portentosa*) ha atraído menos atención, pero tiene algunas ventajas para la fisiología experimental, ya que es más robusta y relativamente más fácil de cultivar (Claros y col. 2020).

I. MARCO TEÓRICO.

1. LOS INSECTOS

1.1 IMPORTANCIA DE LOS INSECTOS

Los insectos siempre han sido un factor importante en la sociedad y la cultura humana. Ellos han inspirado terror, fascinación, belleza y, a la vez, han sido un azote a la humanidad, debido a que son causantes de las pérdidas de alimentos y enfermedades. No obstante, a pesar de sus efectos negativos, dependemos de ellos para la polinización y por sus productos. Siendo los insectos el más grande grupo de seres vivos en el planeta (75% de todas las especies animales) (Resh y Cardé, 2003). Estos organismos son tan variados en forma y están adaptados a tan diversas condiciones de vida, que constituyen un grupo muy especial para estudios fisiológicos. El estudio de la Fisiología comparada constituye un campo amplio, variado y asombroso (Llanderal y Cibrián, 1983). Considérese simplemente el hecho de que la clase de los insectos está constituida de 900,000 especies descritas aproximadamente (Resh y Cardé, 2003) que necesariamente tienen características fisiológicas que difieren en menor o mayor grado entre sí. La necesidad de estudiar la fisiología de los insectos es evidente, tanto por la importancia que tienen por sí misma, como la relación con otras áreas de la entomología, así como con muy diversos campos de la Biología. La Biología constituye parte esencial de la entomología básica y aplicada, pues tiene relación estrecha tanto con la morfología, o el comportamiento de los insectos, como con la toxicología de los insecticidas y otras formas de control de la población de insectos (Llanderal y Cibrián, 1983).

Probablemente la mejor justificación para cualquier investigación sobre insectos es que los insectos tienen un impacto directo en la economía humana. Tan solo en los Estados Unidos, Causan pérdidas por billones de dólares en cultivos básicos, cultivos de frutas, invernaderos y productos de viveros, además a productos forestales, ganado, granos almacenados y alimentos, ropa, artículos de uso doméstico envasado y muebles, o tan solo donde la gente

intente cultivar o construir. Asimismo, pueden causar grandes pérdidas de vidas humanas como vectores de patógenos, debido a que son vectores que transmiten malaria, fiebre amarilla, dengue, tifus, varias formas de encefalitis, peste negra, ceguera de los ríos e innumerables enfermedades que pueden debilitar o matar (Resh y Cardé, 2003).

Cabe mencionar que los insectos también generan beneficios económicos, tales como la polinización de los cultivos, que en los Estados Unidos genera 9 billones de dólares en ganancias cada año; además están los productos producidos por los insectos como la miel, cera, laca, seda y otros productos que contribuyen con millones de dólares en ganancias. También se debe mencionar el papel de los insectos en el control biológico de las plagas y malezas, que generan ganancias adicionales (Resh y Cardé, 2003).

1.2 ANATOMÍA GENERAL DE *Gromphadorina portentosa*

En la especie de cucaracha *G. portentosa* se presenta dimorfismo sexual que simplifica la determinación del sexo. Los machos de *G. portentosa* tienen grandes protuberancias o cuernos en el pronoto (**Figura 1a**). A menudo las personas confunden los cuernos con los ojos, que en realidad son mucho más pequeños y están ubicados debajo del pronoto de la cabeza (**Figura 1b**). Como todos los insectos, *G. portentosa* tienen tres partes distintas del cuerpo o tagmata (cabeza, tórax y abdomen), tres pares de patas, ojos compuestos y un par de antenas. Como todas las cucarachas, *G. portentosa* también tienen un par de apéndices sensoriales al final del abdomen conocidos como cercos o cerci (**Figura 1a**). Otras características externas que vale la pena examinar incluyen partes de la pierna: coxa, trocánter, fémur, tibia y tarso; escleritos dorsal y ventral; y espiráculos (William y col. 2012).

Las piezas bucales de *G. portentosa* son del tipo de masticación simple, que se mueven de anterior a posterior, las piezas bucales son labrum, mandíbulas, maxilares y labio (**Figura 1b**). El labrum sirve como una especie de "labio superior", se mueve a lo largo del eje longitudinal del cuerpo del insecto y está articulado con el clípeo. Las mandíbulas son estructuras masticatorias emparejadas análogas a las mandíbulas de los vertebrados. Las

mandíbulas se mueven lateralmente y tienen una amplia superficie de masticación en esta especie. Los maxilares también están emparejados y equipados con palpos para la manipulación de alimentos. El labio está equipado con palpos, que ayuda con la manipulación de alimentos y cierra la boca posteriormente (**Figura 1b**) (William y col. 2012).

El abdomen de los insectos adultos consiste típicamente de 11 a 12 segmentos y es menos esclerotizado que la cabeza y el tórax. Cada segmento abdominal está representado por una esclerotización conocida como tergum (terguito), un esternum (esternito), y además un pleurito. Los terguitos o escleritos (sclerites) están separados unos de otros, del esternito adyacente y de los pleuritos por una membrana. Los espiráculos (orificios por donde respiran los insectos) están localizados en el área abdominal pleural (**Figura 2**) (Claros 2015).

El abdomen está más conspicuamente segmentado que la cabeza y el tórax. Superficialmente el abdomen es el menos especializado del cuerpo del insecto, pero hay notables excepciones tales como las cochinillas (cocoideos). El abdomen carece de apéndices, excepto por el cerco (órganos táctiles), los órganos reproductivos y los apéndices pregenitales (Claros 2015).

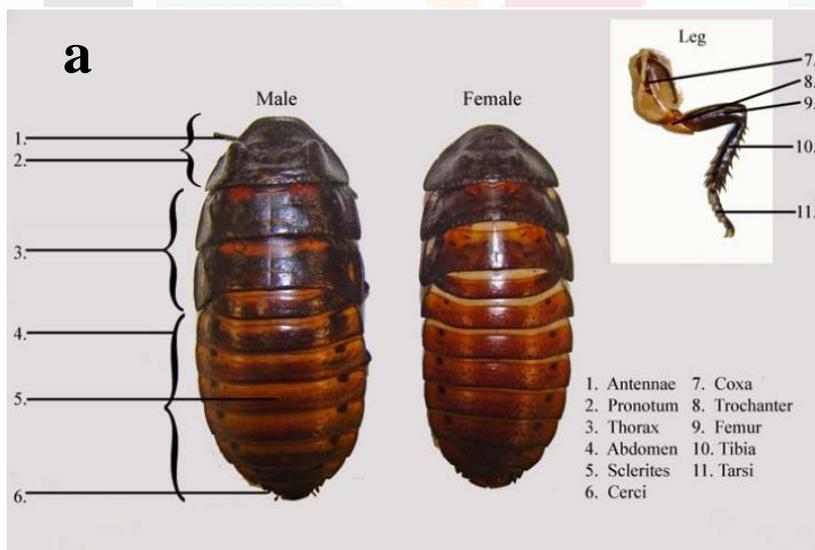


Figura 1. Anatomía externa de las cucarachas de la especie *G. portentosa* masculina y femenina. Incluye el primer plano de la pierna (a). Primer plano de la anatomía de la cabeza y la boca de *G. portentosa* (b) (William y col. 2012)

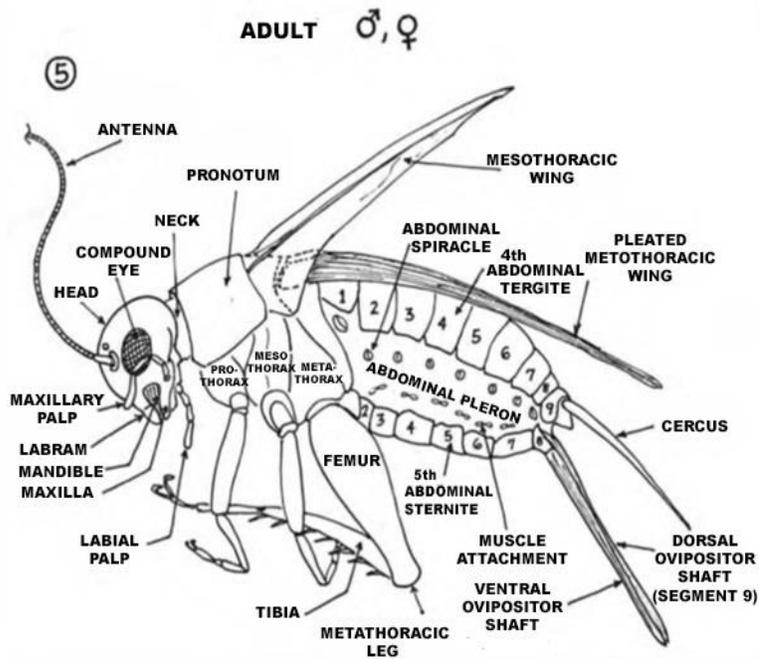
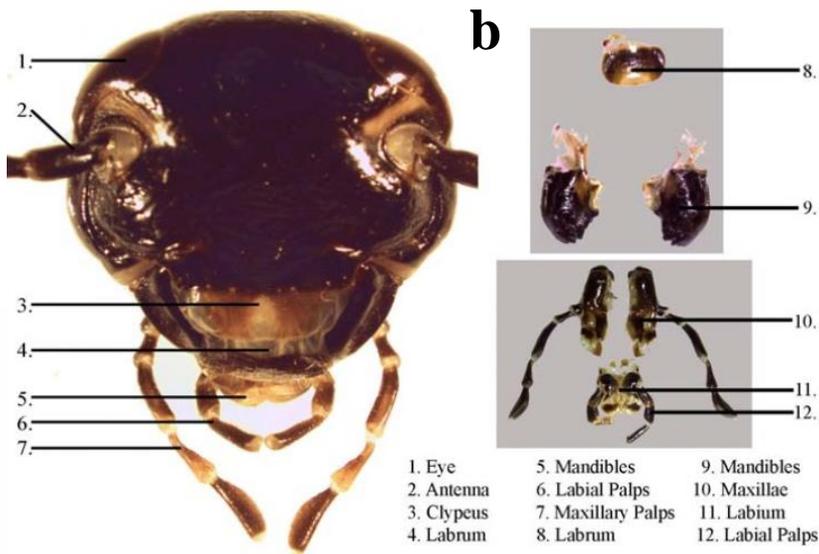


Figura 2. Diagrama anatomía externa del grillo *Achaeta domestica*

1.3 ANATOMÍA Y FISIOLÓGÍA DEL SISTEMA CARDIOVASCULAR DE LOS INSECTOS

Los insectos poseen un sistema circulatorio abierto, es decir, que sus órganos internos y tejidos están bañados por la hemolinfa, que es activamente impulsado por toda la superficie interna por bombas especializadas, pulsos de presión y movimientos del cuerpo a través de los vasos, tubos y diafragmas, sin este constante movimiento, los tejidos podrían morir. Los órganos y tejidos internos dependen del sistema circulatorio para el intercambio de nutrientes, para acarrear productos de desechos y como una vía de comunicación para mensajeros hormonales que coordinan el desarrollo y otros procesos (Resh y Cardé 2003).

Este sistema circulatorio provee de un medio en donde se libran batallas entre el insecto hospedador y microorganismos patógenos, entre los que incluyen bacterias, virus, hongos e insectos parásitos. Los principales participantes en esta interacción son las células sanguíneas o hemocitos (Resh y Cardé 2003).

El principal órgano responsable de la circulación es el vaso dorsal, el cual se extiende a lo largo de la línea media dorsal del cuerpo y comprende dos regiones, el corazón que es el órgano de bombeo y la aorta que funciona como un vaso conductor. En general el corazón de los insectos es un órgano tubular, propagando ondas de contracciones peristálticas hacia adelante (larvas), o en dirección hacia adelante y hacia atrás, que es como se conoce al latido retrogrado (pupas y adultos). En consecuencia, el corazón de los insectos es mayormente usado para mezclar la hemolinfa en las cavidades cefálica, torácica y abdominal del cuerpo del insecto. Debido a la capacidad limitada de bombeo de su corazón, los insectos han desarrollado adaptaciones auxiliares circulatorias, tales como la presencia de órganos pulsátiles de los apéndices, pulsaciones peristálticas del intestino o fuertes pulsaciones extracardiacas hemocelómicas (Slama K 2012).

El miocardio está segmentalmente prearreglado, con varios pares de válvulas ostiales, músculos perpendiculares (músculos segmentales) y células nutritivas pericardiales (**Figura 3**) (Slama K 2012).

En *Periplaneta americana* (cucaracha común), el corazón se extiende desde el final del abdomen hasta el primer segmento torácico, presentando dilataciones y un par de ostias verticales en cada segmento (Llanderal y Cibrián, 1983). El vaso dorsal está suspendido en el seno pericardial, que está delimitado por la cutícula dorsal y el diafragma dorsal (en algunos insectos). Las contracciones del vaso dorsal operan contra la fuerza del tejido conectivo lateral, que es el responsable de la dilatación o apertura del vaso dorsal (en diástole) seguido del golpe de contracción, también llamado sístole o contracción sistólica (Miller TA 1997; Resh y Cardé 2003; Slama K 2003, 2010, 2012; Wasserthal LT 2007).

El vaso dorsal de los insectos adultos tiene forma de una flecha elástica tubular llamada aorta torácica y una larga porción abdominal que convencionalmente es llamada el corazón del insecto (Slama K 2012). A lo largo del vaso dorsal se encuentran orificios llamados ostias que se posicionan a cada lado y cada segmento del corazón abdominal (**Figura 3a**). Las ostias más comunes permiten fluir a la hemolinfa en el vaso dorsal y contienen válvulas que previenen el reflujo, a estos se les conoce como ostias incurrentes. Sin embargo, algunos insectos tienen abierto sus válvulas a través del cual la hemolinfa se mueve constantemente; a estos se les conoce como ostias excurrentes (Resh y Cardé 2003).

Los insectos, poseen mecanismos reguladores del corazón similares al de los humanos, como los mecanismos miogénicos basados en la despolarización de las células miocárdicas. El nodo atrioventricular y sinoauricular en humanos, y el nodo regulador terminal en el corazón de los insectos (Slama K 2012). Otras similitudes se extienden a elementos básicos de desarrollo, funciones y envejecimiento (Berh y col.2018). Por ejemplo, varios estudios indican que hay conjuntos de genes en *D. melanogaster* que están implicados en la regulación de la función cardíaca, proteínas contráctiles del músculo y canales iónicos que son similares al de los mamíferos (Akasaka y col. 2006; Malloy y col. 2016). Sin embargo, hay diferencias muy importantes entre los humanos y los insectos, entre ellas, los insectos no poseen un sistema circulatorio cerrado; su sangre, la hemolinfa, circula a través de 3 grandes compartimientos (cabeza, torax y abdomen) que está mutuamente interconectadas y forman una cavidad corporal abierta o cavidad hemocelómica (Slama K 2012).

La función cardíaca en los insectos también requiere sustancias endógenas que se han caracterizado como neurotransmisores comunes presentes en la hemolinfa y que afectan a muchos tejidos periféricos y no neuronales (Miller y Melcalf, 1968; Malloy y col. 2016). Algunos de estos neuromoduladores son las aminas biogénicas que se sabe que aumentan la frecuencia de los latidos del corazón en preparaciones de corazón semi-aisladas de varios insectos. Sin embargo, la regulación de la fisiología cardíaca por el sistema colinérgico sigue siendo poco conocida (Malloy et al. 2016).

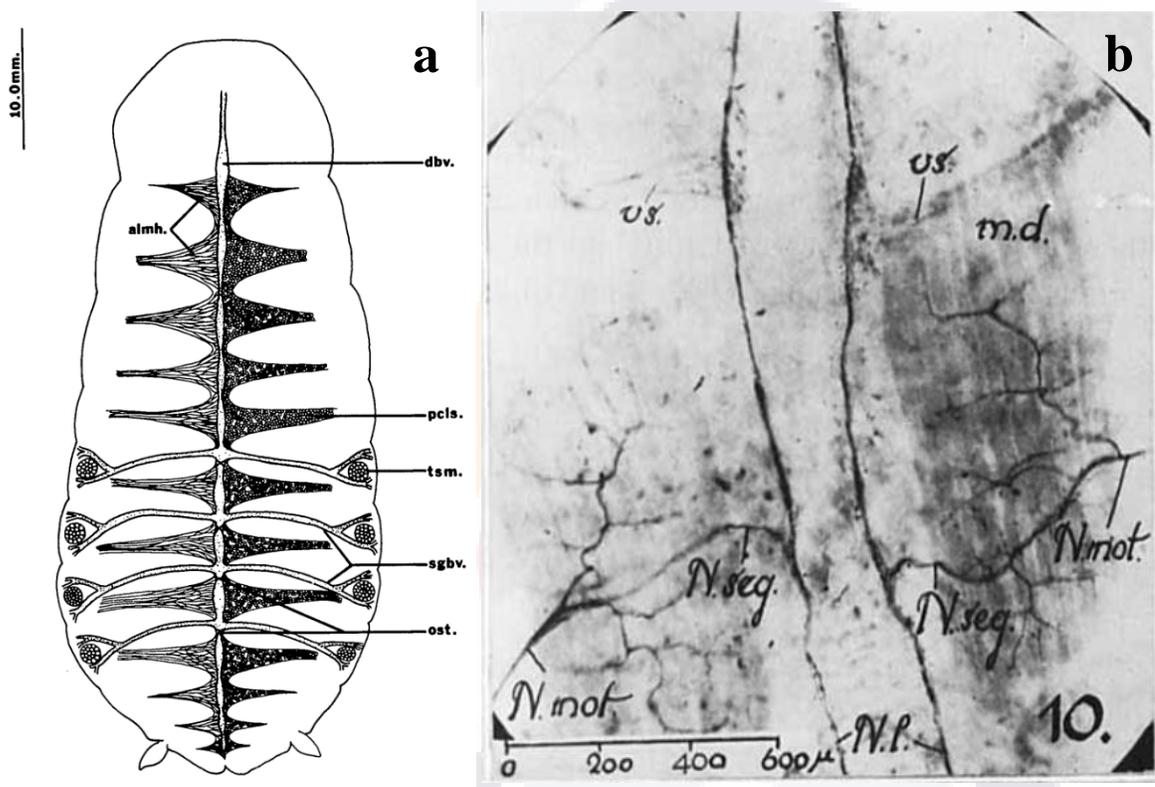


Figura 3. Vista ventral del vaso dorsal de *G. portentosa* (a). Las siglas designan: vaso dorsal (dbv), músculos alares (almh), células pericárdicas (pcls), músculos tergoesternales (tsm), vaso sanguíneo segmental (sgbv) y óstias (ost) (Dailey y Graves 1976). Los nervios del corazón en la cucaracha *Periplaneta orientalis* (b): se muestran los nervios segmentarios (N.seg); nervios o cordones laterales (N.l.); vaso sanguíneo segmental (v.s.); los músculos dorsales (m.s.); y los nervios motores (N.mot.) (Alexandrowicz JS. 1926).

El vaso dorsal, posee dos troncos de nervios análogos descritos como "cordones nerviosos laterales del corazón" (Figura 3 b) debido a su topografía y como medio de distinción de

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

otros nervios que también inervan el corazón. La ultraestructura de los cordones nerviosos cardíacos laterales de la cucaracha americana (*Periplaneta americana*) se describe brevemente de la siguiente manera:

1. Los haces pares de nervios segmentarios se unen a los cordones nerviosos cardíacos laterales cerca de cada ostia en el corazón abdominal y están compuestas por al menos tres axones ordinarios, cada uno encerrado por capas de tejido glial. La mayor parte de la sección transversal del haz está compuesta por un gran número de axones neurosecretores caracterizados por la ausencia de plegamiento glial y que pueden agruparse en tres tipos separados por gránulos axoplásmicos pequeños, densos en electrones, densos en electrones grandes u opacos a los electrones.
2. Los axones poseen gránulos pequeños y densos que hacen uniones neuromusculares con el corazón y hacen sinapsis cerca de los nervios motores en el cordón cardíaco lateral. Estudios en microscopia han permitido observar la formación de sitios de liberación en el cordón lateral por axones granulares de electrones densos pequeños y grandes del nervio segmentario.
3. Se considera que el material neurosecretor liberado desde la cadena del ganglio ventral a la vecindad del corazón comprende en parte un sistema cardio-regulador en la cucaracha con alguna analogía con otros invertebrados. No se conoce ningún otro papel fisiológico del sistema neurosecretor cardíaco ampliamente desarrollado, aunque la multitud de procesos activos aparentes sugiere una participación distinta al simple control del corazón (Miller y Thomson, 1968).

Se han propuesto varias metodologías para registrar la función cardíaca (Berh y col. 2018) como sistemas de matriz de electrodos múltiples (convertidor de impedancia), electrocardiografía de sensores múltiples (método óptico o transductor isotónico) (Miller TA, 1979; Sláma 2003; Wasserthal 2007), fuerza atómica microscopía, tomografía de coherencia óptica (OCT) o Doppler OCT (Berh y col. 2018), Reflexión interna total frustrada (FTIR) o método de obtención de imágenes basado en FTIR (FIM) (Risse y col.2013), Contraste de fase de rayos X de sincrotrón imagenología (Lee y Socha 2009), técnica de angiografía colorante, imagen microscópica en tiempo real (Choma y col. 2011), cuerpo vivo inyectado con microesferas fluorescentes rojas y marcaje fluorescente muscular (Glenn y col. 2010).

Sin embargo, hasta ahora, no existen estudios que incluyan un análisis de los cambios conformacionales del corazón que ocurren durante el ciclo cardíaco del insecto (sístole y diástole) observados por un abordaje tridimensional. Además, ni la diferenciación ni la funcionalidad biomecánica de las células valvulares se han descrito en detalle (Rotstein y Paululat, 2016)

2. GENERALIDADES DEL SISTEMA CARDIOVASCULAR DE LOS MAMÍFEROS

2.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL CORAZÓN

El sistema cardiovascular comprende sangre, corazón y vasos sanguíneos. A fin de que la sangre llegue a las células de los diversos tejidos e intercambie materiales con ellas, debe ser constantemente impulsado a través de los vasos sanguíneos (Tortora y Grabowski 2003). El corazón proporciona la energía para impulsar la sangre por todo el sistema, las arterias llevan sangre desde el corazón a los capilares y las venas devuelven la sangre desde los capilares al corazón. También es ampliamente conocido que todos los mamíferos tienen doble circulación (Maynard y Downes, 2019).

El corazón está formado por tres tipos principales de músculo cardíaco: músculo auricular, músculo ventricular y fibras musculares especializadas de excitación y de conducción. El músculo auricular y ventricular se contrae de manera muy similar al músculo esquelético, excepto que la duración de la contracción es mucho mayor. No obstante, las fibras especializadas de excitación y de conducción se contraen sólo débilmente porque contienen pocas fibrillas contráctiles; en cambio, presentan descargas eléctricas rítmicas automáticas en forma de potenciales de acción o conducción de los potenciales de acción por todo el corazón, formando así un sistema excitador que controla el latido rítmico cardíaco (Hall JE 2012).

El corazón de la rata se encuentra en la parte ventral del tórax, por encima del esternón, entre los pulmones y algo más lejos del diafragma que en el hombre. En el hombre, el corazón se asienta sobre el diafragma y, como resultado, tiene una base aplanada, mientras que en la rata el corazón tiene una forma más ovoide. El tejido conectivo mediastínico conecta el pericardio

con el diafragma y el timo. El pericardio de la rata es una estructura delicada en comparación con la del hombre. Una capa fibrosa externa se fusiona con las paredes de los grandes vasos que entran y salen del corazón, y una capa parietal interna se refleja sobre la superficie del corazón como el pericardio visceral, formando parte de la pared del corazón: el epicardio (Maynard y Downes, 2019).

El corazón de la rata, como el corazón de todos los mamíferos, tiene cuatro cámaras y comprende los ventrículos y las aurículas izquierdo y derecho. El ventrículo izquierdo tiene una pared gruesa que continúa como el tabique interventricular. El ventrículo derecho tiene una pared más delgada y, en secciones transversales del corazón, parece estar pegado al ventrículo izquierdo y al tabique interventricular. Ambas aurículas tienen paredes delgadas (Figura 4.) (Maynard y Downes, 2019).

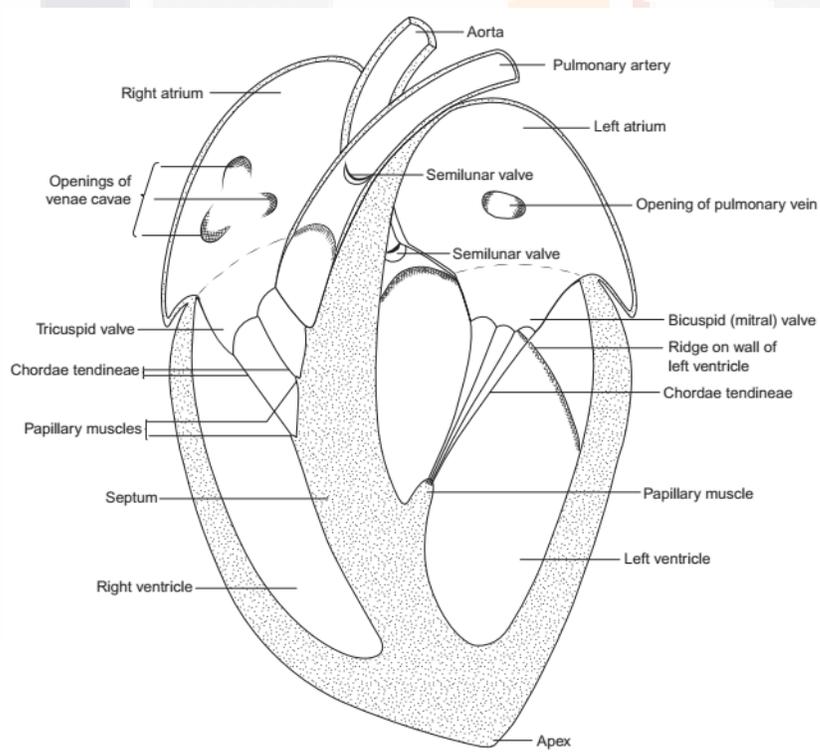


Figura 4. Anatomía interna del corazón de la rata.

La aurícula derecha recibe sangre de las venas cavas anteriores o craneales emparejadas, de la vena cava posterior única y del seno coronario que recoge sangre de las venas intrínsecas del corazón, las venas coronarias. La aurícula izquierda recibe sangre de las venas

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

pulmonares. En el hombre, hay cuatro venas pulmonares que ingresan a la aurícula izquierda por cuatro orificios separados, pero en la rata solo hay una abertura en la aurícula, ya que las venas pulmonares se unen fuera de la aurícula. Esta es la condición en el corazón humano en desarrollo, pero la confluencia se absorbe en la pared de la aurícula dejando que las venas pulmonares se abran directa y separadamente a la aurícula izquierda (Maynard y Downes, 2019).

El suministro de sangre al corazón es proporcionado por las arterias coronarias izquierda y derecha (llamadas así porque provienen de una corona o corona alrededor del corazón). En el hombre se encuentran en la superficie del corazón, pero en la rata están enterrados más profundamente en la pared del corazón (Maynard y Downes, 2019).

En el humano, el tabique interventricular está irrigado por las arterias coronarias derecha e izquierda, pero en la rata está irrigado por una u otra. En aproximadamente el 50% de los animales, el suministro proviene de la derecha y en aproximadamente el 50% el suministro proviene de la izquierda. En el hombre, las aurículas son irrigadas por ramas de las arterias coronarias derecha e izquierda, y una rama importante de la arteria coronaria derecha irriga el marcapasos del corazón, el nódulo sinoauricular. mientras que las aurículas y el nodo sinoauricular de la rata tienen un doble suministro de sangre de los vasos coronarios y la arteria torácica interna, y un doble drenaje (Maynard y Downes, 2019).

Es bien sabido que el corazón muestra una actividad contráctil espontánea impulsada por el impulso del nodo SA (sinu-auricular es correcto, pero sino-auricular se usa ampliamente). En la rata, el nódulo SA se encuentra parcialmente en la pared de la rama de la arteria torácica interna, donde ingresa a la aurícula derecha cerca de la entrada a la aurícula de la vena cava superior derecha (anterior o craneal). Los impulsos se conducen a través de las paredes de la aurícula derecha a la aurícula izquierda y de allí al nódulo auriculoventricular, una pequeña masa de tejido conductor especializado en la unión de las aurículas y los ventrículos alrededor de los orificios auriculoventriculares. Como todos los mamíferos, el corazón de rata tiene un esqueleto fibroso que rodea los orificios auriculoventriculares, las raíces de la aorta y la

arteria pulmonar. Las células del cartílago se pueden encontrar en este tejido en la rata, y en algunos animales, como la vaca (el os cordis) está presente (Maynard y Downes, 2019).

Los potenciales de acción en el músculo cardíaco se registran en una fibra muscular ventricular, que se muestra en la **Figura 5**, es en promedio de aproximadamente 105 mV, lo que significa que el potencial intracelular aumenta desde un valor muy negativo, de aproximadamente -85 mV, entre los latidos hasta un valor ligeramente positivo, de aproximadamente +20 mV, durante cada latido. Después de la espiga inicial la membrana permanece despolarizada durante aproximadamente 0,2 s, mostrando una meseta, como se muestra en la **Figura 5**, seguida al final de la meseta de una repolarización súbita. La presencia de esta meseta del potencial de acción hace que la contracción ventricular dure hasta 15 veces más en el músculo cardíaco que en el músculo esquelético (Hall JE 2012).

En el músculo cardíaco, el potencial de acción está producido por la apertura de dos tipos de canales: 1) los mismos canales rápidos de sodio que en el músculo esquelético y 2) canales lentos de calcio, que también se denominan canales de calcio-sodio. Estos canales difieren de los canales rápidos de sodio en que se abren con mayor lentitud y, lo que es incluso más importante, permanecen abiertos durante varias décimas de segundo. Durante este tiempo fluye una gran cantidad de iones tanto calcio como sodio a través de estos canales hacia el interior de la fibra muscular cardíaca, y esto mantiene un período prolongado de despolarización, dando lugar a la meseta del potencial de acción. Además, los iones calcio que entran durante esta fase de meseta activan el proceso contráctil del músculo, mientras que los iones calcio que producen la contracción del músculo esquelético proceden del retículo sarcoplásmico intracelular (Hall JE 2012).

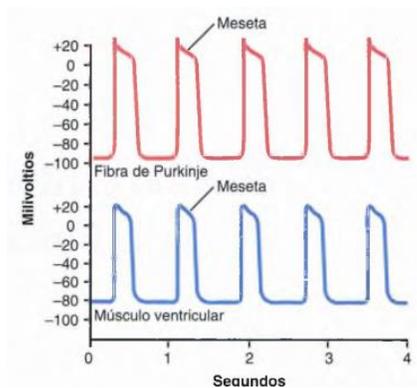


Figura 5. Potenciales de acción rítmicos (en mV) de una fibra de Purkinje y de una fibra muscular ventricular, registrados por medio de microelectrodos (Hall JE 2012).

La permeabilidad de la membrana del músculo cardíaco a los iones potasio disminuye aproximadamente cinco veces, un efecto que no aparece en el músculo esquelético. Esta disminución de la permeabilidad al potasio se puede deber al exceso de flujo de entrada de calcio a través de los canales calcio que se acaba de señalar. Independientemente de la causa, la disminución de la permeabilidad al potasio reduce el mucho el flujo de salida de iones potasio de carga positiva durante la meseta del potencial de acción y, por tanto, impide el regreso rápido del voltaje del potencial de acción a su nivel de reposo. Cuando los canales lentos de calcio-sodio se cierran después de 0.2 a 0.3 s y se interrumpe el flujo de entrada de iones calcio y sodio, también aumenta rápidamente la permeabilidad de la membrana a los iones potasio; esta rápida pérdida de potasio desde la fibra inmediatamente devuelve el potencial de membrana a su nivel de reposo, finalizando de esta manera el potencial de acción (Hall JE 2012).

Los fenómenos cardíacos que se producen desde el comienzo de un latido cardíaco hasta el comienzo del siguiente se denominan ciclo cardíaco. Cada ciclo es iniciado por la generación espontánea de un potencial de acción en el nódulo sinusal. En humanos, este nódulo está localizado en la pared de la aurícula derecha, cerca del orificio de la vena cava superior, y el potencial de acción viaja desde aquí rápidamente por ambas aurículas y después a través del haz auriculoventricular hacia los ventrículos. Debido a esta disposición especial del sistema de conducción desde las aurículas hacia los ventrículos, hay un retraso de más de 0,1 s durante el paso del impulso cardíaco desde las aurículas a los ventrículos. Esto permite que las

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

aurículas se contraigan antes de la contracción ventricular, bombeando de esta manera sangre hacia los ventrículos antes de que comience la intensa contracción ventricular. Por tanto, las aurículas actúan como bombas de cebado para los ventrículos, y los ventrículos a su vez proporcionan la principal fuente de potencia para mover la sangre a través del sistema vascular del cuerpo (Hall JE 2012).

El ciclo cardíaco está formado por un período de relajación que se denomina diástole, seguido de un período de contracción denominado sístole. La duración de este proceso, incluidas la sístole y la diástole, es el valor inverso de la frecuencia cardíaca. En humanos, la frecuencia cardíaca es de 72 latidos por minuto, la duración del ciclo cardíaco es de $1/72$ latidos por minuto, aproximadamente **0,0139** min por latido, o 0,833 s por latido. En tanto que en ratas la frecuencia cardíaca normal de 328 latidos por minuto y puede variar de 250 a 600 latidos por minuto (Bucio GV 2019), lo que significa que la duración de su ciclo cardíaco es de $1/328$ por minuto, aproximadamente **0.0031** min por latido, o 0.183 s por latido (Hall JE 2012).

La **Figura 6** muestra los diferentes acontecimientos que se producen durante el ciclo cardíaco para el lado izquierdo del corazón. Las tres curvas superiores muestran los cambios de presión en la aorta, en el ventrículo izquierdo y en la aurícula izquierda, respectivamente. La cuarta curva representa los cambios del volumen ventricular izquierdo, la quinta el electrocardiograma y la sexta un fonocardiograma, que es un registro de los ruidos que produce el corazón (principalmente en las válvulas cardíacas) durante su función de bombeo (Hall JE 2012).

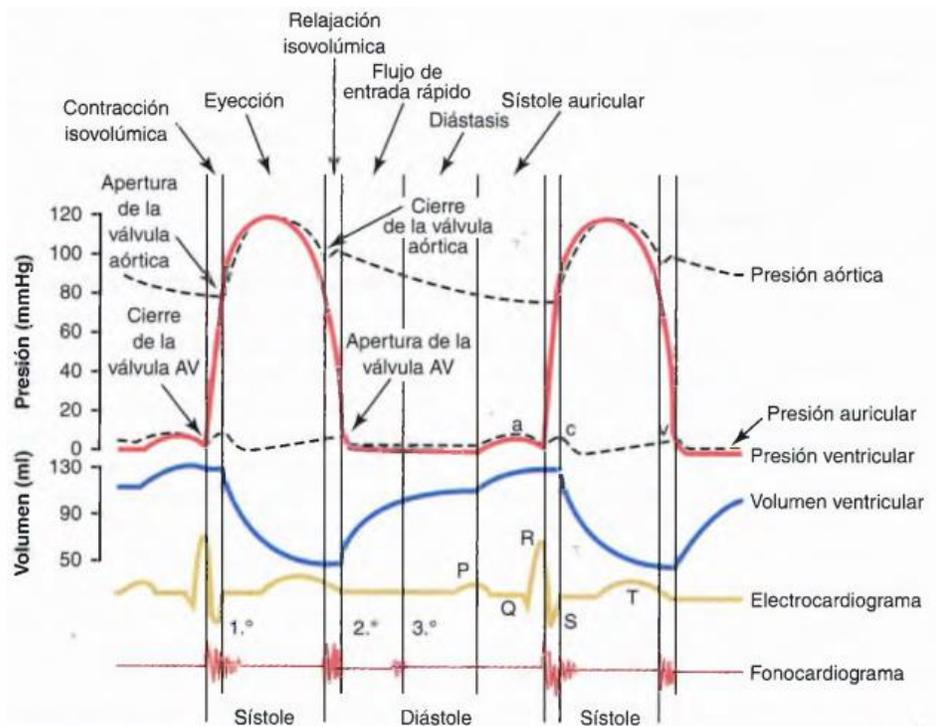


Figura 6. Acontecimientos del ciclo cardíaco en humanos, para la función del ventrículo izquierdo, que muestran los cambios de la presión auricular izquierda, de la presión ventricular izquierda, de la presión aórtica, del volumen ventricular, del electrocardiograma y del fonocardiograma (Hall JE 2012).

Cuando aumenta la frecuencia cardíaca, la duración de cada ciclo cardíaco disminuye, incluidas las fases de contracción y relajación. La duración del potencial de acción y el período de contracción (sístole) también decrece, aunque no en un porcentaje tan elevado como en la fase de relajación (diástole) (Hall JE 2012).

El electrocardiograma de la **Figura 6** muestra las ondas P, Q, R, S y T, que se analizan en los capítulos 11,12 y 13. Son los voltajes eléctricos que genera el corazón, y son registrados mediante el electrocardiógrafo desde la superficie del cuerpo (Hall JE 2012).

La onda P está producida por la propagación de la despolarización en las aurículas, y es seguida por la contracción auricular, que produce una ligera elevación de la curva de presión auricular inmediatamente después de la onda P electrocardiográfica. Después las ondas QRS aparecen como consecuencia de la despolarización eléctrica de los ventrículos, que inicia la contracción de los ventrículos y hace que comience a elevarse la presión ventricular, como

también se muestra en la **Figura 6**. Por tanto, el complejo QRS comienza un poco antes del inicio de la sístole ventricular. El electrocardiograma termina cuando se observa la onda T ventricular, que representa la fase de repolarización de los ventrículos, cuando las fibras del músculo ventricular comienzan a relajarse. Por tanto, la onda T se produce un poco antes del final de la contracción ventricular (Hall JE 2012).

En la curva de presión auricular de la **Figura 6** se observan tres pequeñas elevaciones de presión, denominadas curvas de presión auricular *a*, *c* y *v*. La onda *a* está producida por la contracción auricular. Habitualmente la presión auricular derecha aumenta (de 4 a 6 mmHg en humanos) durante la contracción auricular y la presión auricular izquierda aumenta (aproximadamente de 7 a 8 mmHg en humanos). La onda *c* se produce cuando los ventrículos comienzan a contraerse; está producida en parte por un ligero flujo retrógrado de sangre hacia las aurículas al comienzo de la contracción ventricular, pero principalmente por la protrusión de las válvulas auriculoventricular retrógradamente hacia las aurículas debido al aumento de presión de los ventrículos. La onda *v* se produce hacia el final de la contracción ventricular; se debe al flujo lento de sangre hacia las aurículas desde las venas mientras las válvulas AV están cerradas durante la contracción ventricular. Después, cuando ya ha finalizado la contracción ventricular, las válvulas auriculoventricular se abren, y permiten que esta sangre auricular almacenada fluya rápidamente hacia los ventrículos, lo que hace que la onda *v* desaparezca (Hall JE 2012).

Durante la sístole ventricular se acumulan grandes cantidades de sangre en las aurículas derecha e izquierda porque las válvulas auriculoventricular están cerradas. Por tanto, tan pronto como ha finalizado la sístole y las presiones ventriculares disminuyen de nuevo a sus valores diastólicos bajos, el aumento moderado de presión que se ha generado en las aurículas durante la sístole ventricular inmediatamente abre las válvulas auriculoventricular y permite que la sangre fluya rápidamente hacia los ventrículos, como se muestra en la elevación de la curva de volumen ventricular izquierdo de la **Figura 6**. Esto se denomina período de llenado rápido de los ventrículos. Este período dura aproximadamente el primer tercio de la diástole. Durante el tercio medio de la diástole normalmente sólo fluye una pequeña cantidad de sangre hacia los ventrículos; esta es la sangre que continúa drenando hacia las aurículas desde

las venas y que pasa a través de las aurículas directamente hacia los ventrículos (Hall JE 2012).

Durante el último tercio de la diástole las aurículas se contraen y aportan un impulso adicional al flujo de entrada de sangre hacia los ventrículos; este fenómeno es responsable de aproximadamente el 20% del llenado de los ventrículos durante cada ciclo cardíaco. Después, inmediatamente comienza la contracción ventricular que produce un aumento súbito de presión ventricular, como se muestra en la Figura 6, lo que hace que se cierren las válvulas auriculoventriculares. Después es necesario que el ventrículo acumule una presión suficiente para abrir las válvulas auriculoventriculares semilunares (aórtica y pulmonar) contra las presiones de la aorta y de la arteria pulmonar. Por lo tanto, durante este período se produce contracción en los ventrículos, pero no vaciado. Esto se denomina período de contracción isovolumétrica o isométrica, lo que quiere decir que se produce aumento de la tensión en el músculo, pero con un acortamiento escaso o nulo de las fibras musculares (Hall JE 2012).

Cuando la presión ventricular izquierda aumenta ligeramente por encima de 80 mmHg (y la presión ventricular derecha ligeramente por encima de 8 mmHg), las presiones ventriculares abren las válvulas semilunares. Inmediatamente comienza a salir la sangre de los ventrículos, de modo que aproximadamente el 70% del vaciado de la sangre se produce durante el primer tercio del período de eyección y el 30% restante del vaciado durante los dos tercios siguientes. Por tanto, el primer tercio se denomina período de eyección rápida y los dos tercios finales período de eyección lenta (Hall JE 2012).

Período de relajación isovolumétrica (isométrica). Al final de la sístole comienza súbitamente la relajación ventricular, lo que permite que las presiones intraventriculares derecha e izquierda disminuyan rápidamente. Las presiones elevadas de las grandes arterias distendidas que se acaban de llenar con la sangre que procede de los ventrículos que se han contraído empujan inmediatamente la sangre de nuevo hacia los ventrículos, lo que cierra súbitamente las válvulas aórtica y pulmonar. Durante un breve periodo el músculo cardíaco sigue relajándose, aun cuando no se modifica el volumen ventricular, dando lugar al período de relajación isovolumétrica o isométrica. Durante este período las presiones intraventriculares

disminuyen rápidamente y regresan a sus bajos valores diastólicos. Después se abren las válvulas auriculoventriculares para comenzar un nuevo ciclo de bombeo ventricular (Hall JE 2012).

Durante la diástole, el llenado normal de los ventrículos aumenta el volumen de cada uno de los ventrículos. Este volumen se denomina volumen telediastólico. Después, a medida que los ventrículos se vacían durante la sístole, el volumen disminuye, lo que se denomina volumen sistólico. El volumen restante que queda en cada uno de los ventrículos, se denomina volumen telesistólico. La fracción del volumen telediastólico que es propulsada se denomina fracción de eyección, que habitualmente es igual a aproximadamente el 60% (humanos) (Hall JE 2012).

2.2 CONTROL DEL CORAZÓN POR LOS NERVIOS SIMPÁTICOS Y PARASIMPÁTICOS

La eficacia de la función de bomba del corazón también está controlada por los nervios simpáticos y parasimpáticos (vagos), que inervan de forma abundante el corazón, como se muestra en la **Figura7**. Para niveles dados de presión auricular de entrada, la cantidad de sangre que se bombea cada minuto (gasto cardíaco) con frecuencia se puede aumentar más de un 100% por la estimulación simpática. Por el contrario, el gasto se puede disminuir hasta un valor tan bajo como cero o casi cero por la estimulación vagal (parasimpática) (Hall JE 2012).

La estimulación simpática intensa puede aumentar la frecuencia cardíaca. Además, la estimulación simpática aumenta la fuerza de la contracción cardíaca hasta el doble de lo normal, aumentando de esta manera el volumen de sangre que se bombea y aumentando la presión de eyección. Así, con frecuencia la estimulación simpática puede aumentar el gasto cardíaco máximo hasta dos o tres veces (Hall JE 2012).

Por el contrario, la inhibición de los nervios simpáticos del corazón puede disminuir la función de bomba del corazón en un grado moderado de la siguiente manera: en condiciones normales, las fibras nerviosas simpáticas que llegan al corazón descargan continuamente a una frecuencia baja que mantiene el bombeo aproximadamente un 30% por encima del que habría sin estimulación simpática. Por tanto, cuando la actividad del sistema nervioso simpático disminuye por debajo de lo normal, este fenómeno produce reducción tanto de la frecuencia cardíaca como de la fuerza de la contracción del músculo ventricular, reduciendo de esta manera el nivel de bombeo cardíaco hasta un 30% por debajo de lo normal (Hall JE 2012).

La estimulación intensa de las fibras nerviosas parasimpáticas de los nervios vagos que llegan al corazón puede interrumpir el latido cardíaco durante algunos segundos, pero después el corazón habitualmente “escapa” y late a una menor frecuencia (de 20 a 40 latidos por minuto en humanos) mientras continúe la estimulación parasimpática. Además, la estimulación vagal intensa puede reducir la fuerza de la contracción del músculo cardíaco en un 20-30% (Hall JE 2012).

Las fibras vagales se distribuyen principalmente por las aurículas y no mucho en los ventrículos, en los que se producen la contracción de potencia del corazón. Esto explica el efecto de la estimulación vagal principalmente sobre la reducción de la frecuencia cardíaca, en lugar de reducir mucho la fuerza de la contracción del corazón. Sin embargo, la gran disminución de la frecuencia cardíaca, combinada con una ligera reducción de la fuerza de la contracción cardíaca, puede reducir el bombeo ventricular en un 50% o más (Hall JE 2012).

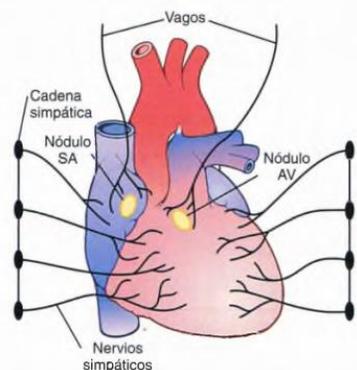


Figura 7. Nervios simpáticos y parasimpáticos cardíacos. (Los nervios vagos que se dirigen hacia el corazón son nervios parasimpáticos) (Hall JE 2012).

2.3 MECANISMO DE LOS EFECTOS VAGALES

La acetilcolina que se libera en las terminaciones nerviosas vagales aumenta mucho la permeabilidad de las membranas de las fibras a los iones potasio, lo que permite la salida rápida de potasio desde las fibras del sistema de conducción. Esto da lugar a un aumento de la negatividad en el interior de las fibras, un efecto que se denomina hiperpolarización, que hace que este tejido excitable sea mucho menos excitable (Hall JE 2012).

En el nódulo sinusal, el estado de hiperpolarización reduce el potencial de membrana «en reposo» de las fibras del nódulo sinusal a un nivel mucho más negativo de lo habitual, hasta -65 a -75 mV en lugar del nivel normal de -55 a -60 mV. Por tanto, el aumento inicial del potencial de membrana del nódulo sinusal que produce la corriente de entrada de sodio y de calcio tarda mucho más en alcanzar el potencial liminal para la excitación. Esto retrasa mucho la frecuencia rítmica de estas fibras nodulares. Si la estimulación vagal es lo suficientemente intensa es posible detener totalmente la autoexcitación rítmica de este nódulo (Hall JE 2012).

2.4 EFECTO DE LA ESTIMULACIÓN SIMPÁTICA SOBRE EL RITMO Y LA CONDUCCIÓN DEL CORAZÓN

La estimulación simpática produce esencialmente los efectos contrarios sobre el corazón a los que produce la estimulación vagal, como se señala a continuación. Primero, aumenta la frecuencia de descarga del nódulo sinusal. Segundo, aumenta la velocidad de conducción, así como el nivel de excitabilidad de todas las porciones del corazón. Tercero, aumenta mucho la fuerza de contracción de toda la musculatura cardíaca, tanto auricular como ventricular (Hall JE 2012).

La estimulación simpática aumenta la actividad global del corazón. La estimulación máxima casi puede triplicar la frecuencia del latido cardíaco y puede aumentar la fuerza de la contracción del corazón hasta dos veces (Hall JE 2012).

La estimulación de los nervios simpáticos libera la hormona noradrenalina en las terminaciones nerviosas simpáticas. La noradrenalina estimula, a su vez, los receptores β_1 -adrenérgicos, que median en los efectos sobre la frecuencia cardíaca. No está del todo claro el mecanismo preciso mediante el que la estimulación β_1 -adrenérgica actúa sobre las fibras del músculo cardíaco, aunque se piensa que aumenta la permeabilidad de la membrana de las fibras a los iones sodio y calcio. En el nódulo sinusal, un aumento de la permeabilidad a sodio-calcio genera un potencial en reposo más positivo y también produce un aumento de la velocidad del ascenso del potencial de membrana diastólico hacia el nivel liminal para la autoexcitación, acelerando de esta forma la autoexcitación y, por tanto, aumentando la frecuencia cardíaca (Hall JE 2012).

2.5 BREVE DESCRIPCIÓN SOBRE LA ARTERIA CAUDAL DE LA RATA

La circulación sistémica comprende el ventrículo izquierdo del corazón, la aorta y sus ramas, las arterias sistémicas, los capilares sistémicos y las venas que se unen para llevar la sangre de regreso a la aurícula derecha del corazón a través de las venas cavas (una vena cava, dos o más venas cavas). En la rata, hay dos venas cavas superiores (craneales) y una vena cava inferior (caudal); en el hombre solo hay una vena cava superior (Maynard y Downes, 2019).

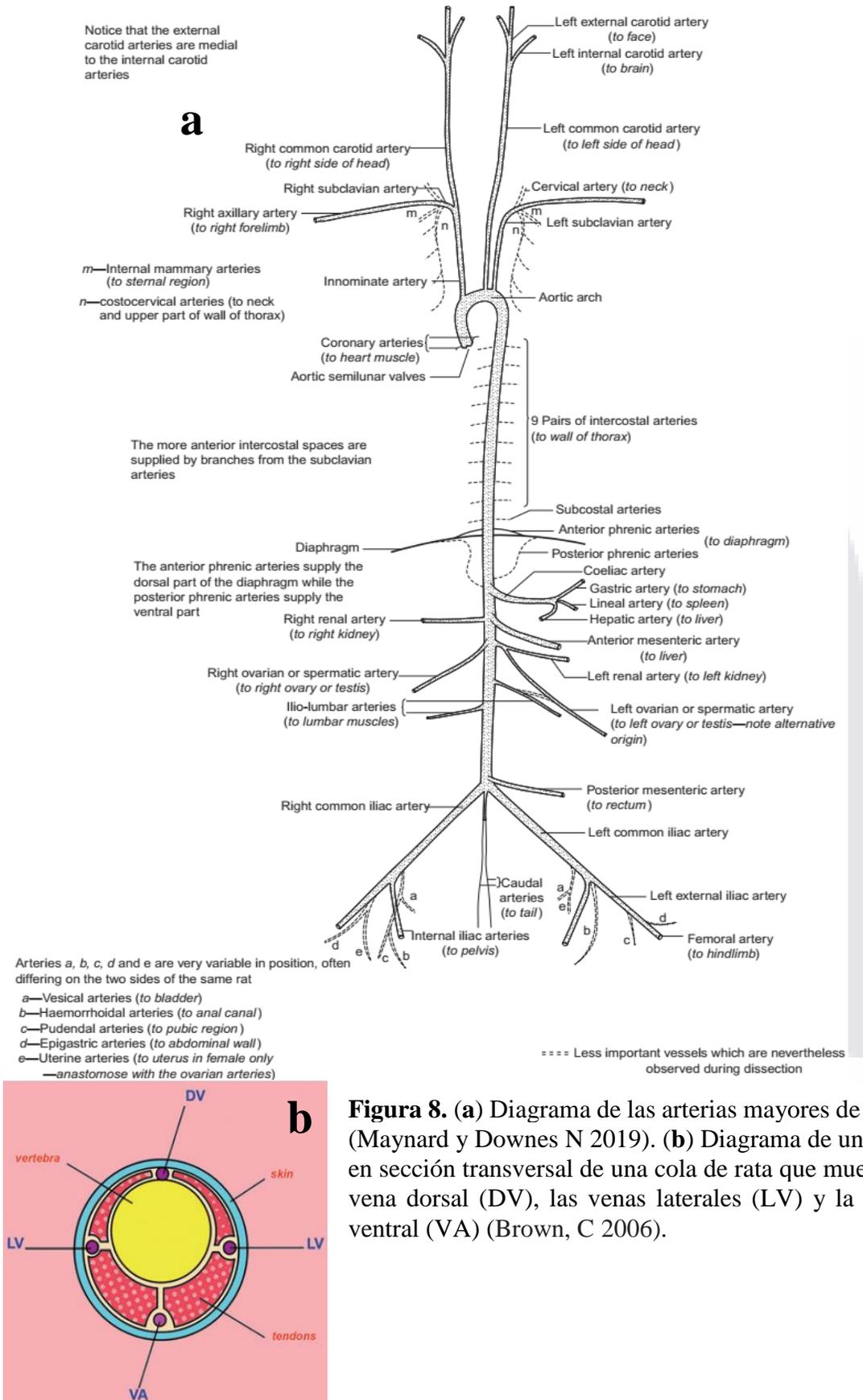


Figura 8. (a) Diagrama de las arterias mayores de la rata (Maynard y Downes N 2019). **(b)** Diagrama de una vista en sección transversal de una cola de rata que muestra la vena dorsal (DV), las venas laterales (LV) y la arteria ventral (VA) (Brown, C 2006).

La aorta abdominal proporciona tres grupos de ramas:

1. Arterias intersegmentarias a la pared del cuerpo (arterias ilio-lumbares).
2. Ramas hacia los órganos del sistema genitourinario (arterias renales y ováricas / testiculares).
3. Ramas hasta el intestino.

Tres arterias principales no apareadas irrigan el intestino: la arteria celíaca, la arteria mesentérica anterior (cranial) y la arteria mesentérica posterior (caudal). La aorta abdominal termina dividiéndose en las arterias ilíacas comunes (a veces descritas simplemente como arterias ilíacas) que irrigan los órganos y tejidos de la pelvis y las extremidades posteriores y la cola. Una rama terminal de la arteria torácica interna, la arteria epigástrica anterior (cranial), corre caudalmente por la pared abdominal ventral para anastomosarse con una rama de la arteria ilíaca, la arteria epigástrica posterior (caudal). La arteria femoral, otra rama de la arteria ilíaca, es la gran arteria de la extremidad posterior (Maynard y Downes N 2019).

La arteria caudal media (arteria sacra media de Hebel y Stromberg) deja la aorta cerca de su bifurcación y corre hasta la cola. Los vasos sanguíneos de la cola son de interés para los fisiólogos y toxicólogos porque las venas dorsales pueden canularse para tomar muestras de sangre y para dosificación intravenosa. El suministro de sangre a la cola también es de interés porque el 20% de la pérdida de calor en la rata ocurre a través de la cola. La arteria ventral es la arteria principal de la cola y discurre por un surco formado por los arcos hemáticos incompletos de las vértebras caudales (coccígeas). Esta arteria tiene una pared muscular gruesa que llega hasta la punta de la cola. La cola de rata contiene una vena dorsal, dos venas laterales y una arteria ventral (**Figura 8**). Calentar la cola o calentar la temperatura corporal central de la rata provocará vasodilatación de los vasos de la cola (Maynard y Downes N 2019; Brown C 2006).

2.6 MEDICIÓN DE LA PRESIÓN ARTERIAL EN RATAS

La medición de la presión arterial es uno de los procedimientos básicos en la investigación biomédica. Tres métodos se utilizan más ampliamente para registrar la presión arterial en una rata: a) la pletismografía que usa un brazalete en la cola de la rata (no invasiva), (b) catéteres

intraarteriales (que son invasivos) y c) radiotelemedría. Los catéteres intraarteriales producen los valores más precisos y se requiere cirugía para usarlos. La mayor parte de nuestro conocimiento fisiológico y farmacológico relacionado con la presión arterial y su regulación se ha derivado de animales de laboratorio preparados de forma aguda, anestesiados o inmovilizados. La presión arterial invasiva es el método estándar medido directamente en cualquier arteria, como la arteria radial, femoral o braquial, utilizando una cánula con catéter lleno de solución salina (Parasuraman y Raveendran 2012).

La presión arterial no invasiva es más adecuada como valor de presión arterial basal cuando se va a seleccionar un compuesto para determinar la actividad antihipertensiva, mientras que la técnica invasiva suele ser adecuada para medir la reactividad vascular frente a diversos agonistas y antagonistas. Las mediciones invasivas dan la presión arterial basal correcta, pero a veces hay fluctuaciones en la presión arterial basal debido a la anestesia que interfiere con la presión arterial normal (Parasuraman y Raveendran 2012).

La capacidad de evaluar con precisión la presión arterial en animales pequeños es el punto clave para dilucidar los determinantes subyacentes en problemas de la presión arterial. Aunque una evaluación intraarterial directa de la presión arterial en animales conscientes y sin restricciones se considera generalmente como la traducción más relevante, los problemas asociados con este método, como la naturaleza invasiva, la dificultad técnica de la cirugía y el alto precio limitan su uso en un laboratorio general. ajuste. Dentro de este protocolo, se ha demostrado el uso de un método de “tailcuff” no invasivo para medir la presión arterial en roedores como ratas y ratones. El método donde se usa un brazalete en la cola, es muy fácil de usar y está bien correlacionado con otros métodos, como la evaluación de la presión intraarterial (Wang y col. 2017).

Hay dispositivos disponibles comercialmente que indican la presión sistólica, media y diastólica. Uno de estos dispositivos de medición de presión arterial no invasiva, es el CODA que permite medir la presión arterial en ratones. Este método utiliza un sensor de registro de presión de volumen especializado y mide los cambios en el volumen de sangre que se colocan sobre la cola del animal. Los ratones deben sujetarse en soportes específicos y calentarse

artificialmente para mantener una presión arterial normal (Wang y col. 2017). Otros instrumentos pueden utilizar relaciones específicas de amplitud de oscilación a amplitud máxima para identificar la presión sistólica y diastólica, método llamado oscilométrico (Geddes y col. 1982).

Para llevar a cabo el método oscilométrico es necesario el uso de un pequeño brazalete y un micrófono piezoeléctrico. Las mediciones utilizan la amplitud de la oscilación de la presión del cuffer, los cuales se superponen con los sonidos captados por el micrófono (los sonidos de Korotkoff) que se filtraron en banda (30-300 Hz) **Figura 9** (Geddes y col. 1982). Este método se puede utilizar para estimar la presión sistólica con una precisión razonable (Ramsey M 3rd 1979). Los estudios en animales y humanos muestran que la presión sistólica se encuentra cuando las oscilaciones de la presión del cuffer son de aproximadamente la mitad de su amplitud máxima. Sin embargo, se encontró que la presión sistólica en humanos se sobre estimaba, pero más en animales (Geddes y col. 1982).

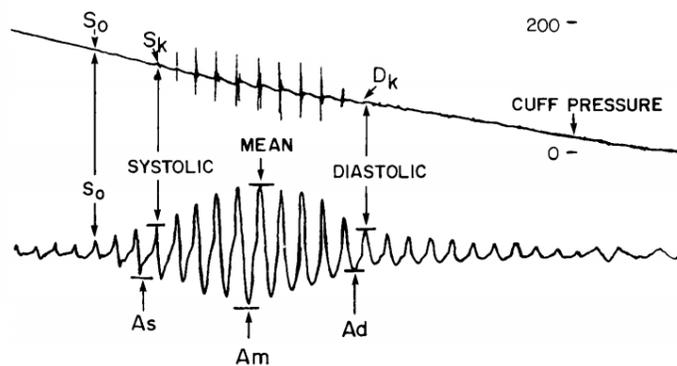


Figura 9. Presión del brazalete con sonidos de Korotkoff superpuestos y oscilaciones amplificadas en la presión del brazalete. Los símbolos identifican las medidas utilizadas para identificar la presión sistólica y diastólica: presión del cuffer (S_0), presión sistólica (S_k), presión diastólica (D_k), amplitud sistólica (A_s), máxima amplitud (A_m) y amplitud diastólica (A_d) (Geddes y col. 1982).

2.7 OXIMETRÍA DE PULSO

La oximetría de pulso es un método no invasivo que permite la estimación de la saturación de oxígeno de la hemoglobina arterial y también vigila la frecuencia cardíaca y la amplitud del pulso (Mejía y Mejía 2012).

Para la determinación de la saturación de hemoglobina arterial con oxígeno (SpO_2), el oxímetro de pulso o pulsioxímetro usa la espectrofotometría basada en que la oxihemoglobina u hemoglobina oxigenada (HbO_2) y la desoxihemoglobina o hemoglobina reducida (Hb) absorben y transmiten determinadas longitudes de onda del espectro luminoso para la luz roja (640-660nm) y la luz infrarroja (910-940nm). La HbO_2 absorbe más la luz infrarroja y permite el paso de la luz roja; por el contrario, la Hb absorbe más la luz roja (R) y permite el paso de la luz infrarroja (IR). El ratio de la absorción de la luz R e IR mide el grado de oxigenación de la hemoglobina (Mejía y Mejía 2012).

Los oxímetros de pulso tienen dos sensores o sondas con diodos emisores de luz (DEL), uno para luz IR y otro para la R, además, de un fotodiodo detector. Para medir el oxígeno los DEL y el fotodiodo detector deben ponerse en puntos opuestos dejando en medio el tejido translucido (pulpejo del dedo, pabellón auricular, etc). El mecanismo que permite la lectura de la oxigenación es que en cada pulsación de la sangre arterial se transmiten valores lumínicos, detectando al mismo tiempo la frecuencia cardíaca (Mejía y Mejía 2012).

La precisión y exactitud dependen de las diferentes marcas y estudios realizados que van de desde más o menos 10% a menos de 2%, pero en sujetos con saturaciones de oxígeno por encima de 70%; por esto se ha visto que el funcionamiento de los oxímetros disminuyen su precisión grandemente cuando las SpO_2 están por debajo de 70% (esto se debe a que se tiene un número limitado de sujetos para calibrar a bajos niveles de saturación), lo cual llevaría a serias dudas de su interpretación en pacientes muy hipoxémicos sobre todo en grandes alturas (Mejía y Mejía 2012).

La precisión y exactitud dependen de las diferentes marcas y estudios realizados que van de desde más o menos 10% a menos de 2%, pero en sujetos con saturaciones de oxígeno por encima de 70%; por esto se ha visto que el funcionamiento de los oxímetros disminuyen su precisión grandemente cuando las SpO₂ están por debajo de 70% (esto se debe a que se tiene un número limitado de sujetos para calibrar a bajos niveles de saturación), lo cual llevaría a serias dudas de su interpretación en pacientes muy hipoxémicos sobre todo en grandes alturas; como menciona un autor,. La Food and Drug Administration (FDA) considera que las mediciones de cada nuevo oxímetro y sensor deben ser comparados con muestras medidas en sangre arterial con un co-oxímetro en un rango de 70 a 100% (Mejía y Mejía 2012).

Los sitios del cuerpo que generalmente se usan para medir la SpO₂ son los dedos de la mano, dedo gordo del pie y lóbulo de la oreja. En neonatos y lactantes menores se usan las palmas y plantas. Otros lugares menos frecuentes son la lengua, alas de la nariz y las mejillas (Mejía y Mejía 2012).

La validez (medir lo que quiere medir) y confiabilidad de las mediciones (reproducibilidad de la medición) de los oxímetros de pulso convencionales, puede verse afectada por diversas circunstancias:

El movimiento: la premisa clave de la oximetría de pulso convencional era que el único componente pulsátil en movimiento era la sangre arterial. Esta premisa es errónea, especialmente cuando hay movimiento. Durante el movimiento o "ruido", la longitud de la óptica se modifica y supera la señal real; por lo tanto, el movimiento constituye una limitación física para la oximetría de pulso. Esto se debe que el movimiento de la sangre venosa, que el oxímetro de pulso detecta como si fuera sangre arterial pulsátil; durante el movimiento, existe una especie de "chapoteo o movimiento de vaivén" de la sangre venosa a baja presión (Mejía y Mejía 2012).

Dado que la oximetría de pulso convencional mide los componentes pulsátiles arteriales y los no arteriales, el movimiento de la sangre venosa "confunde" al monitor, que ofrecerá niveles de saturación falsamente bajos. Los sensores con adhesivos son una potencial solución a este problema (Mejía y Mejía 2012).

Baja perfusión: la perfusión del lecho vascular entre el diodo emisor de luz (DEL) y el sensor de la sonda del monitor determina la magnitud de la señal disponible para el oxímetro de pulso. Al disminuir la perfusión, también lo hace la magnitud de la señal, como la pulsación arterial es necesaria para la medición, los estados de baja perfusión como el choque, gasto cardíaco bajo y la hipotermia puede alterar las lecturas. Cuando la perfusión desciende hasta niveles demasiado bajos, la magnitud de la señal se aproxima al nivel de ruido básico del sistema en la electrónica del SpO_2 , lo que permite que el ruido supere a la señal fisiológica (Mejía y Mejía 2012).

Pigmentación de la piel y pintura de uñas: la piel oscura potencialmente tendría errores con lecturas de SpO_2 menores de 80% y el esmalte de uñas, absorbe la luz a 660 nm o 940 nm pueden interferir con la capacidad del oxímetro de pulso para interpretar la SaO_2 (Mejía y Mejía 2012).

Interferencia electromagnética: la energía electromagnética externa como la proveniente de tomógrafos, electrocauterios, celulares u otros pueden ocasionar interferencia de la correcta lectura del oxímetro y además producir un sobrecalentamiento del sensor, lo cual lleva a lecturas bajas de SpO_2 y falsas alarmas (Mejía y Mejía 2012).

Interferencia de la luz ambiental, la luz intensa blanca (fototerapia, luces de quirófanos, etc.) o roja pueden interferir con la lectura de los oxímetros porque alteran la función de los fotodetectores. Esta dificultad puede evitarse cubriendo el sensor con un material no transparente (Mejía y Mejía 2012).

Variantes de Hemoglobinas, existen 2 situaciones en las que se puede afectar la lectura de los oxímetros:

Carboxihemoglobina (COHb), la mayor presencia de esta molécula en la sangre sobreestima los valores de oxigenación arterial porque la COHb absorbe la luz roja en un grado similar al de la HbO_2 (oxi-hemoglobina), por lo cual incrementaría 1% de la SO_2 por cada 1% de COHb circulante (Mejía y Mejía 2012).

Metahemoglobina, su presencia es normalmente menor al 1% y no da problemas, pero en intoxicaciones por sulfonamidas, uso de anestésicos, óxido nítrico y hemoderivados artificiales puede elevarse causando alteración de la lectura porque la metahemoglobina absorbe la luz en forma similar a la HbO₂, lo cual no puede ser discriminado por el microprocesador del oxímetro (Mejía y Mejía 2012).

3. VENENO DE *Latrodectus mactans*

3.1 CARACTERÍSTICAS DEL VENENO DE *Latrodectus mactans*

Los venenos son ricos en proteínas que están implicadas en predación inmovilizando a las presas, o como defensa. La producción de veneno surgió independientemente del filum de los animales incluyendo cnidarios, arañas, miriápodos, escorpiones, conos, cefalópodos, serpientes y mamíferos (McCowan y Garb, 2014). Los venenos animales son recursos para el avance científico, por los péptidos y proteínas biológicamente activas, principalmente las toxinas que actúan en canales iónicos. De estos, varios componentes bioactivos han sido investigados de algunas de los organismos más estudiados, como escorpiones, reptiles, conos, y arañas como la viuda negra (*Latrodectus mactans*). Este arácnido, es uno de los animales más venenosos en el mundo (Peng y col. 2014). Numerosos estudios se han enfocado en la composición y actividad del veneno de las arañas del género *Latrodectus* (McCowan y Garb. 2014).

Latrodectus spp. Pertenece a la familia Terididae (Orden Araneae, Clase: Arachnida) y son conocidas como “arañas viudas”. El género contiene más de 30 especies distribuidas alrededor del mundo, incluyendo China, Asia central, Europa, todo el continente americano y Australia. *Latrodectus* spp. son altamente venenosas y más conocidas por los síntomas de envenenamiento que causan a las personas alrededor del mundo. Las especies más estudiadas son *Latrodectus reddecimgutatus* y *Latrodectus mactans*. El veneno de estas arañas es diferente al de otros animales como serpientes y otras especies de arañas que poseen glándulas productoras de toxinas. La viuda negra posee toxinas no solo en sus glándulas, sino

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

también en todo su cuerpo, incluyendo abdomen y las patas e incluso los huevos y arañas recién nacidas (Yang y Wang 2015).

El veneno secretado por las glándulas de la viuda negra contiene una compleja mezcla que tienen diversas funciones biológicas (Yang y Wang 2015). Este veneno cuenta con un coctel rico en toxinas que poseen diversas funciones biológicas y que afectan el sistema nervioso de las víctimas (Rohou y col. 2007). Muchas de ellas son proteínas biológicamente activas que cumplen diversas funciones como: parálisis, inmovilización, muerte, licuefacción de las presas (Yang y Wang 2015) e inhibición de competidores (Ushkaryov y col. 2004). Estas neurotoxinas son de alto peso molecular (>110 kDa) y causan la liberación de neurotransmisores (norepinefrina y acetil colina) (Dulubova y col. 1996) y hormonas de células endócrinas, como la insulina en células β -Pancreáticas (Lang y col. 1998). Algunos autores infieren que a pesar de los efectos que el veneno de *Latrodectus* tiene en la actividad muscular, no hay un efecto a largo plazo descrito en el cuerpo del ser humano (Guerrero y col. 2010).

Los recientes avances en la separación de proteínas del veneno de la viuda negra, han permitido identificar virtualmente la mayor parte de sus componentes, entre ellos proteinasas, fosfatasas, fosfolipasas, nucleasas, fucolectinas, hidrolasas y latrotoxinas. Además, se ha reportado que en *L. geometricus* posee componentes con actividad fibrigenólica. Los análisis enzimáticos indican que el veneno contiene múltiples tipos de hidrolasas, entre las que incluyen proteinasas, hialuronidasas y fosfatasas alcalinas y ácidas (Yang y Wang 2015).

Las Toxinas proteicas encontradas en *L. tredecimgutatus* fueron clasificadas dentro de 5 clases, de acuerdo a sus componentes bioactivos: neurotoxinas, toxinas asistentes, proteasas, inhibidores de proteasas y toxinas con función desconocida. Diversos autores trabajan para entender cómo trabajan las toxinas cooperativamente durante el latrodectismo (Yang y Wang 2015). Entendiendo como latrodectismo al síndrome producido por picadura de arañas del género *Latrodectus* (Ortuño y col. 2009). Las neurotoxinas actúan principalmente como componentes tóxicos y específicos contra objetivos del sistema nervioso, toxinas que asisten aumentando la toxicidad de las neurotoxinas; inhibidores de proteasas que protegen a las

neurotoxinas y ayudan en la maduración (de las proteínas) de las mismas; además de proteasas que pueden ayudar en la maduración de toxinas precursoras y ayudar en la digestión de las presas (Yang y Wang 2015).

Los recientes estudios sobre la proteómica del veneno de *L. hesperus*, en el que se han encontrado 61 proteínas por espectrometría de masas entre las que incluían latrotoxinas, una toxina inhibidora de unión a cisteínas, familias de toxinas proteínas CRISP (proteínas secretoras ricas en cisteínas). Además, varios tipos de enzimas fueron identificadas en el veneno, incluyendo, hialuronidasas, quitinasas, serínproteasas y metaloproteasas. Estos trabajos han demostrado que *L. mactans hesperus* (de América del Norte) y *L. tredecimguttatus* (de Eurasia) poseen un veneno con las mismas bases moleculares. Las latrotoxinas, son toxinas que tienen actividad selectiva contra vertebrados, insectos o crustáceos. A la fecha se han aislado e identificado al menos 7 de los principales componentes del veneno de *L. tredecimguttatus* (Ushkaryov y col. 2004), mediante el uso de Cromatografía de intercambio iónico (Krasnoperov y col. 1997) o cromatografía líquida de fase reversa (Dulubova y col. 1996). Todas son conocidas como Latrotoxinas, sin embargo, la mayoría de ellas son contra insectos, denominadas como Latroinsectotoxinas (LITs) y se conocen 5 tipos (α , β , γ , δ y ϵ) (Dulubova y col. 1996); α -Latrocrutotoxina (α -LTC), específica para crustáceos y α -Latrotoxina (α LTX) específica contra vertebrados, de la cual esta última, es la más caracterizada; de hecho, se ha estudiado esta toxina desde 1930 (Silva y col. 2009). Todas las latrotoxinas son proteínas acídicas (pH 5.0-6.0), con masas moleculares que va de 110 a 140 kDa. Las masas moleculares de estas toxinas deducidas de sus secuencias de ADN son sustancialmente más grandes que estas determinadas por electroforesis SDS, y por espectrofotometría de masas. Indicando que las latrotoxinas son sintetizadas como largas proteínas precursoras que se someten a procesos post-transcripcionales. Cabe mencionar que, en su tamaño completo, las toxinas son inactivas. Estas proteínas poseen pequeñas secuencias hidrofílicas relativamente cortas que terminan en un grupo de aminoácidos básicos. Estos grupos que se asemejan al sitio de reconocimiento de furina y son procesadas por enzimas parecidas a la subtilisina para poder activarse (Ushkaryov y col. 2004).

Se ha descrito que las latrotoxinas promueven la exocitosis de neurotransmisores del nervio terminal presináptico, solo después de unirse a los receptores neuronales. Todos los objetivos de estas toxinas son células neuronales (con excepción de δ -Latroinsectotoxina que también causa efectos en el músculo de los insectos (Dulubova y col. 1996)). Tanto la selectividad a animales y especificidad a tejidos, provienen del hecho que, en orden de acción, estas toxinas primero deben unirse a receptores de superficie celular neuro-específicos, pero de diferentes clases en los animales. De hecho, el marcado radioactivo a α -LTX, α -LIT y α -LCT, tienen fuerte afinidad por las membranas de vertebrados, insectos y crustáceos respectivamente. Además, α -LTX y α -LIT no compiten entre ellos por sus respectivos sitios de unión en la membrana (probado en cerebro de ratas y cabezas de insectos) (Ushkaryov y col. 2004).

El efecto de α -LTX es muy fuerte y aparentemente sencillo, sin embargo, al igual que otras toxinas, α -LTX actúa a través de múltiples mecanismos (Silva y col. 2009), algunos de los cuales han sido descritos. Los numerosos estudios en α -LTX han demostrado efectos en concentraciones subnanomolares, en donde la toxina no tiene efectos morfológicos en el nervio terminal; sin embargo, su acción puede ser detectada electrofisiológicamente como un incremento en la frecuencia miniatura del potencial de placa terminal (mepps). En altas concentraciones nanomolares (1.3nM), demostró que puede causar una masiva liberación de neurotransmisor, glutamato citoplásmico, ácido amino γ -butírico y aminoácidos no vesiculares como aspartato y α -aminobutirato, que se mantiene durante un período de tiempo considerable. En paralelo con la liberación citoplasmática, hay una extensa depleción de ATP, aumento en la concentración de Ca^{2+} citosólico y una severa restricción de la respiración sináptica; esto es, seguido por cambios morfológicos en las terminales nerviosas del cerebro cortical de cuyos. (McMahon HT 1990). Todas las latrotoxinas causan la liberación masiva de neurotransmisores del nervio terminal uniéndose a un receptor específico del respectivo animal (Yang y Wang 2015). De hecho, la organización del dominio de δ -LIT es similar a la de otras latrotoxinas, lo que sugiere que estas toxinas son una familia de proteínas relacionadas. Aunado a esto, se han aislado proteínas de bajo peso molecular del veneno de la viuda negra, y las dos proteínas son inactivas tanto en mamífero como en insectos. Estas proteínas de bajo peso molecular fueron llamadas Latrodectinas y parecen

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

aumentar la toxicidad de las Latrotoxinas, probablemente incrementando su afinidad a las membranas objetivo y reduciendo la especificidad del filum (Dulubova y col. 1996), como α -LTX que puede ser activa en insectos como *Drosophila melanogaster* (Umbach y col. 1998). Las Latroinsectotoxinas, son muy similares al α -LTX, tanto estructuralmente, como funcionalmente, su comparación con α -LTX, podría dar pistas importantes en cuanto a la arquitectura y los modos de acción de las toxinas específicas de insectos (Rohou y col. 2007).

Normalmente α -LTX induce la exocitosis de neurotransmisores inicialmente uniéndose a proteínas de la superficie extracelular de la célula objetivo. Se han identificado tres diferentes receptores para α -LTX (Graudins y col. 2012): la primera Neurexina 1 α , es una proteína de adhesión celular perteneciente a la polimórfica familia neuronal llamadas neurexinas. La unión de Neurexina 1 α con α -LTX, es dependiente de Ca^{2+} . La segunda, Latrofilina, es un miembro de los receptores de adhesión acoplados a proteínas G y es Ca^{2+} independiente (Silva y Ushkaryov 2010), razón por la cual son conocidas como receptores Ca^{2+} independiente de α -LTX (CIRL 1-3) (Südhof y Starke 2008), y se conocen 3 homólogos de este receptor, del cual CIRL1 es quien tiene mayor afinidad con α -LTX (Silva y Ushkaryov 2010). El tercer receptor, Tirosina fosfatasa (PTP σ), es un miembro de la familia de las tirosinas fosfatasas (PTPs) que son similares a los receptores que contienen dominios extracelulares semejantes a moléculas de adhesión celular. La unión de α -LTX con TPT σ es independiente de calcio extracelular (Südhof y Starke 2008). Los receptores específicos para LITs aún no han sido identificados, sin embargo, se sabe que el efecto presináptico, pero no la unión de α -LIT, es dependiente de cationes de Ca^{2+} y Mg^{2+} en medio externo (Magazanik y col. 1992); aunque las tres clases de receptores conocidas para vertebrados que se unen a α -Latrotoxina, están también presentes en insectos. Todas las latrotoxinas, cuyas estructuras han sido bien estudiadas (α -LTX, α -LIT y α -LTC) son altamente homólogos y tienen dominios similares en su arquitectura similares (Rohou y col. 2007).

Una vez que se une α -LTX al receptor, ocurre la oligomerización de la toxina permitiendo la formación de un tetrámero anfipático cíclico, seguido de una inserción y formación de un poro permeable a cationes. La formación de este poro permite el incremento de la exocitosis

vesicular y no vesicular de neurotransmisores (mediado por ósmosis); paralelo a esto, hay un influjo de iones de Ca^{2+} a través del poro inducido por la toxina (Graudins y col. 2012).

Cabe mencionar que también se reportan proteínas de bajo peso molecular llamadas latropectinas (7.9 kDa), que acompañan a α -Latrotoxina, y que no parecen afectar la toxicidad y no tienen actividad secretora propia. Sin embargo, al remover las latropectinas, la toxina pierde la capacidad de formar canales en las membranas lipídicas artificiales (Ushkaryov y col. 2004; Graudins y col. 2012).

II. HIPÓTESIS

El veneno crudo de la araña *Latrodectus mactans*, es capaz de alterar el funcionamiento de los corazones de vertebrados e insectos de manera similar, caracterizado por el aumento en la presión sanguínea y acompañado de arritmia.

III. OBJETIVOS

Objetivo general:

Analizar la toxicidad del veneno de la araña de la especie *Latrodectus mactans* en su forma de extracto crudo y fraccionado en dos organismos modelo *Gromphadorina portentosa* y el modelo de rata, para determinar los efectos tóxicos cardiovasculares.

Objetivo particular:

Obtener veneno crudo de la araña *Latrodectus mactans*, así como caracterizar sus componentes.

Comparar los efectos biológicos del veneno de la araña *Latrodectus mactans* en su forma de extracto crudo y fraccionado en las preparaciones fisiológicas del corazón de la cucaracha *Gromphadorina portentosa* y en el corazón de la rata.

IV. MATERIALES Y MÉTODO

4.1 OBTENCIÓN DE LOS ORGANISMOS

Las cucarachas de la especie *G. portentosa* (Orden Blattodea, Familia: Blaberidae) fueron obtenidos en Agropet (distribuidora de mascotas y productos para mascotas) y llevados al laboratorio LAINUS T del edificio 203 de Universidad Autónoma de Aguascalientes. Los insectos fueron ubicados en una caja de 60 galones marca Sterilite tote de color oscuro, con sustrato de peat moss y cartones de huevo como madrigueras, a una humedad relativa del 80%, a temperatura ambiente ($27 \pm 2^\circ\text{C}$) y alimentados a base de plátano y croquetas de perro molidas.

Por otro lado, Las arañas de la especie *L. mactans* o viuda negra (Orden: Araneae, Familia: Theridiidae) las cuales fueron identificadas según Cabrera y Valdez (2019) y capturadas en las calles de la ciudad de Aguascalientes. Las cuales fueron colectadas, cuidadas y alimentadas en envases de pet de 100 ml comúnmente utilizados para la obtención de muestras clínicas.



Figura 10. *Gromphadorina portentosa* a la izquierda en proporción a una mano. Especimen de *Latrodectus mactans* a la derecha, en su última etapa antes de la adultez en un frasco pet de 10 ml.

4.2 Extracción del veneno de *L. mactans*

La extracción del veneno *L. matans* fue basado en lo descrito por Rueda y col. (2016). Las arañas fueron alimentadas con grillos obtenidos de Agroped de la especie *Achaeta domesticus* durante dos semanas, posteriormente, fueron puestos en ayunas por una semana y se procedió a extraer el veneno. Las arañas fueron inmovilizadas sujetándolas desde la porción posterior del cefalotórax, cerca del pedicelo con una pinza (Rocha-e-Silva y col. 2009) (**Figura 11**).

Con el propósito de facilitar la manipulación, las arañas fueron sometidas a una sedación con gas de CO₂ con para poder sedarlas. Para ello, se adaptó un tanque Gocha de CO₂ con una manguera con válvula, cuyo extremo se conectó con una tapa de frasco pet de 10 ml. Después se estimuló los quelíceros eléctricamente (donde se encuentran las glándulas del veneno) mediante el uso de electrodos conectados a un estimulador eléctrico, aplicando los parámetros de 70 mV a 20 ms y a 50Hz, para que el veneno fuera expulsado por los colmillos. El veneno se recogió con un capilar de vidrio modificado, el cual estaba unido a una pequeña manguera que lo conectaba con una jeringa. El veneno fue colectado en un tubo de 1ml, en el que previamente se le agregó una solución de antiproteasas con N-p-Tosyl-L-fenilalanina

clorometil cetona (TPCK) al 0.1mM y fluoruro de fenilmetanosulfonilo (PMSF) al 1Mm. El veneno crudo fue llevado a congelar a -20°C . Este proceso se llevó a cabo una vez al mes con cada muestra.

El día posterior a la extracción del veneno, las muestras con veneno crudo fueron llevadas a centrifugar a 14 000 rpm por 15 minutos y se eliminó el precipitado resultante. Se determinó el peso de las muestras resultantes del sobrenadante, descartando el peso de las antiproteasas.



Figura 11. Tanque de CO2 modificado y adaptado para conectarse con los tubos donde se mantuvieron vivas a las arañas.

4.3 CARACTERIZACIÓN DEL VENENO DE *L. mactans*

4.3.1 PREPARACIÓN DE GEL DE ELECTROFORESIS

La preparación de geles se llevó a cabo de la siguiente manera: un gel concentrador que fue hecho con 0.63 ml de Upper Buffer (0.5 M de Tris, 2ml de SDS y 50ml de agua desionizada), 0.33 ml de acrilamida (30% de acrilamida con 0.8% de bis-acrilamida), agua destilada (1.54 ml) y persulfato de amonio (12.5 ml). Mientras que el gel separador se compuso de Upper Buffer (0.63ml), acrilamida (1.95ml), agua destilada (2.55 ml), TEMED (0.005ml) y persulfato de amonio (0.02ml). Para la tinción de los geles se usó solución Coomassie (50% de metanol 10% de ácido acético y 0.2% de azul de coomassie R250). Finalmente se usó una solución desteñidora (10% metanol, 5% ácido acético y 85% de agua destilada).

4.3.2 PREPARACIÓN DE WESTERNBLOT

Una vez terminado el proceso de transferencia del gel de poliacrilamida a la membrana de transferencia, se preparó solución TBS (2 litros de agua destilada con 500mM de NaCl y 20mM de Tris HCl) y TTBS (500ml de TBS con 1ml de Tween al 0.2%). Se usaron membranas de transferencia PVDF (difluoruro de polivinilideno) las cuales fueron lavadas con metanol al 100% e inmediatamente después fueron sumergidas en solución de TTBS con leche al 5% y mantenidas en agitación por una hora (proceso de bloqueo). Posteriormente las membranas se pasaron a otro embace donde se le adicionó el primer anticuerpo (IgG hiperinmune antilatrodectus de caballo de Aracmyn plus), el cual, previamente se hizo una dilución 1:150 con 20 ml de solución de TTBS con leche al 5% y se mantuvo en agitación por toda una noche a 4 °C. A la mañana siguiente, las membranas fueron lavadas primero con agua destilada por 5 minutos, después fueron lavadas dos veces con TTBS por 10 minutos y luego con TBS durante 5 minutos. Todas las lavadas fueron con agitación continua.

Las membranas fueron transferidas a otro recipiente para incubar el segundo anticuerpo (Anti caballo IgG producido en conejo). Para ello, se preparó una dilución 1:10 000 de TTBS con leche al 5% y se mantuvo en agitación durante 2 horas. Transcurrido ese tiempo, se realizaron 2 lavados de las membranas con TTBS, cada lavada fue por 15 minutos con agitación continua y después 5 lavadas por 5 minutos con agitación continua. Terminadas las lavadas, se enjuagaron las membranas con TBS y se procedió a revelar aplicando solución de fosfatasa (una pastilla diluida en 10ml de agua destilada) en las membranas. El revelado fue realizado con luz tenue. Para terminar el revelado se agregó agua destilada y se procedió a secar las membranas.

Cabe mencionar que también se analizaron muestras de veneno de *L. geometricus*, la cual se ha mencionado que posee las mismas toxinas que *L. mactans*.

4.4 PREPARACIÓN FISIOLÓGICA SEMI-AISLADA DEL VASO DORSAL DE *G. portentosa*

Los especímenes de *G. portentosa* fueron sedadas de la misma manera que en las arañas para. Una vez sedadas, las cucarachas fueron pasadas a una placa de parafina donde fueron fijadas usando alfileres. Se realizaron cortes para separar la cabeza y las patas, esta última, se realizó cortando en el límite entre la coxa y el trocánter. Además, se hizo una disección cortando a través de la línea media longitudinal, desde el esclerito ventral distal, hasta el límite proximal con la cabeza. Posteriormente se extrajeron todos los órganos con excepción del vaso dorsal, que se encuentra en toda la línea media dorsal de la cavidad visceral del cuerpo del insecto. El cordón nervioso junto con sus ganglios también fueron extraídos, estos recorren la línea ventral de la cavidad visceral del insecto (**Figura 12**).

Una vez preparada la cucaracha, se bañó con solución salina fisiológica específica para cucarachas (NaCl 200,17 mM, KCl 10,73 mM, MgSO₄ 0,99 mM, CaCl₂ 3,4 mM, NaHCO₃ 2,14 mM, 0,083 mM NaH₂PO₄), el cual fue ajustado a pH = 6,9 (Collins y Miller 1977) en toda la preparación cardíaca semi-aislada. Se mantuvo durante todo el experimento una temperatura de 25°C, y un volumen constante de solución salina fisiológica en el vaso dorsal utilizando una micropipeta. La solución salina fisiológica no provocó alteraciones en las funciones cardíacas.

4.5 ANÁLISIS EN 3 DIMENSIONES DEL VASO DORSAL DE *G. portentosa*

Se desarrolló un nuevo método de análisis en tres dimensiones para el estudio del movimiento mecánico del corazón mediante la grabación de video con una evaluación del movimiento en el eje z. Los ejes x y y de las preparaciones de corazón de cucaracha se evaluaron con una cámara acoplada a microscopio estereoscópico como se observa en la **Figura 12**. Usamos un transductor isotónico tipo "Harvard" (aparato de transductor de corazón / músculo liso) acoplado al Biopac System MP150 para registrar los movimientos del ciclo cardíaco en la dirección del eje z (movimientos dorsal y ventral). Cuando tiene lugar la contracción sistólica, el transductor isotónico registra una señal decreciente, mientras que la apertura

diastólica se registra como una señal ascendente **Figura 13**. Estos movimientos en el eje z son muy pequeños y se expresan en milivoltios por el transductor de desplazamiento. Se utilizó el software Acknowledge 4.1 (BIOPAC Systems, Inc.) para la adquisición de datos y el análisis de la frecuencia cardíaca y la amplitud diastólica. Los datos del transductor isotónico se filtraron y suavizaron en línea para evitar pequeñas señales resultantes de artefactos de movimiento. La frecuencia cardíaca (Hz) fue la frecuencia de las ondas predominantes en el análisis espectral de potencia. La amplitud de onda diastólica del corazón se consideró como el valor medio del movimiento en el eje z. Los valores de amplitud se registraron por minuto y se expresan en porcentaje. La dirección del flujo de la hemolinfa se denominó anterógrada y retrógrada según el eje y.

Las grabaciones de video de la actividad cardíaca se realizaron con una cámara Panasonic GP-KR222 acoplada a un microscopio estereoscópico (CCSM, ZEISS Stemi DV4), algunos videos fueron capturados con una cámara digital Celestron 44,422 HD. La apertura diastólica se cuantificó seleccionando tres fotogramas en puntos de tiempo específicos de cada minuto de grabación de vídeo (primera foto 0-15 s, segunda foto 30-40 y tercera foto 50-60 s). Las fotos fueron analizadas por el software ImageJ. Las mediciones se realizaron considerando dos puntos relacionados con el movimiento de apertura diastólica.

Los eventos cardíacos evaluados por grabación de video siempre se sincronizaron con la señal del transductor isotónico gracias al software BIOPAC. Los registros de válvulas intracardíacas se capturaron con el CCSM. Debido a que las válvulas no siempre se observan en el mismo plano focal, algunas imágenes aparecieron con diferente contraste.

4.6 EVALUACIÓN FUNCIONAL DE LA PREPARACIÓN CARDIACA SEMI-AISLADA DE *G. portentosa*

Los primeros experimentos fueron enfocados a estandarizar y comprender los efectos que pueden causar los agonistas colinérgicos en nuestra nueva propuesta de la preparación fisiológica semi-aislada del vaso dorsal. Para ello, se diluyeron dosis experimentales de acetilcolina (ACh), nicotina y muscarina en solución salina fisiológica y se perfundieron

aplicando una gota (20 μ l) directamente sobre el corazón. Las dosis aplicadas fueron de 5,5 y 1 mM de cloruro de ACh (número de catálogo Sigma-Aldrich: A6625); nicotina a 0,53 y 5,3 μ M (Sigma-Aldrich N3876-100ML); muscarina a 0,01, 1 y 5,5 mM (Sigma-Aldrich M6532-5MG).

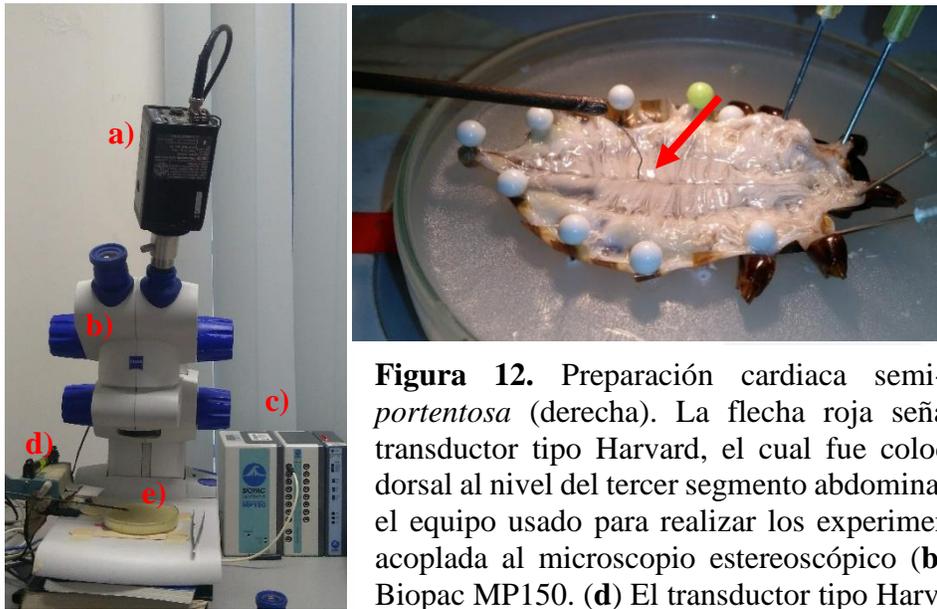


Figura 12. Preparación cardíaca semi-aislada de *G. portentosa* (derecha). La flecha roja señala la punta de transductor tipo Harvard, el cual fue colocado en el vaso dorsal al nivel del tercer segmento abdominal. A la izquierda, el equipo usado para realizar los experimentos: (a) cámara acoplada al microscopio estereoscópico (b). (c) El equipo Biopac MP150. (d) El transductor tipo Harvard con su punta sobre la placa de parafina (e).

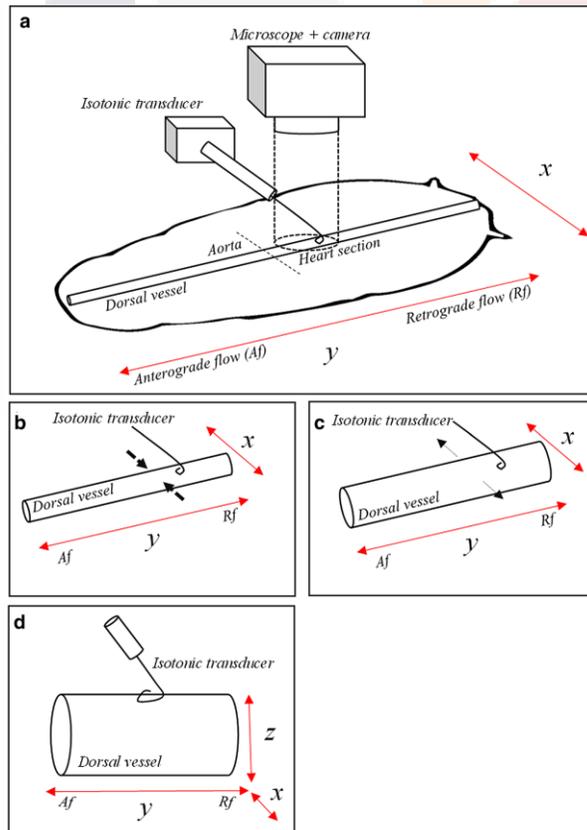


Figura 13. Representación esquemática de la preparación fisiológica cardíaca semi-aislada de *G. portentosa*. (a) Lado ventral de todo el cuerpo de *G. portentosa* y la forma de grabación de la función cardíaca, que consistió del transductor isotónico y la cámara acoplada al microscopio estereoscópico. El vaso dorsal se divide en dos secciones: aorta y corazón. El flujo de hemolinfa se indica en el eje y . Tanto la contracción sistólica (b) como la apertura diastólica (c) se observaron mediante grabación de video en el eje x . Se adaptó una punta de alambre al transductor isotónico para registrar los movimientos del corazón en el eje z (d) (Claros y col. 2020).

Las dosis experimentales de ACh y nicotina se tomaron de la concentración promedio que causó un efecto significativo (aumento de la frecuencia cardíaca, aunque dosis más pequeñas disminuyeron la frecuencia cardíaca) en los corazones de *Periplaneta americana* y *Drosophila melanogaster* (Miller 1968b; Malloy et al. 2016).

Las dosis de muscarina fueron similares a las de ACh. Las réplicas biológicas consistieron en 6 cucarachas para cada procedimiento experimental. Cabe mencionar que los resultados de estos primeros experimentos fueron publicados en Journal of Comparative Physiology A.

4.7 PRUEBAS DEL VENENO CRUDO DE *L. MACTANS* SOBRE LA PREPARACIÓN CARDIACA SEMI-AISLADA DE *G. portentosa* Y RATA

4.7.1 PRUEBAS EN EL CORAZON DE *G. portentosa*

Las primeras pruebas usando el veneno de *L. mactans* sobre la preparación cardíaca semi-aislada de *G. portentosa*, se realizaron aplicando veneno crudo sin liofilizar, y siguiendo el mismo procedimiento que en los experimentos donde se usaron los agonistas colinérgicos. En la preparación cardíaca semi-aislada, se aplicó solución salina fisiológica en el periodo control; mientras que la aplicación del veneno crudo fue durante el periodo experimental y en las concentraciones de 80 y 120 mg/kg.

Las pruebas con las primeras fracciones del veneno de *L. mactans* fueron realizadas en triplicado, las cuales fueron preparadas según el modelo fisiológico de corazón semi-aislado. Se aplicaron las fracciones de los tubos de 1 al 15. Las fracciones (liofilizadas) fueron diluidas con 100 µl de solución salinam fisiológica. En cada experimento se aplicaron 50 µl de cada tubo con solución sobre el corazón (a nivel del tercer segmento abdominal). Cada experimento consistió de un periodo control de 6 minutos y 6 minutos de observación de la respuesta al adicionar la fracción de cada tubo.

En la primera cucaracha se probaron las fracciones de los tubos 1 al 14, en la segunda cucaracha se probaron las fracciones del 1 al 13 y en la tercera cucaracha se probaron las fracciones de los tubos 14 y 15.

Las primeras muestras fraccionadas de veneno de *L. mactans* se encontraban diluidas en 1ml de agua destilada. Estas fueron llevadas a nanodrop, donde se observaron concentraciones de proteína muy pequeñas (**Tabla 1**). Teniendo esto en cuenta, no se esperaban observar efectos significativos sobre la preparación cardiaca semi-aislada de *G. portentosa*; por lo que no se volvió a tomar el dato de las concentraciones.

Las pruebas que se realizaron con las posteriores fracciones del veneno de *L. mactans* fueron diluidas en solución salina fisiológica (100µl). Además, a las fracciones de los tubos 6, 11, 16 y 18, se les adicionó anti-veneno. Estas muestras fueron seleccionadas debido a la concentración que tenían de proteína y a los efectos del veneno sobre la preparación cardiaca semi-aislada. Se realizaron 3 pruebas por de cada fracción y una prueba con las fracciones combinadas con anti-veneno. En todos los experimentos se aplicó un periodo control de 6 minutos con solución salina fisiológica y 6 minutos de prueba con el veneno. Las pruebas fueron realizadas a una temperatura de 25°C (incluyendo a la solución salina). Los experimentos se siguieron de la misma manera que en las primeras pruebas donde se usó los agonistas colinérgicos. Cabe mencionar que en estas pruebas se utilizó el Biopac MP 150.

Se realizaron pruebas aplicando antiveneno (IgG hiperinmune antilatrodectus de caballo de Aracmyn plus) en las fracciones de tubos 7, 9, 16, 18 y 19 debido a que se encontraron efectos significativos sobre la preparación cardiaca semi-aislada; además de que se disponía con suficiente solución para una prueba más. Se adicionó el antiveneno en una dilución 1/500 y se puso a incubar a 25 °C durante 30 minutos antes de ser administrado en la preparación cardiaca semi-aislada de *G. portentosa*. Esto siguiendo lo reportado por de Roodt y colaboradores (2017) y Majori y colaboradores (1972).

También se realizaron registros de las frecuencias eléctricas sobre la preparación cardíaca semi-aislada de *G. portentosa*, usando dos alambres de plata, los cuales fueron colocadas sobre la zona inicial del corazón. Antes de probar las fracciones del veneno de *L. mactans*, traídas de la segunda visita al IBT, se realizaron pruebas para estandarizar el método, donde se adicionó únicamente solución salina. No se observaron alteraciones en la frecuencia eléctrica causadas por la adición de la solución salina para *G. portentosa*. Los registros de la frecuencia eléctrica se llevaron a cabo junto a los registros de movimiento mecánico del corazón (**Figura 14**).

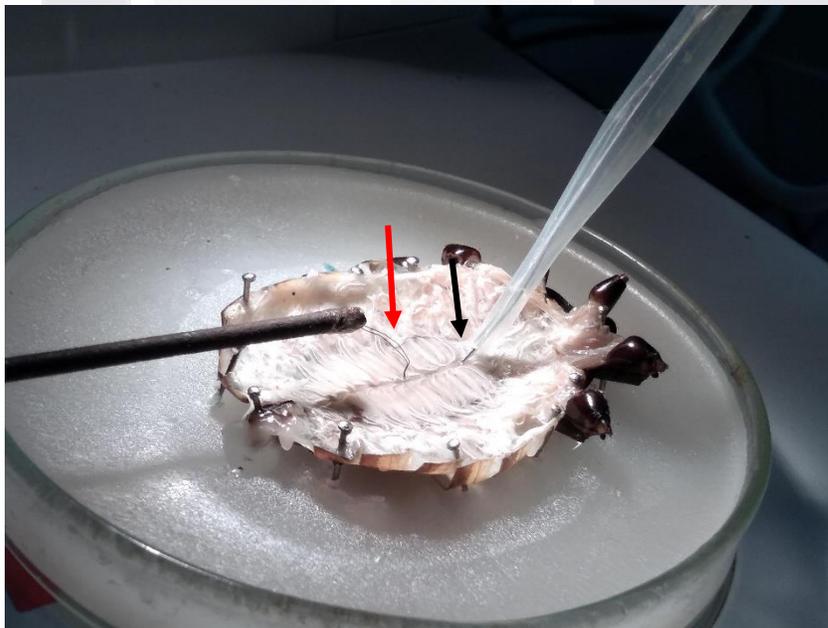


Figura 14. Preparación cardíaca semi-aislada de *G. portentosa*. La flecha roja señala la punta del transductor isotónico. La flecha negra señala la punta de los alambres de plata.

4.7.2 ANÁLISIS DEL VENENO DE *L. mactans* EN RATA

Las pruebas del veneno de *L. mactans* en ratas se enfocaron en determinar si los efectos del veneno podían alterar la función cardíaca en vertebrados, así como en la cucaracha *G. portentosa*. Para ello, se analizó la frecuencia o pulsos cardíacos por minutos (BPM) y la presión sanguínea por minuto. Para el análisis de la presión sanguínea se registró la presión diastólica, esto debido a que este parámetro fue el que se registró de manera más clara y consistente, a diferencia de la presión sistólica que, en ocasiones, no se podía observar con claridad incluso en las pruebas control.

Para llevar a cabo estos registros, se desarrolló un sistema basado en el oxímetro de pulso y el método oscilométrico y adaptado para ratas. Este sistema se desarrolló acoplando el Biopac MP36 con el software Biopac Student Lab 4.1, y se registró la presión arterial en la zona proximal de cola de la rata (**Figura 15a**). El sistema consistió por una parte de un manguillo de presión o cuffer unido a una bomba de aire (que inflaba el manguillo), seguido de una segunda parte, la cual fue un sensor óptico compuesta por un fototransistor y un led infrarrojo. Ambas partes se adaptaron a la cola de la rata y se podían quitar de la cola sin necesidad de desarmar los aparatos.

Para llevar a cabo la preparación, se utilizaron ratas Wistar con un peso 250 ± 36.12 gramos, las cuales fueron sedadas inyectando por vía intraperitoneal pentobarbital sódico (Pentosedal 100 ml), siguiendo las indicaciones para obtener un efecto sedante. Una vez sedada la rata, se acomodó encima de una cama de disección la cual tenía una placa térmica que mantuvo la temperatura a 37°C . Las dosis de veneno crudo liofilizado de *L. mactans* fueron de 0.16 mg/kg (basado en la DL_{50} de ratones) y de 0.32 mg/kg (para observar si se registraban mayores efectos).

Los datos se adquirieron a partir de los registros de frecuencia cardiaca y presión diastólica. La frecuencia cardiaca fue tomada a partir de los pequeños pulsos que se observaron en los registros del oxímetro de pulso (**Figura 15 b** parte inferior). Mediante el uso de software Biopac Student Lab 4.1, esos pulsos se interpretaron como pulsos por minuto (BPM por sus siglas en inglés). Los datos de presión diastólica se obtuvieron extrapolando los registros de presión en milímetros de mercurio (mmHg) y el oxímetro del pulso (**Figura 15 b línea roja**).

Cuando el brazalete se inflaba (**Figura 15 b parte superior**), se observó que el registro del oxímetro de pulso bajaba (**Figura 15 b parte inferior**). Después, el registro del oxímetro de pulso subió conforme el brazalete se desinflaba. Cuando llegaba a su punto más alto, se observó que ese punto coincidía con el valor promedio de la presión diastólicas de las ratas. Este punto fue muy claro, por lo que se tomó como parámetro de registro.

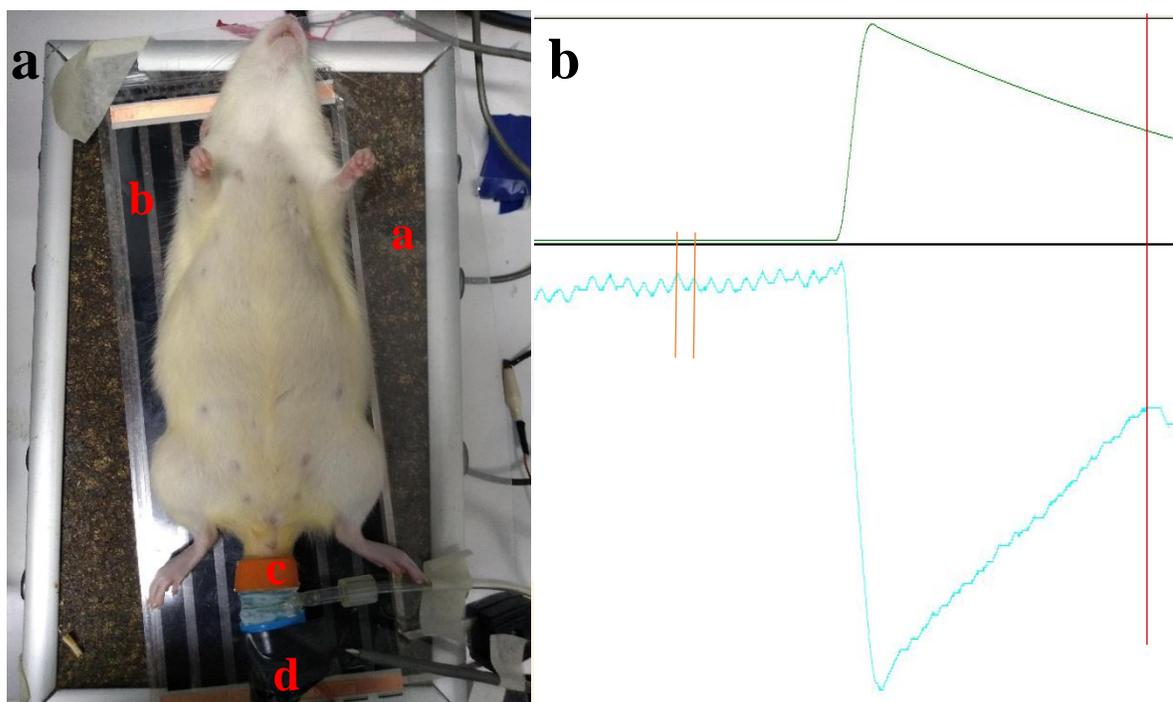


Figura 15. Acomodo de la rata para registrar los efectos del veneno de *L. mactans* sobre el sistema cardíaco (**a** izquierda). Cama para disecciones (**a**); placa térmica (**b**); cuff (**c**); sensor óptico (**d**). Registro de frecuencia cardíaca y presión diastólica (**b** derecha). Las líneas naranjas indican la medición de la frecuencia cardíaca o pulsos por minuto (BPM) en 315 BPM; en tanto que la línea roja indica la presión diastólica en 97.8 mmHg.

Los experimentos tuvieron una duración de 60 minutos, de los cuales se tomaron 10 minutos de control (comenzando a contar desde que la preparación mostraba estabilidad), y 50 minutos de periodo experimental, las cuales fueron llevadas a cabo aplicando veneno crudo liofilizado de *L. mactans* e inyectadas de forma intraperitoneal. Se registraron solo 50 minutos debido a que algunas ratas comenzaban a despertar. Cabe mencionar que se realizaron 7 pruebas, de las cuales solo se reportan 3 experimentos por cada dosis debido a que se descartaron las ratas que terminaban en paro respiratorio y cardíaco, probablemente debido a los efectos del pentobarbital sódico.

4.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando ANOVA y la prueba de Diferencia Significativa de Tukey para determinar diferencias significativas entre las condiciones de control y experimentales. Los datos se analizaron utilizando el software estadístico Graph Pad Prism con ANOVA de una vía ($p < 0,05$).

V. RESULTADOS

5.1 Caracterización y separación del veneno de *L. mactans*

Las muestras de veneno crudo de *L. mactans* que fueron llevadas a caracterizar por electroforesis y Westernblot, se enfocaron a distinguir la presencia de las principales toxinas de la araña *L. mactans*. Además, se aprovechó para comparar el veneno de la especie *L. geometricus*, la cual se ha mencionado, posee toxinas semejantes al de *L. mactans*. Los resultados demostraron que el veneno posee varios componentes proteicos con diferentes pesos moleculares, e incluso se observa que hay proteínas que tienen un peso superior a los 130kDa (**Figura 16a, b y c**).

Además, a lo largo del periodo de realización del doctorado, se obtuvo veneno crudo de *L. mactans* en dos conjuntos de muestras. Estos dos conjuntos de muestras fueron llevados a fraccionar en dos diferentes visitas al Instituto de Biotecnología (IBT) de la UNAM.

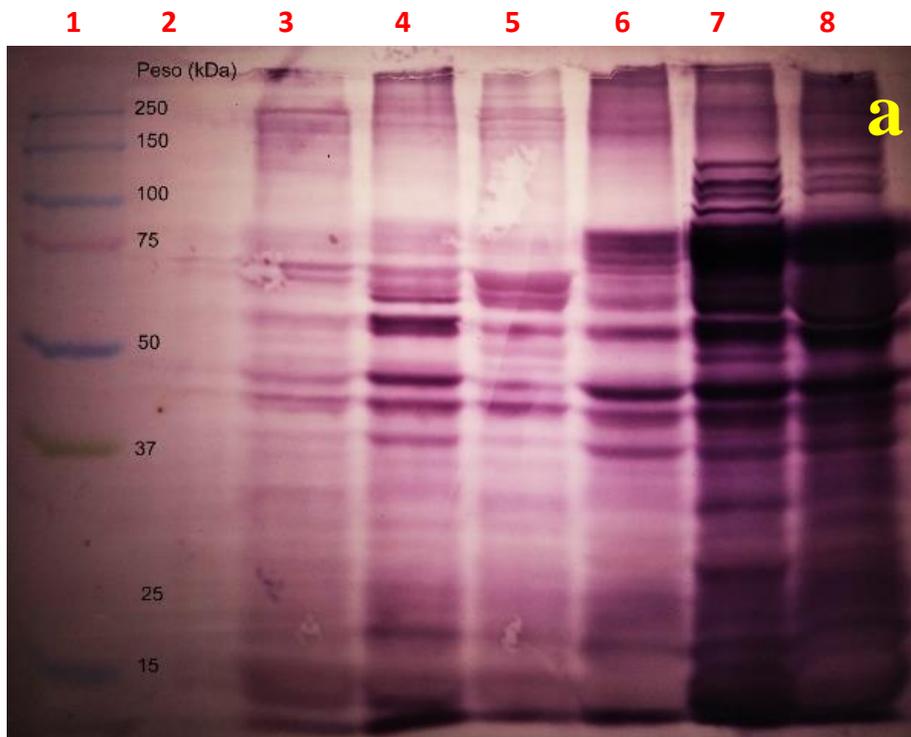


Figura 16a. Análisis del veneno crudo de *L. mactans* por Westernblot. En un gel con 10 pozos (imagen cortada), se corrieron 6 muestras de veneno (pозos 2 al 7). Las muestras de 5 μ l de veneno crudo en cada pozo son de *L. geometricus* (pozo 2) y *L. mactans* (pozo 3 al 7). En el extremo izquierdo se muestra la regla de pesos moleculares. En el pozo 1 no se corrió ninguna muestra; sin embargo, se difundió un poco de muestra de veneno del pozo 2

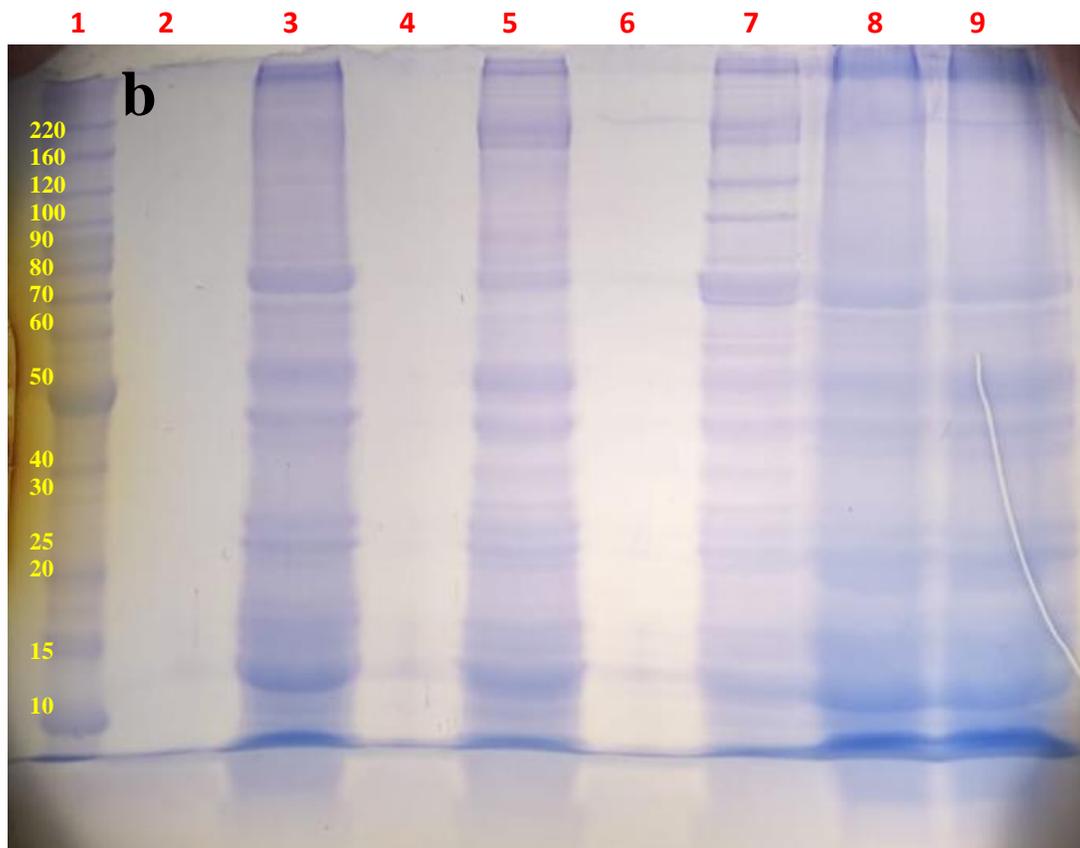


Figura 16b. Electroforesis SDS PAGE del veneno de *L. mactans*. El gel es de 10 pozos, marcados en rojo en la parte superior (la imagen del gel está cortada). Los pozos 3 y 5 tienen veneno crudo de *L. mactans* previamente liofilizado. En tanto que los pozos del 7 al 9 poseen veneno crudo sin liofilizar. El pozo 1 muestra la regla de pesos moleculares. Los pozos 2, 4 y 6 muestran marcas con pequeñas cantidades de veneno que difundió.

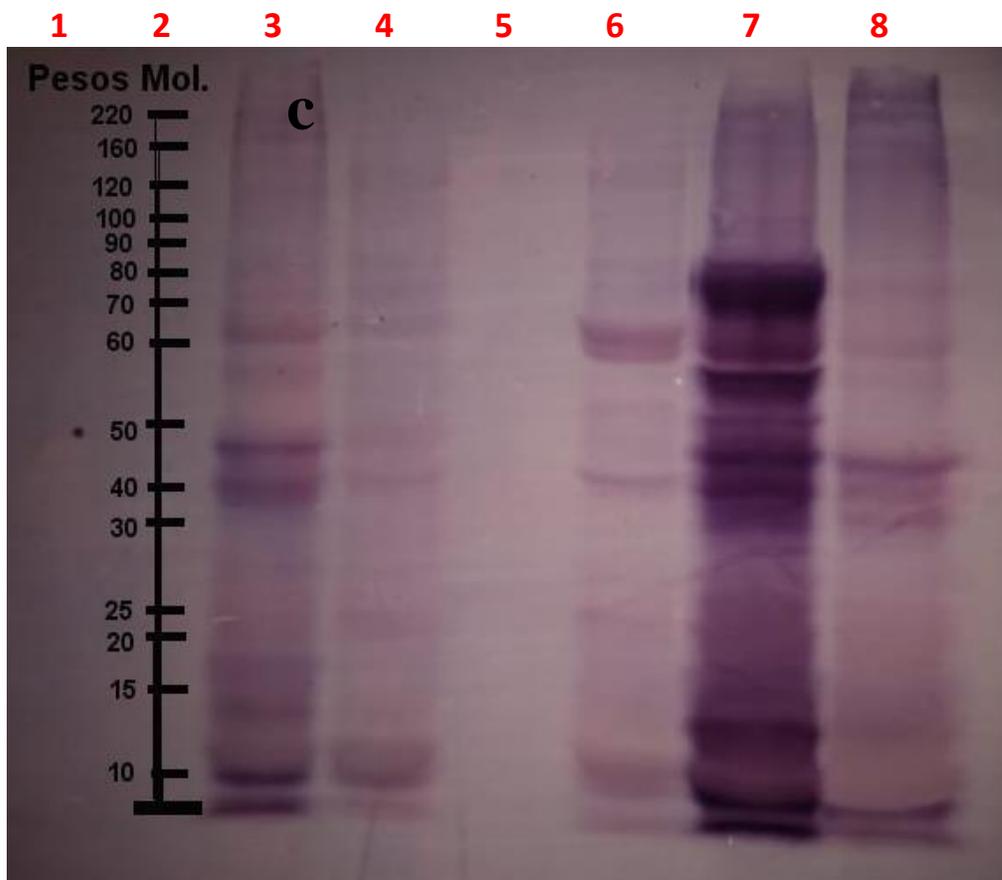


Figura 16c. Westernblot con muestras de veneno de *L. mactans*. Se usó un gel de 10 pozos (imagen cortada). Las muestras en los pozos 3, 6, 7 y 8 (marcados en rojo en la parte superior) son veneno de *L. mactans*. Muestra del pozo 4 con veneno de *L. geometricus*

Las primeras muestras de veneno de *L. mactans* llevadas a fraccionar, fueron el resultado de la suma varias extracciones de diferentes fechas en que se extrajo veneno de las arañas. Estas, fueron liofilizadas en las instalaciones de la UAA. Posteriormente, las muestras de veneno fueron llevadas a fraccionar.

En estas primeras muestras de veneno crudo se obtuvieron 7 mg de veneno liofilizado, los cuales se diluyeron en un mililitro de agua (7mg/ml). Se tomaron 290 µl de la solución equivalentes a 2 mg de veneno. Posteriormente la muestra fue centrifugada a 14 000 rpm por

16 minutos y se separó el sobrenadante. Se ajustó el volumen del sobrenadante a 1 ml con Buffer de fosfato de sodio (5mM con 20% de acetonitrilo). Sin embargo, la mayor parte de la muestra precipitó al ser centrifugadas. Probablemente el método de liofilización que se realizó antes de ser llevadas a fraccionar fue mal efectuado y las proteínas se degradaron.

Se tomó el sobrenadante obtenido de la centrifugación. El sobrenadante fue llevado a fraccionar por HPLC de intercambio iónico (**Figura 17a**), en la cual se usaron dos soluciones Buffer: Buffer de fosfato de sodio 5mM con 20% de acetonitrilo (A) y Buffer de NaCl a 1 M (B). La velocidad de elución fue de 1 ml/min. Se obtuvieron 24 muestras del HPLC y se cuantificaron las proteínas de cada una de las 24 muestras por nanodrop (NanoDrop® ND-1000, espectrofotómetro de espectro total de 220 a 750nm), como se muestra en la **Tabla 1**. Cada una de las 24 muestras obtenidas del HPLC fueron resuspendidas en 50µl de agua. Se tomaron 10 µl por cada muestra para después pasarlos a electroforesis. Las muestras restantes fueron secadas para su posterior uso. Las muestras que fueron pasadas a electroforesis se observaron proteínas con un peso de entre 15 a 20 kDa (**Figura 17b**).

Muestra (tubo)	Tiempo de muestra (min)	Concentración (mg/ml)	Muestra (tubo)	Tiempo de muestra (min)	Concentración (mg/ml)
1	1.7	0.05	13	17.2	-0.03
2	3.0	0.04	14	18.7	0.01
3	4.5	0.06	15	19.8	-0.01
4	6.1	0.02	16	21.2	-0.02
5	7.5	-0.01	17	22.7	0.03
6	8.9	0	18	24.3	0.01
7	9.2	-0.02	19	25.8	-0.02
8	10.7	0.03	20	27.2	-0.05
9	12.1	0	21	28.8	-0.03
10	12.8	0	22	30.3	-0.02
11	14.3	-0.02	23	31.8	-0.02
12	15.9	-0.01	24	33.3	-0.02

Tabla 1. Cuantificación de proteínas por microespectrofotometría (nanodrop) de cada una de las muestras sacadas por HPLC de intercambio iónico.

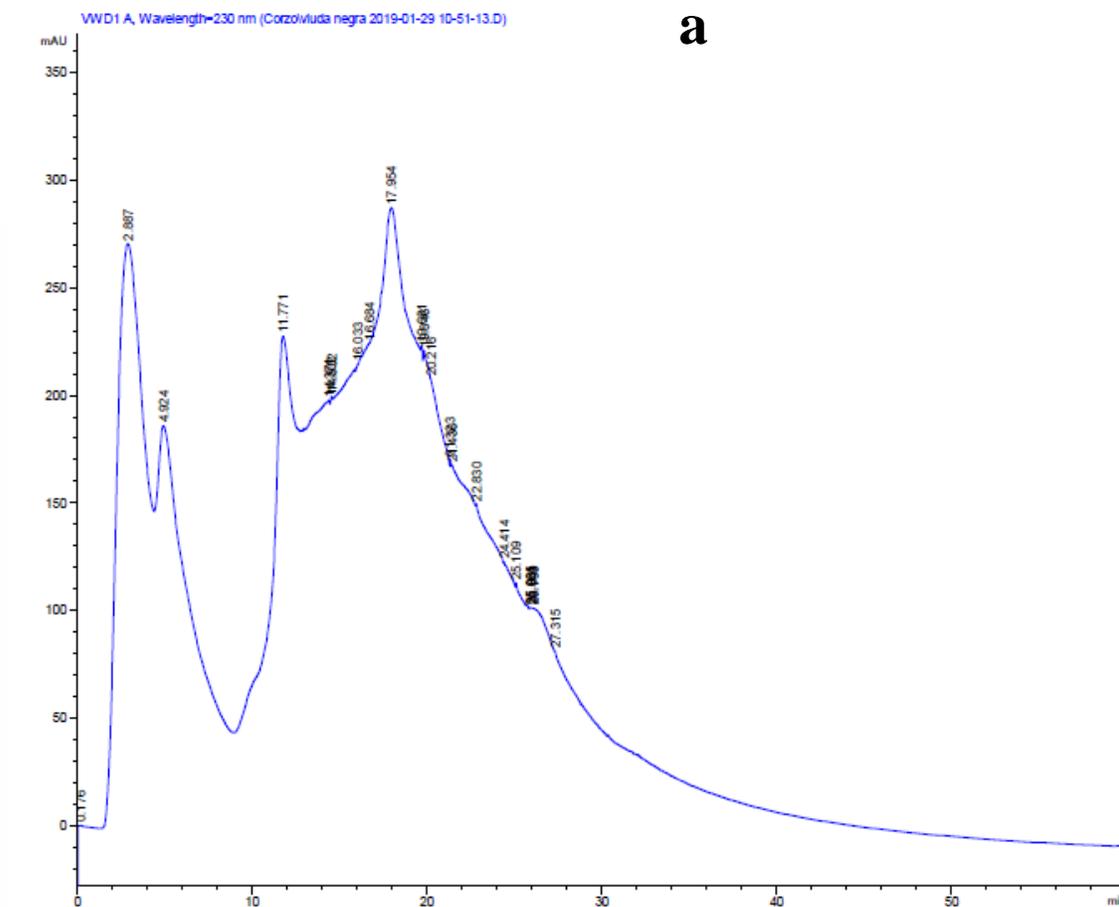


Figura 17a. Cromatograma de HPLC intercambio iónico

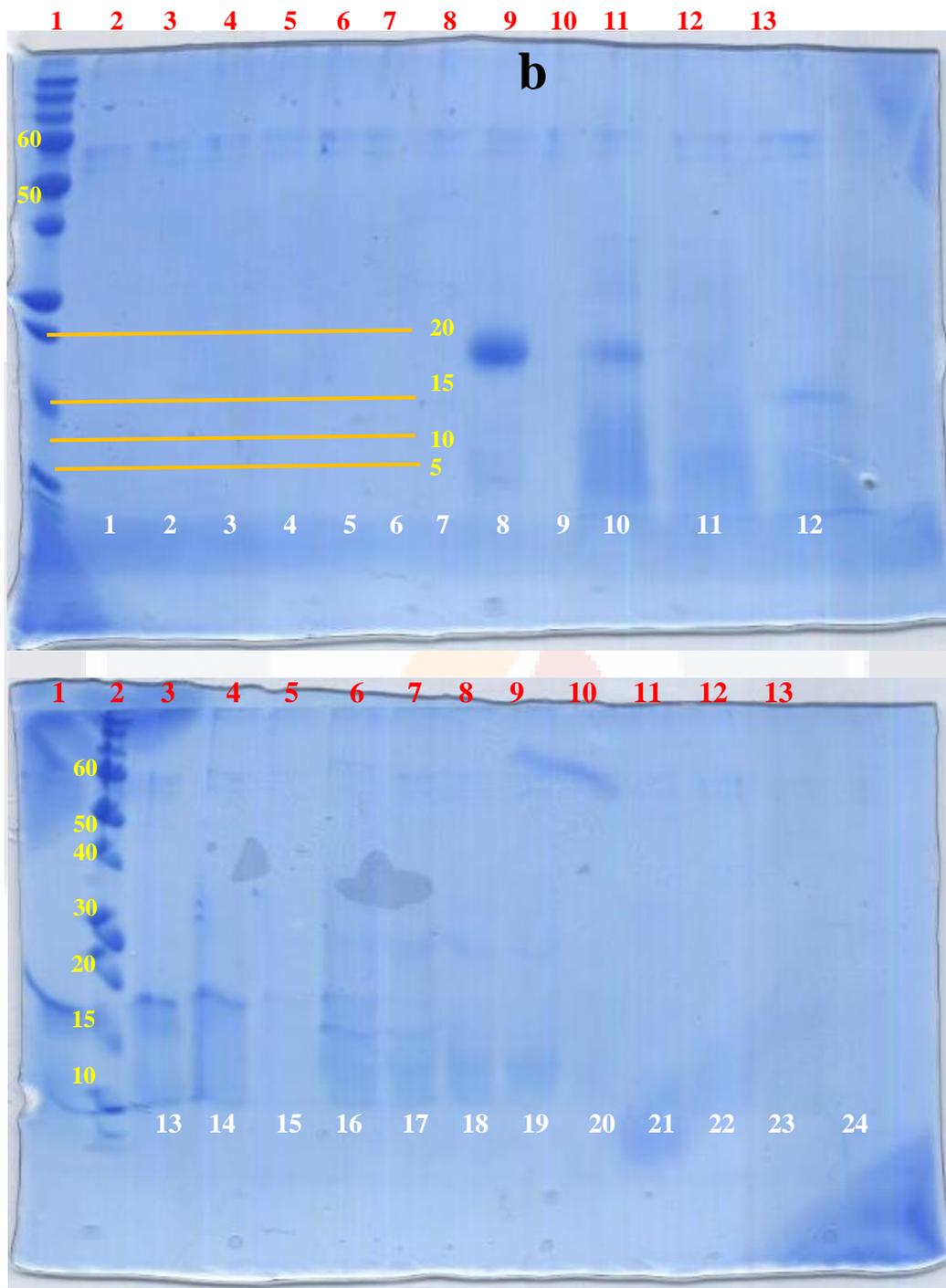


Figura 17b. Electroforesis de las muestras obtenidas por el HPLC de intercambio iónico. Las muestras fueron resuspendidas en agua y llevadas a electroforesis SDS PAGE. En los geles de 15 pozos, se observan numerados cada una de las 24 muestras fraccionadas en la parte inferior de la imagen. Los pesos moleculares se muestran en amarillo al lado izquierdo de la imagen.

Para las posteriores muestras de veneno de *L. mactans* que fueron llevadas a fraccionar, se optó por separar las muestras según el día de la extracción. Se llevaron 5 muestras de las que cada una correspondió a una fecha de extracción. Las muestras de veneno fueron congeladas a -20°C. El transporte de las muestras al IBT fue en forma congelada, usando hielo seco, y no liofilizadas como la primera vez. Se llevó un total de 213.5 mg de veneno de *L. mactans* no liofilizado. Las muestras estaban separadas en 5 tubos, de estos, 4 tubos fueron usados para obtener las fracciones mediante HPLC (**Tabla 2**).

Las muestras M5, M6 y M7, antes de llevarlas a fraccionar, se tomaron muestras para realizar una electroforesis (pozos 7, 8 y 9 respectivamente) y un Westernblot (pozos 6, 7 y 8 respectivamente) como se muestra en las **figuras 16a y b**. Las muestras M8 y M9 no se tomaron muestras para llevarlas a electroforesis ni Westernblot. (previo a llevarlas a fraccionar).

Tubo	Peso de la muestra (total)	Uso
M5	20mg	Fue llevado separa por HPLC
M6	31.4mg	Fue llevado separa por HPLC
M7	64.7mg	Fue llevado separa por HPLC
M8	68.7mg	Fue llevado separa por HPLC
M9	28.7mg	Fue liofilizado y aplicado en ratas

Tabla 2. Muestras de veneno crudo obtenidas de *L. mactans* sin liofilizar

Cabe mencionar que las muestras solubilizaron sin problemas en agua destilada y se llevaron a fraccionar por HPLC Zise-exclusion (**Figura 18**).

La muestra M9 fue llevada a liofilizar y se determinó que tenía una concentración de 1.5 mg/ml de proteína. Mientras que las muestras pool de venenos M5, M6, M7 y M8 fueron combinadas y diluidas con agua destilada. No se formó precipitado al ser pasadas a centrifugación (14 000 rpm por 5 minutos). Después las muestras fueron llevadas a fraccionar mediante HPLC (HPLC infinitely better 1200 LC), usando una columna de Size-exclusion (COSMOSIL-PACKED Column).

La cromatografía por exclusión de tamaño fue llevada a cabo usando 2 buffers: un buffer de agua con acetonitrilo al 10% y un buffer de agua con TFA al 5%. La velocidad de elución fue de 0.5ml/min. Se obtuvieron 19 fracciones, de las cuales, a partir de la fracción 6 se obtuvo concentraciones significativas de proteína (**Figura 18**). Posteriormente todas las muestras fueron secadas y llevadas al laboratorio LAINUS T de la UAA.

Muestra (tubo)	Concentración (mg/ml)	Muestra (tubo)	Concentración (mg/ml)
1	0.038	11	1.439
2	0.056	12	2.134
3	0.042	13	3.021
4	0.044	14	7.289
5	0.071	15	1.092
6	2.506	16	8.162
7	1.055	17	3.839
8	0.316	18	2.475
9	2.1	19	0.469
10	0.421		

Tabla 3. Determinación de la concentración de proteínas de las 24 fracciones del veneno de *L. mactans* por NanoDrop. Las muestras o tubos marcados en rojo se usaron en las pruebas de la preparación cardiaca semi-aislada de *G. portentosa*.

Cada una de las 19 fracciones primero fueron diluidas en 50µl de agua tridestilada. Después se tomaron 10 µl de muestra por cada tubo, de las cuales, 5 µl fueron usados para realizar una electroforesis SDS-PAGE teñidos con coomasie y los otros 5 µl se usaron para realizar un westernblot (**Figura 19**).

El sobrante de cada una de las fracciones (40 µl de volumen por cada tubo), se les adicionó otros 50µl de agua tridestilada. Después fueron llevadas a cuantificar por un NanoDrop 2000 (**Tabla 3**). A partir de la determinación de las concentraciones de proteínas de las fracciones, se decidió cuáles serían las muestras que se aplicarían en las pruebas sobre la preparación cardiaca semi-aislada de *G. portentosa*.

Es importante destacar que las fracciones de los tubos 17, 18 y 19, especialmente el 18, puede observarse una banda de proteína del mismo peso molecular que las bandas que se observaron en las primeras muestras de veneno fraccionadas (**Figura 19**).

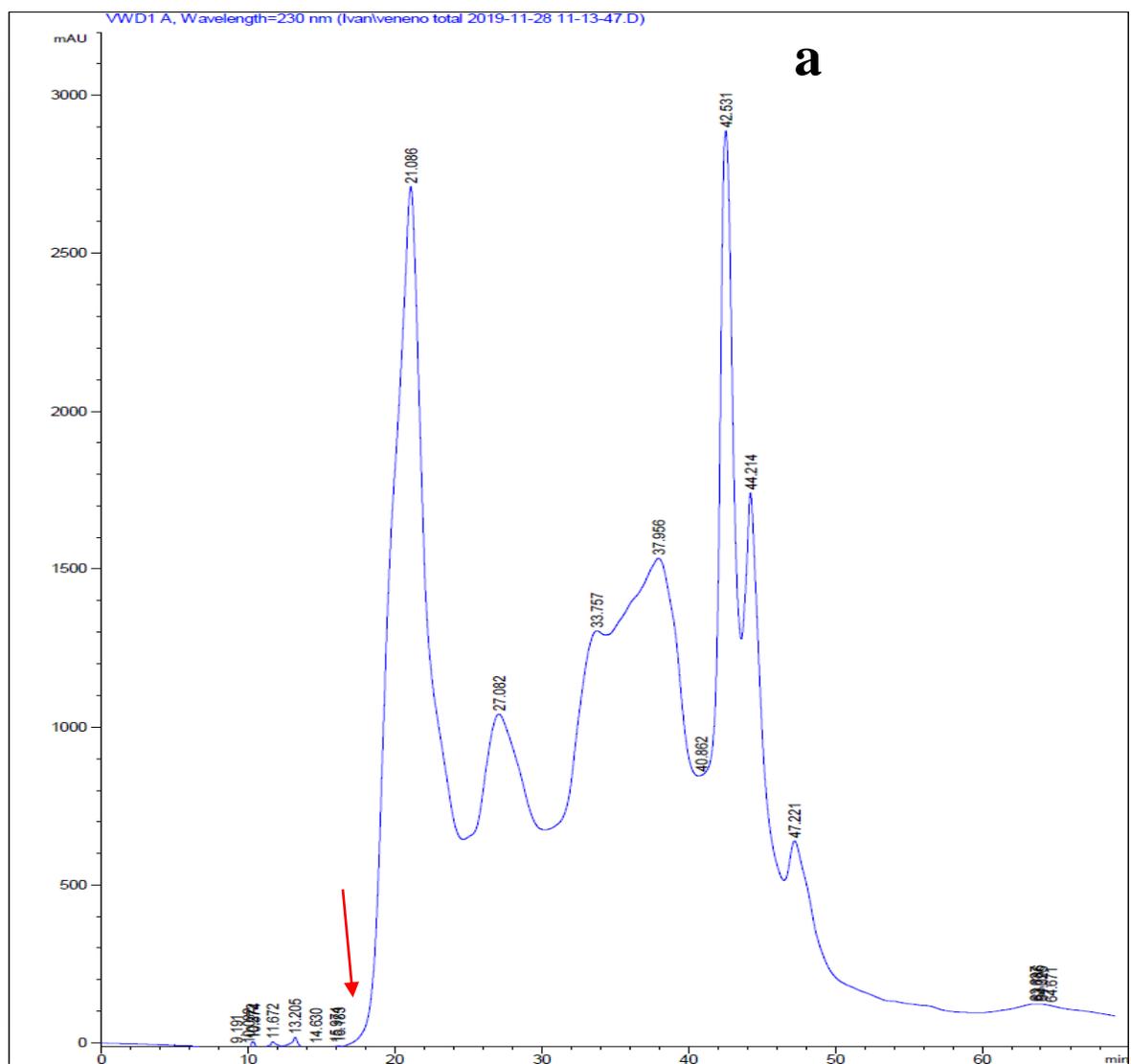


Figura 18. Cromatograma de las muestras obtenidas por el HPLC de exclusión de tamaño: en el cromatograma, la flecha indica donde se tomó la muestra del tubo 6.

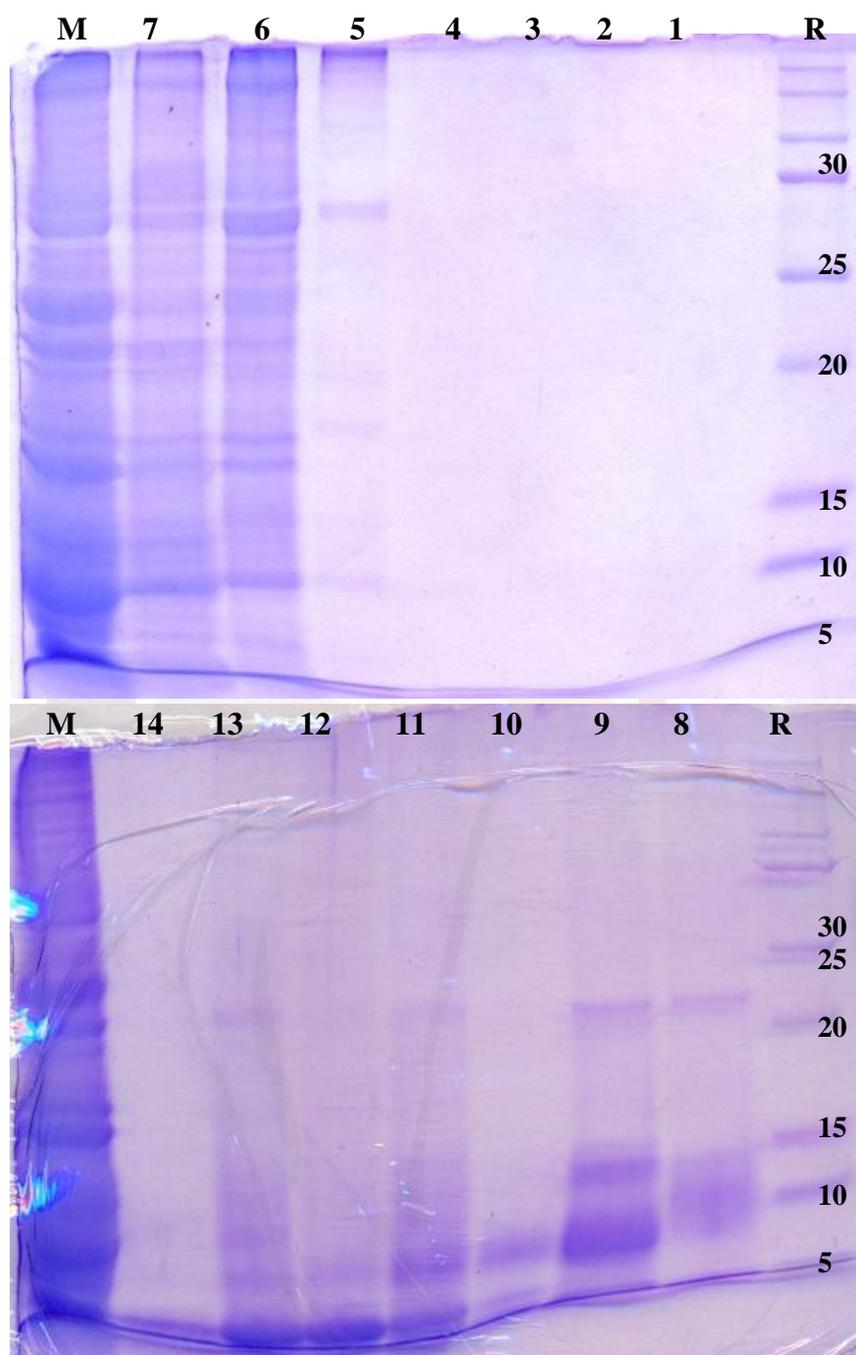


Figura 19a. Geles de electroforesis de las muestras obtenidas por el HPLC de exclusión de tamaño (parte 1). Los geles son de 10 pozos (imagen cortada). Los números del lado derecho negro indican los pesos moleculares. La “M” indica donde se puso la muestra con veneno crudo liofilizado (muestra M9). Los números de la parte superior indican los pozos donde se pusieron las muestras de las fracciones. La R indica la regla con los pesos moleculares.

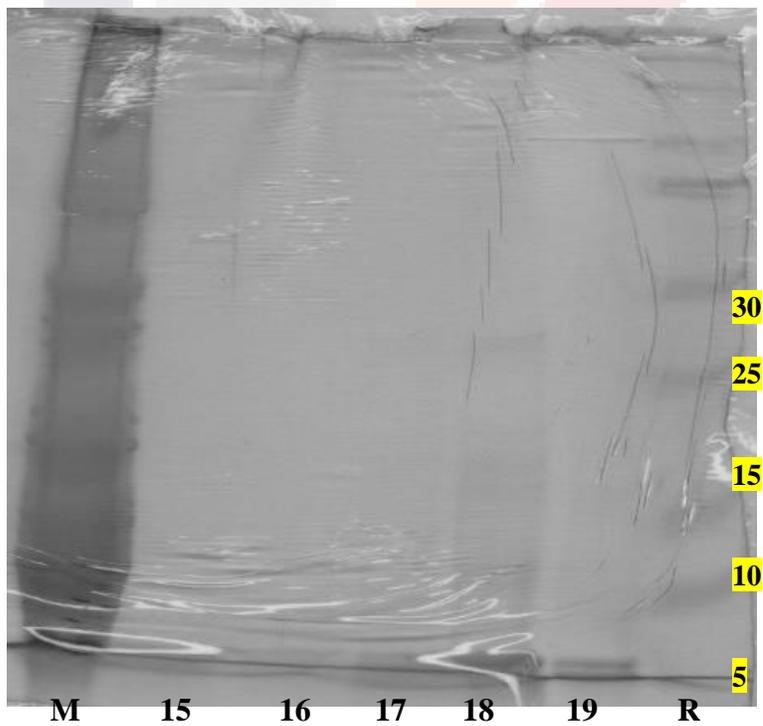
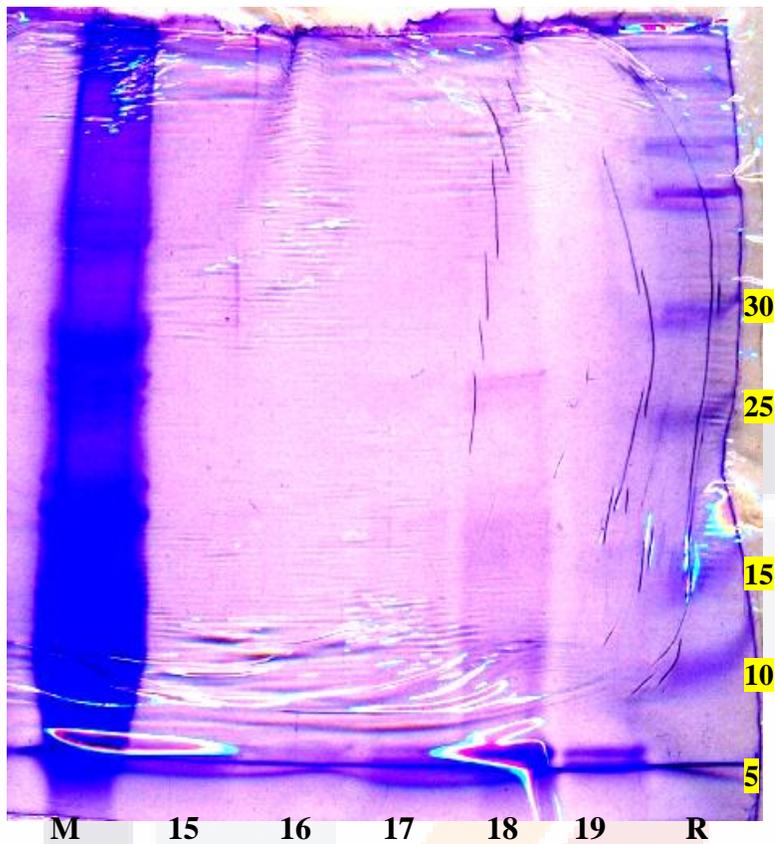
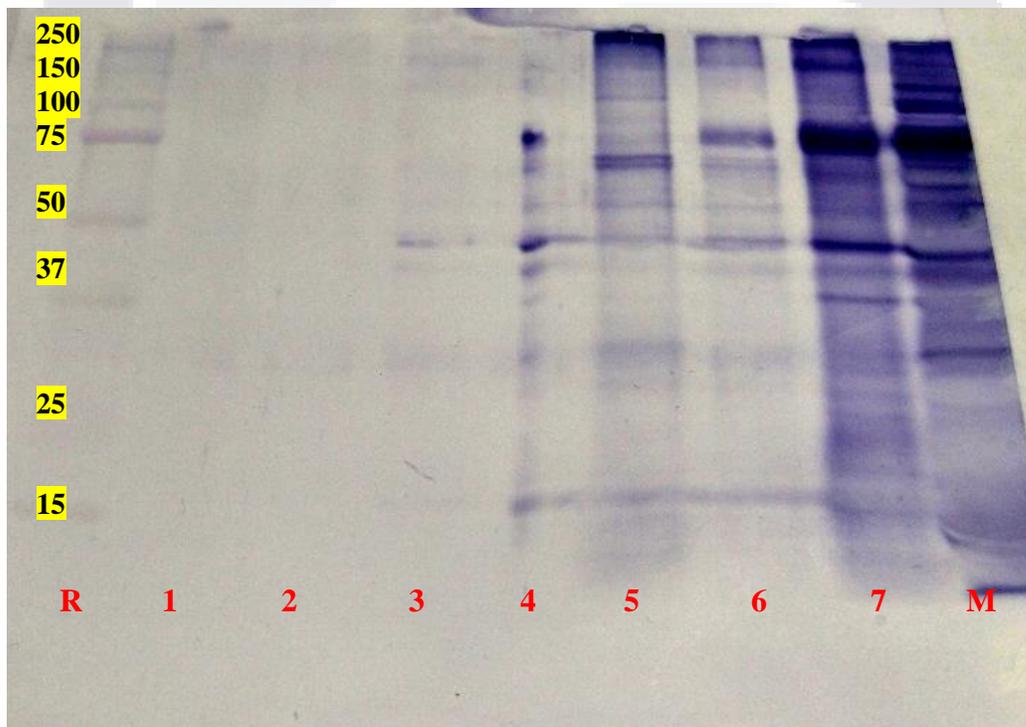


Figura 19b. Geles de electroforesis de las muestras obtenidas por el HPLC de exclusión de tamaño (parte 2). El gel es de 10 pozos (imágenes cortadas). Los números del lado derecho negro indican los pesos moleculares. La “M” indica donde se puso la muestra con veneno crudo liofilizado (muestra M9). Los números de la parte superior indican las muestras fraccionadas colocadas en los pozos. La R indica la regla con los pesos moleculares. Las imágenes son de un mismo gel, que contienen muestras de las fracciones 16 al 19, y se le aumentó el contraste debido a que las fotos de los geles salieron muy tenues (foto de arriba) y en blanco y negro (colores en canales divididos) sin aumentar el contraste (foto inferior) para corroborar que se trata del mismo gel.



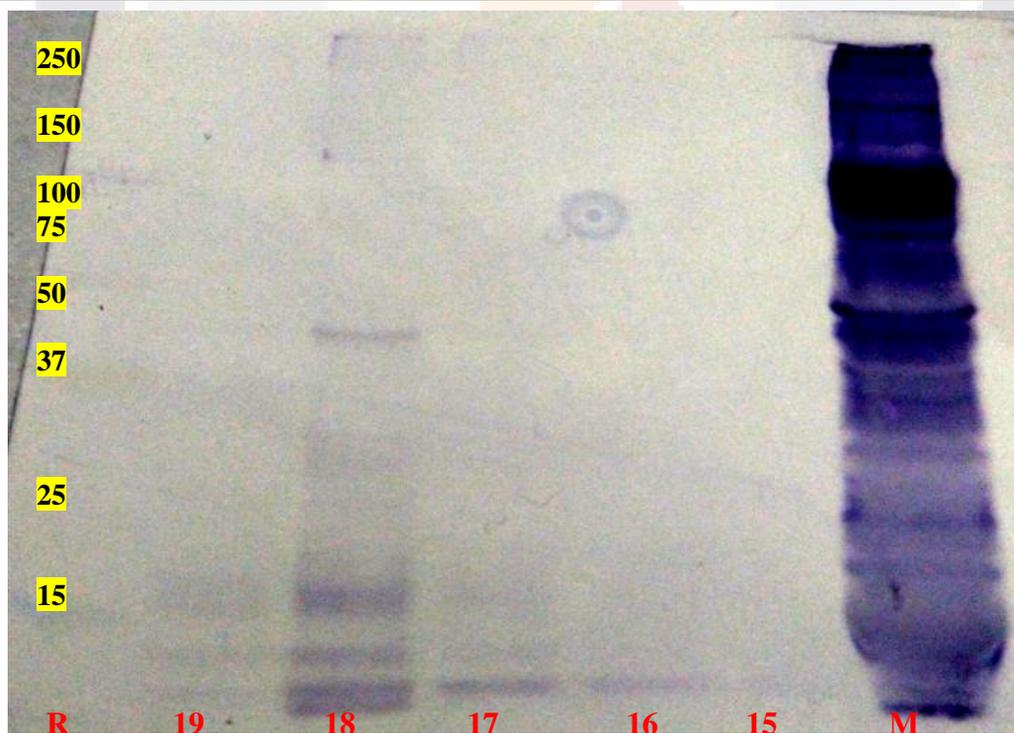
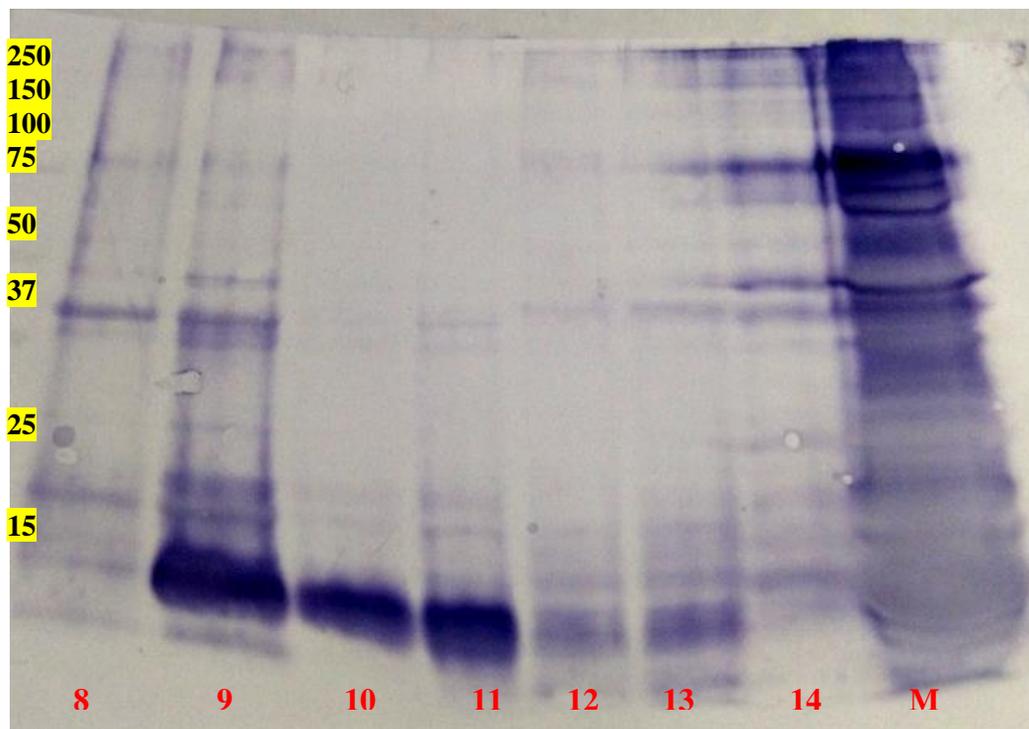


Figura 19c. placas de Westernblot de las muestras obtenidas por el HPLC de exclusión de tamaño. Los números del lado izquierdo indican los pesos moleculares. La “M” indica donde se puso la muestra con veneno crudo liofilizado (muestra M9). La R indica la regla de pesos moleculares. Los números de abajo indican las muestras de las fracciones colocadas en los pozos. Las placas fueron contrastadas image J.

5.2 CARACTERIZACIÓN DE LA PREPARACIÓN CARDIACA DE *G. PORTENTOSA*

Para validar nuestra metodología sobre el registro de la función cardíaca, evaluamos las contracciones de la válvula intracardíaca de preparaciones semi-aisladas de corazones de *G. portentosa*. Los eventos cardíacos se caracterizaron eficazmente por la sincronización video y el movimiento registrado por el transductor isotónico, nuestras observaciones indicaron una relación bien establecida entre el movimiento de las válvulas intracardíacas, el volumen de hemolinfa en el corazón, la diástole y la sístole.

La relación entre el corazón y el movimiento de las válvulas intracardíacas se puede describir en cuatro etapas que impulsan el flujo de la hemolinfa, la apertura del corazón (diástole) y la contracción del corazón (sístole). Estas etapas se pueden identificar claramente mediante grabación de video. En la primera etapa (etapa sistólica), la válvula se contrae y se extiende en dirección posterior (**Figura 20a y b**). La segunda etapa (etapa diastólica) comienza cuando la válvula cierra el espacio luminal (**Figura 20c y d**). La tercera etapa consiste en una válvula que gira en dirección anterior y es seguida por el inicio de una nueva etapa sistólica (**Figura 20e**). Durante las fases sistólicas, la válvula se mueve rápidamente hacia una dirección posterior y se contrae (**Figura 20f**). El cierre de la válvula intracardíaca restringe el flujo de hemolinfa (**Figura 20d**) y la luz del corazón aumenta hasta alcanzar un volumen máximo. En este momento, la válvula intracardíaca alcanza su posición más cercana a la cabeza anatómica (**Figura 20e**). Además, los eventos cardíacos fueron claramente representados por la grabación del transductor isotónico, ya que cada pico de señal parece corresponder al aumento de volumen máximo en el espacio luminal, mientras que una amplitud de señal decreciente se correlaciona con una disminución en el volumen (Claros y col. 2020).

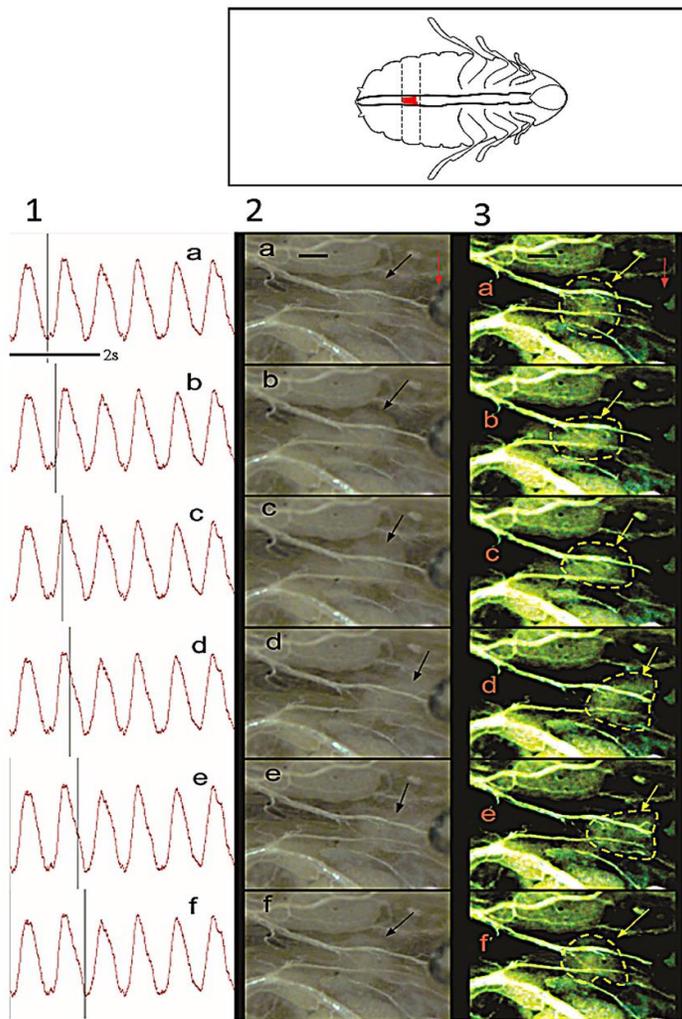


Figura 20. Grabación sincronizada de diástole y sístole cardíaca con el Biopac MP150 y las fotos de la grabación de video. La cucaracha esquematizada (arriba a la derecha) muestra la válvula intracardíaca seleccionada (en rojo) ubicada en el tercer segmento abdominal del corazón de la cucaracha. La cucaracha esquemática también indica la visualización (lado ventral) y la orientación de los fotogramas de video (anterior = derecha, posterior = izquierda). Las columnas 1 a 3 muestran: el registro del movimiento z por el transductor, los fotogramas originales y los mismos fotogramas contrastados por ImageJ, respectivamente. La línea negra muestra la escala (200 μm). Las flechas negras, amarillas y el contorno amarillo indican la válvula. La flecha roja indica la posición del sensor del transductor isotónico (Claros y col. 2020).

Los compuestos colinérgicos, como la ACh, se describen comúnmente como cardioaceleradores en insectos (Miller y Metcalf 1968; Miller 1968 b; Malloy y col. 2016). Se registró y caracterizó el efecto colinérgico de la ACh en *G. portentosa*. El funcionamiento normal de la válvula intracardíaca se vio claramente alterado por la adición de ACh a 5,5

mM. Las fases sistólica y diastólica registradas por el transductor isotónico (**Figura 21, columna 1**) eran de amplitud irregular y su cinética parece más indiferenciada. La válvula tiene un movimiento limitado y el desplazamiento de la hemolinfa parece disminuir drásticamente en comparación con el período de control. El registro de video sugiere que los músculos unidos a la válvula intracardíaca también se ven afectados por la alta concentración de ACh.

El efecto de la ACh también se caracterizó por un aumento inicial de la amplitud basal y diastólica (**Figura 22c y d**). La amplitud diastólica fue sólo significativamente mayor y más prolongada a 5,5 mM. La señal detectada por el transductor isotónico disminuye, lo que sugiere una cavidad cardíaca más contraída (**Figura 22d**). Sorprendentemente, la adición de ACh a 1 mM paralizó las contracciones sistólicas que corresponden a los pulsos de corta amplitud registrados por el transductor isotónico.

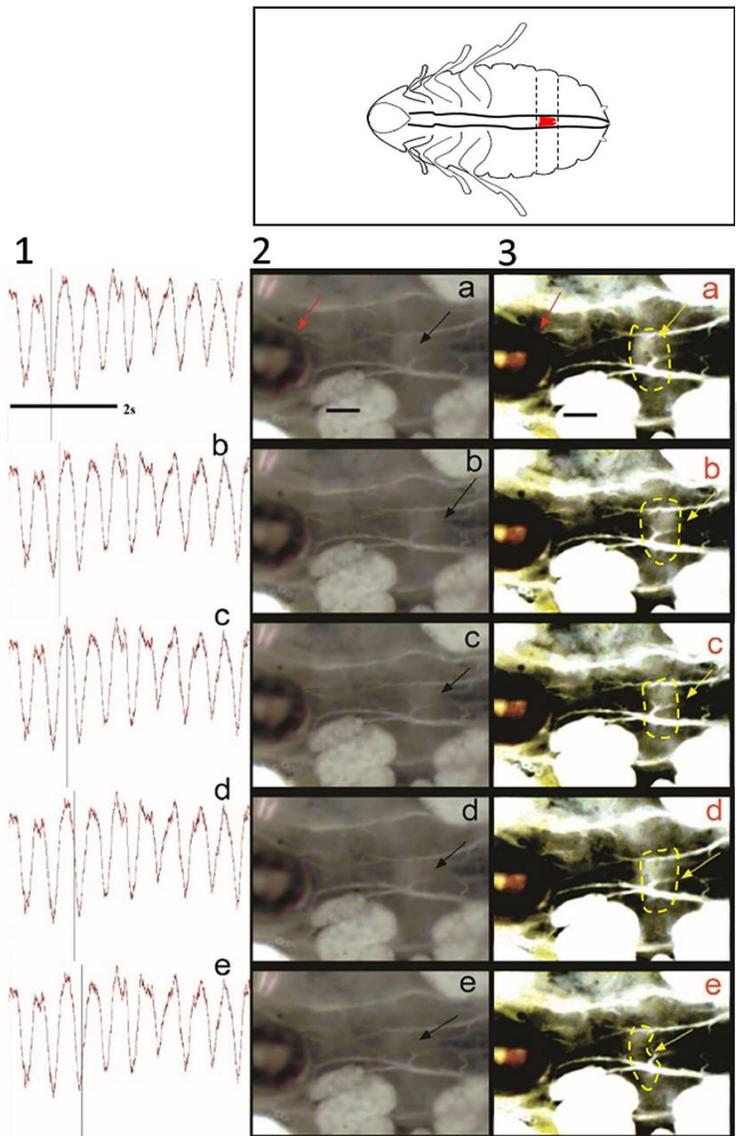


Figura 21. Efectos de ACh en el corazón y la válvula intracardíaca, registrados por transductor isotónico sincronizado y acoplado al Biopac MP150. También se muestran las fotos de la grabación de video. El esquema de la cucaracha (arriba a la derecha) muestra la válvula intracardíaca (seleccionada en rojo) ubicada en el tercer segmento abdominal del corazón de la cucaracha. El esquema de la cucaracha también indica el lado ventral y la orientación de los fotogramas de video (anterior = izquierda, posterior = derecha). La columna 1-3 muestra: la grabación del transductor isotónico, los fotogramas originales y los mismos fotogramas contrastados por ImageJ, respectivamente. La línea negra significa escala (200 μm). Las flechas negras y amarillas y el contorno amarillo indican la válvula. La flecha roja indica la posición del sensor del transductor isotónico (Claros y col. 2020).

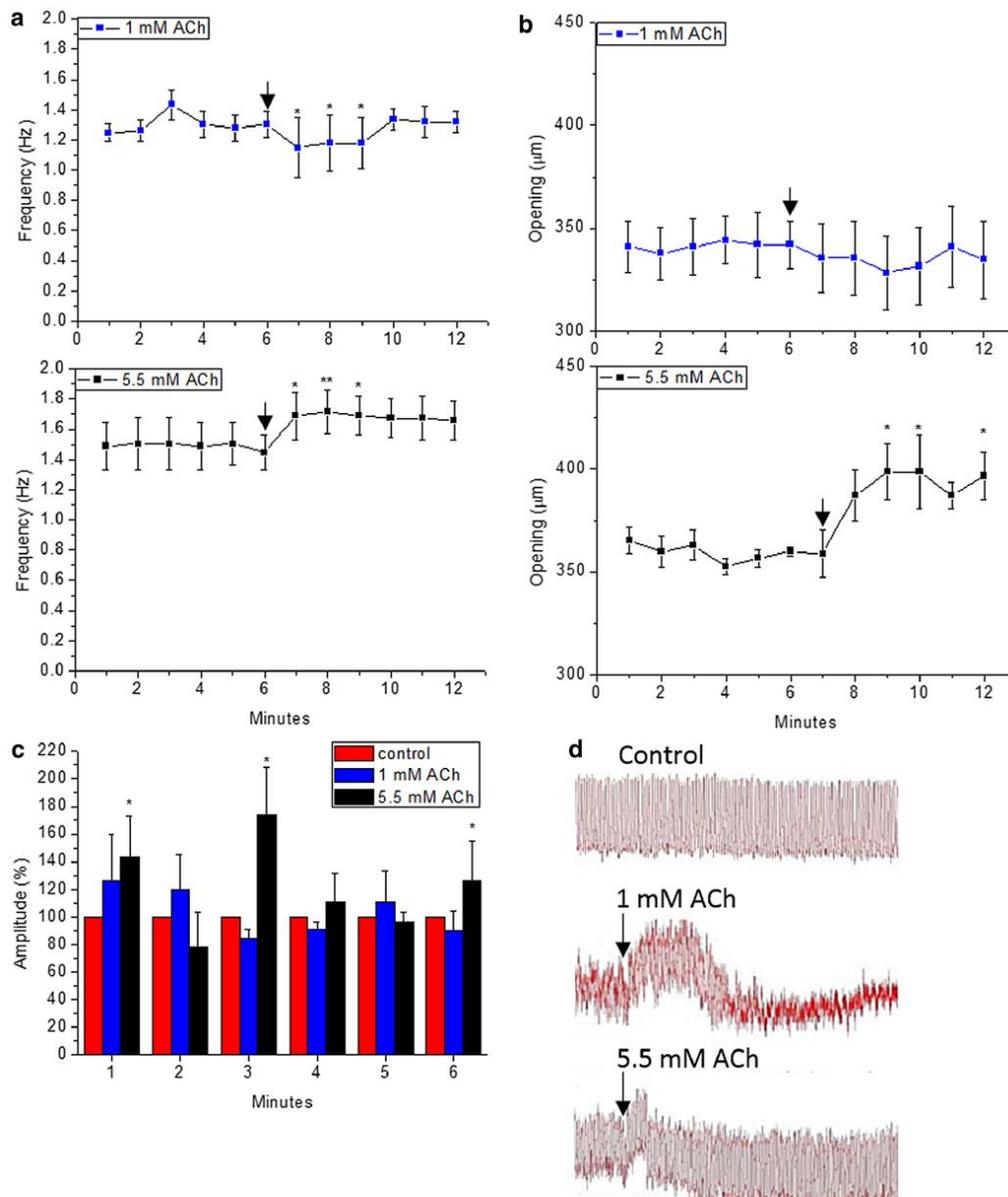


Figura 22. Efectos de la adición de ACh (1 mM y 5,5 mM) en las preparaciones de corazón semi-aisladas de *G. portentosa*: **a** frecuencia cardíaca, **b** apertura del corazón y **c** la amplitud diastólica del corazón. Las amplitudes después de la adición de ACh se expresan como 100% de la amplitud de control. Los datos mostrados son valores medios y las barras de error indican SD (n = 6). **d** Rastros representativos de actividad cardíaca. Las flechas orientadas hacia abajo indican el momento de la adición de ACh (Claros y col. 2020).

También caracterizamos la respuesta colinérgica del corazón de *G. portentosa* utilizando nicotina como agonista colinérgico alternativo. Aunque tanto la ACh como la nicotina afectan a los mismos receptores, sus efectos sobre el corazón fueron diferentes. El movimiento normal de las válvulas intracardíacas también fue alterado por la nicotina a 5,3 μM como ocurrió con la adición de ACh. Sin embargo, el efecto de la nicotina se caracterizó por alterar parcialmente la función de la válvula y sugiere que el flujo unidireccional no se puede mantener de manera efectiva.

La nicotina indujo efectos significativos principalmente en la concentración más alta. Se observó un efecto cardioacelerador no significativo a baja concentración (0.53 μM) acompañado de una señal más alta en el transductor (**Fig. 23 a y d**), mientras que 5.3 μM de nicotina disminuyó significativamente la frecuencia cardíaca y diastólica de apertura. Una concentración de 53,1 μM paralizó las contracciones sistólicas de manera similar a la ACh a 1 mM. La nicotina a 0.53 μM disminuyó transitoriamente la apertura diastólica (**Figura 23 b**), mientras que a 5.3 μM la apertura diastólica disminuyó significativamente en $\sim 20\%$. Aunque la apertura diastólica disminuyó, la amplitud diastólica aumentó significativamente a 5.3 y 0.53 μM (**Figura 23 c**).

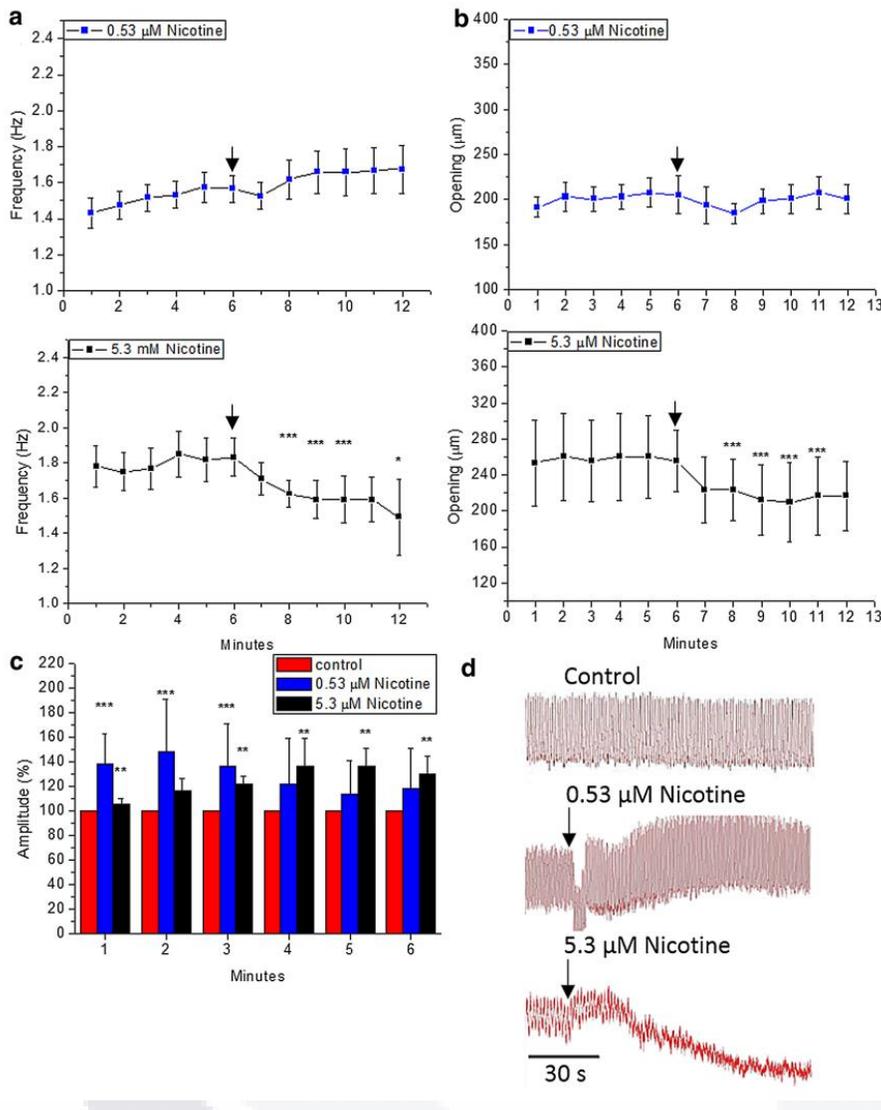


Figura 23. Efectos de la adición de nicotina (0,53 μ M y 5,3 μ M) a las preparaciones de corazón semi-aisladas de *G. portentosa*: **a** frecuencia cardíaca, **b** apertura del corazón y **c** la amplitud diastólica del corazón. Las amplitudes después de la adición de nicotina se expresan como 100% de la amplitud de control. Los datos mostrados son valores medios y las barras de error indican SD (n = 6). **d** Rastros representativos de actividad cardíaca. Las flechas orientadas hacia abajo indican el momento de la adición de nicotina (Claros y col. 2020).

De manera similar a como ocurrió con la ACh a 1 mM, la muscarina en la concentración más baja (10 μ M) indujo una disminución transitoria y significativa de la frecuencia cardíaca y la apertura diastólica (**Fig. 24 a y b**). En contraste, hubo un incremento en la frecuencia cardíaca cuando se agregó muscarina 1 mM y 5,5 mM; sin embargo, solo se observó que esto era

significativo a 5,5 mM. La apertura del corazón aumentó significativamente solo después de la adición de muscarina a 1 mM. La muscarina aumentó ligeramente la amplitud diastólica (**Figura 24c**). La amplitud basal aumentó de forma considerable y permanente con cualquier concentración de muscarina, a diferencia de ACh y nicotina. Además, la muscarina a 1 mM causó parálisis sistólica de manera similar a la ACh a 1 mM (**Figura 24d**). A diferencia de la adición de ACh, la muscarina no indujo ningún efecto importante sobre las válvulas intracardíacas (**Figura 24**).



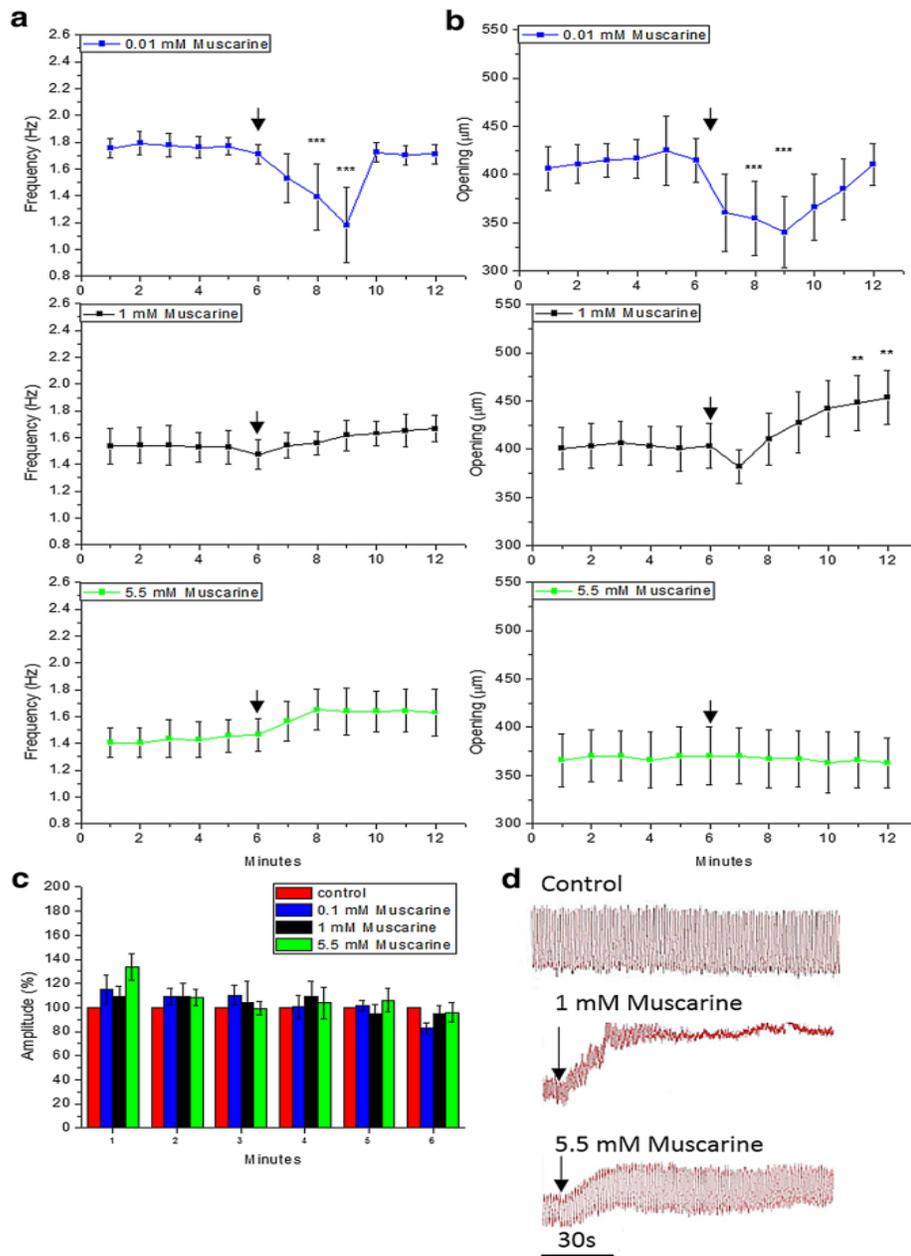


Figura 24. Efectos de la adición de muscarina (0,01 mM, 1 mM y 5,5 mM) a las preparaciones de cardíaca semi-aisladas de *G. portentosa*: **a** frecuencia cardíaca, **b** apertura del corazón y **c** la amplitud diastólica del corazón. Las amplitudes después de la adición de muscarina se expresan como 100% de la amplitud de control. Los datos mostrados son valores medios y las barras de error indican SD (n = 6). **d** Trazos representativos de actividad cardíaca. Las flechas orientadas hacia abajo indican el momento de la adición de muscarina (Claros y col. 2020).

5.3 EFECTOS DEL VENENO CRUDO Y FRACCIONADO DE *L. mactans* SOBRE LA PREPARACIÓN CARDIACA SEMI-AISLADA DE *G. portentosa*

Los efectos del veneno crudo a menor concentración causaron aumento (del 110%) en la apertura del vaso dorsal (apertura diastólica) de *G. portentosa*. Mientras que, a mayor concentración, se observaron tanto aumentos, como disminuciones de la apertura diastólica (**Figura 25a**).

El veneno crudo disminuyó el pulso cardíaco a menor concentración en los primeros 2 minutos después de adicionar el veneno. Mientras que a mayor concentración, causaron tanto grandes aumentos, como disminución del pulso cardíaco (razón por la cual, hay un marcado error estándar en la gráfica B de la **Figura 25b**).

En la amplitud de onda diastólica, se observaron efectos después de agregado extracto crudo de *L. mactans* a en los minutos 1, 3 y 5 en la concentración de 80 mg/kg: y los minutos 1, 3, 4 de la concentración de 120 mg/kg de veneno crudo.

Cabe mencionar que a diferencia de los resultados obtenidos de los agonistas colinérgicos, no se observaron efectos inmediatos en los trasos al adicionar el veneno crudo y las fracciones del veneno de *L. mactans*. Sin embargo, al cabo de unos minutos, se observaron efectos en el veneno crudo (**Figura 25**). Este efecto en el traso se puede observar desde la disminución de la frecuencia cardíaca (**Figura 25 trazo B**), hasta aumentos en a amplitud de onda diastólica (**Figura 25 trazos B y D**).

Tanto en las pruebas con veneno crudo o fraccionadas, no se observaron efectos significativos y repetibles en la válvula intracardiaca de *G. portentosa*. Razón por la cual no se muestran imágenes de los efectos en la función valvular. Solo se tiene registro de una sola vez, en la que se adicionó veneno crudo a la preparación cardíaca semi-aislada, y enfocando a la válvula intracardiaca. En esta prueba se observa como la válvula parece ser degradada conforme pasa el tiempo y con ello, su funcionamiento se ve alterado. Sin embargo esta prueba solo se observó una vez y no se consiguió más grabaciones de este tipo.

Los efectos que se observaron en las primeras muestras fraccionadas, se caracterizaron principalmente en la disminución, hasta la parálisis del pulso cardiaco. Este efecto se observó desde la fracción del tubo 7 y fue más marcado en las fracciones de los tubos 12, 13, 14 y 15 (**Figura 26**). Sin embargo, en la apertura diastólica se observó un aumento en la fracción del tubo 15 (**Figura 27**).

No se reportan los resultados del tubo 13 debido a que fue constante el efecto desde el tubo 12.



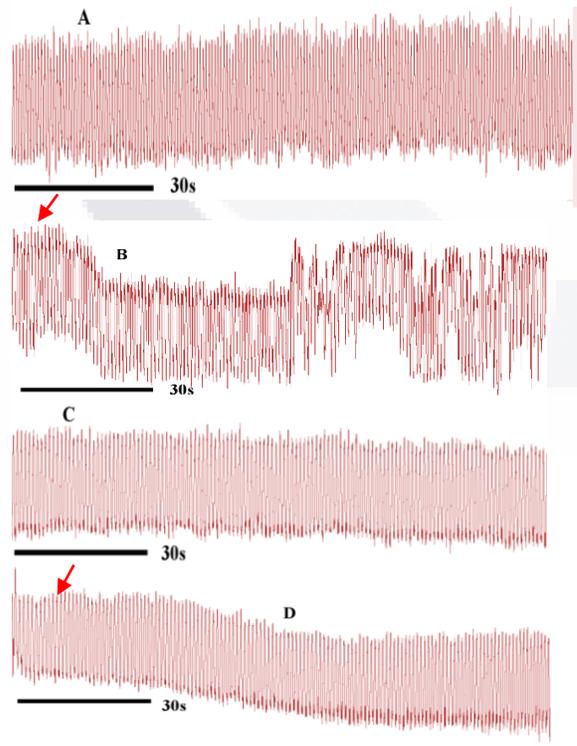
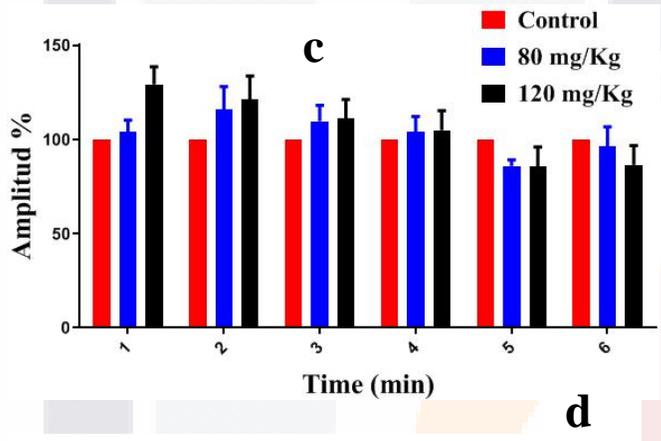
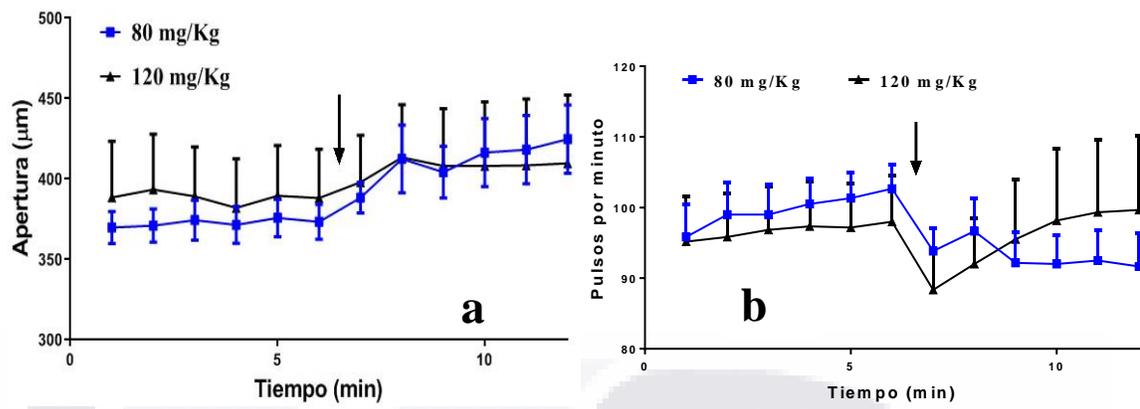
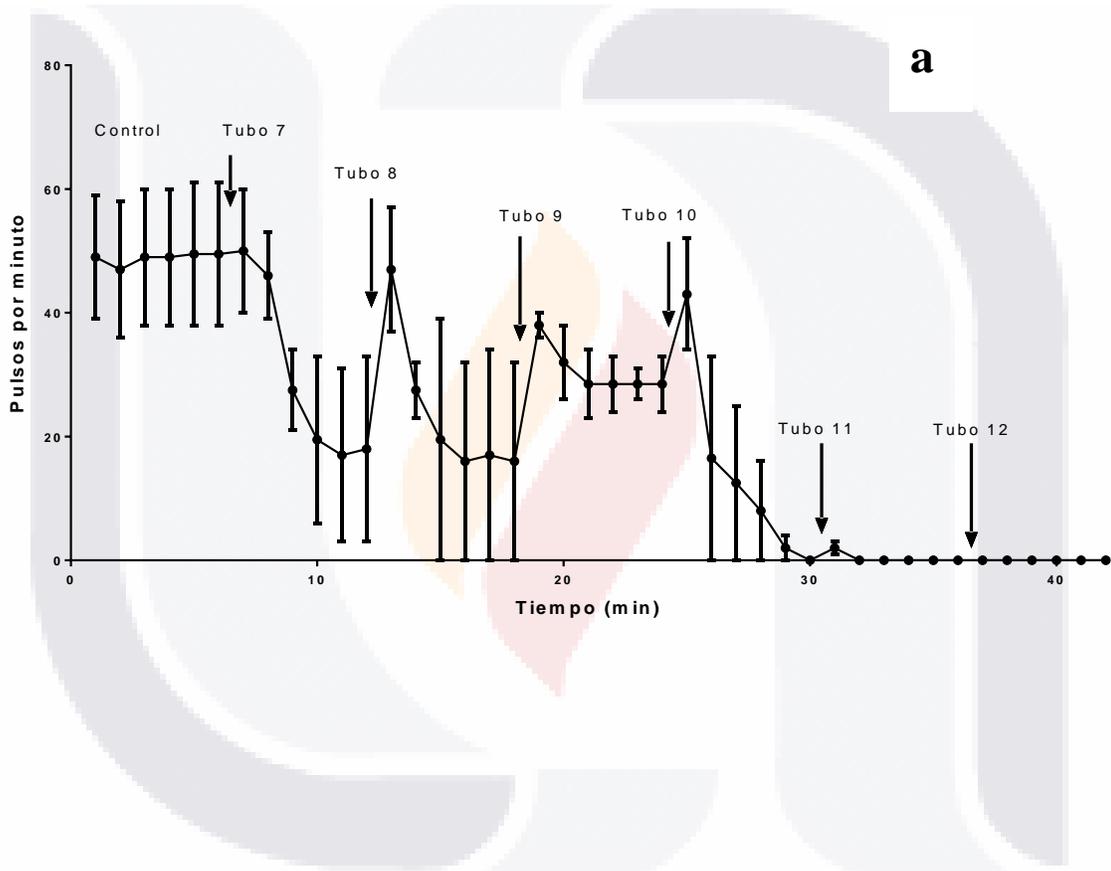


Figura 25. Efectos del veneno crudo de *L. mactans* en el corazón semi-aislado de *G. portentosa*: **(a)** Efectos en la apertura diastólica. **(b)** Efectos en el pulso cardíaco. **(c)** Efectos sobre la amplitud de onda diastólica. **(d)** Efectos observables en el trazado del registro de los pulsos mecánicos del corazón de *G. portentosa*: **A** y **C** representan el trazado del periodo control; **B** representa los efectos del veneno crudo de *L. mactans* con la dosis de 80 mg/kg; y **D B** representa los efectos del veneno crudo de *L. mactans* con la dosis de 120 mg/kg. Las flechas rojas muestran en qué momento se adicionó la dosis de veneno.



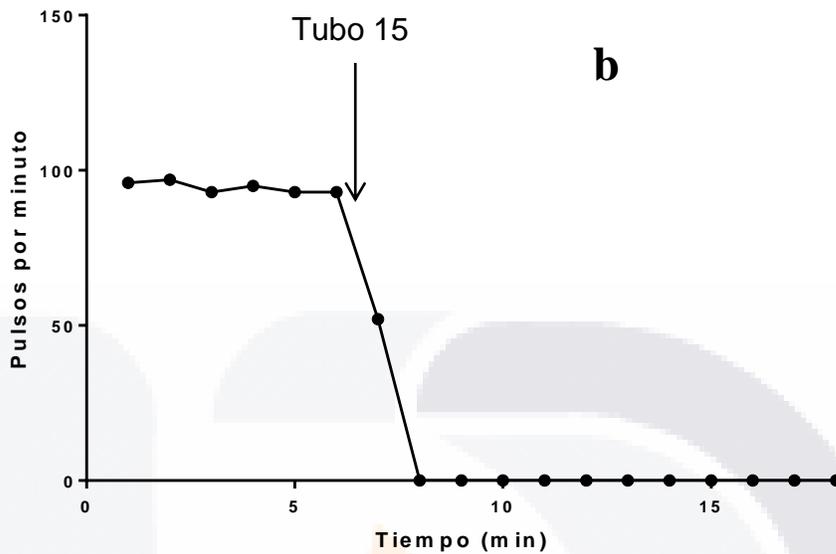


Figura 26. Efectos de las fracciones de veneno de *L. mactans* en el pulso cardiaco del corazón de *G. portentosa*. Pulsos de las cucarachas 1 y 2 (a) y pulsos en la cucaracha 3 (b). Las flechas indican la adición de la fracción correspondiente a cada tubo

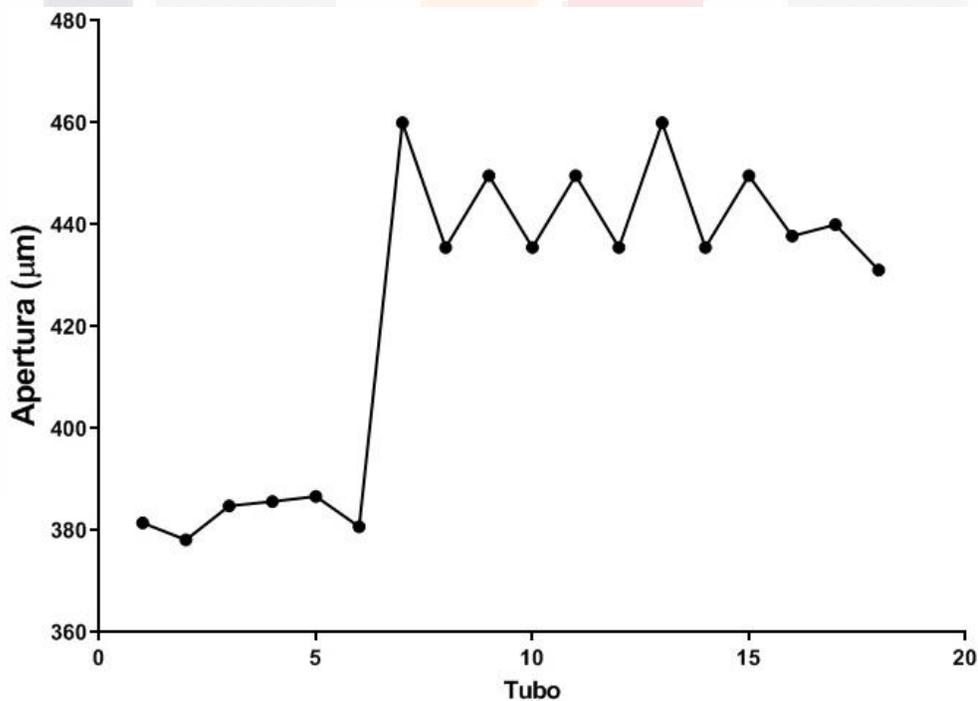


Figura 27. Efectos de las fracciones de veneno de *L. mactans* en la apertura diastólica del corazón de *G. portentosa* con la fracción del tubo 15.

Las fracciones posteriores del veneno de *L. mactans*, fueron probadas en concentraciones de 0.08 mg/ml. Los efectos que se observaron en estas muestras, tuvieron varios efectos entre los que destacan aumento y disminución de la frecuencia cardiaca de preparación de *G. portentosa*. Se encontraron efectos significativos en los tubos 12 y 18. En el tubo 7 se encontraron efectos significativos en los minutos 7 y 8 (2 y 3 minutos después de adicionar la fracción), que se observaron como aumentos en la frecuencia cardiaca, hasta que regreso a su estado normal; en tanto que en el tubo 9 se observaron aumentos en la frecuencia cardiaca en los minutos 10 al 12 (4 minutos después de adicionar el veneno). En el tubo 15 se encontraron efectos significativos solo en los minutos 7, 8 y 9 (2, 3 y 4 minutos después de adicionar la fracción) que se observaron como aumentos en la frecuencia cardiaca y terminando con una subsecuente recuperación (**Figura 28**).

En cuanto a la apertura del vaso dorsal, se observaron efectos significativos en los tubos con las fracciones 7, 9, 11, 12, 13, 15, y 18. Estos efectos se caracterizaron por un aumento de la apertura diastólica, de las cuales, las fracciones de los tubos 12, 13, 15 y 18 tuvieron grandes aumentos sostenidos (**Figura 29**). La fracción del tubo 7 aumento temporalmente de manera significativa en los minutos 9 al 12 y terminó regresando a su apertura normal (minuto 13). La fracción del tubo 9 aumento levemente, pero significativo, en los minutos 11 al 13. La fracción del tubo 11 también aumento ligeramente, pero significativo, en los minutos 10, 11 y 13. Se observaron grandes aumentos significativos en las fracciones de los tubos 12 (todo el tiempo después de la adición del veneno), 13 (minutos 8, 10 hasta el 13), 15 (minutos 7, 8, 9, 11, 12 y 13) y 18 (minutos 8 al 13).

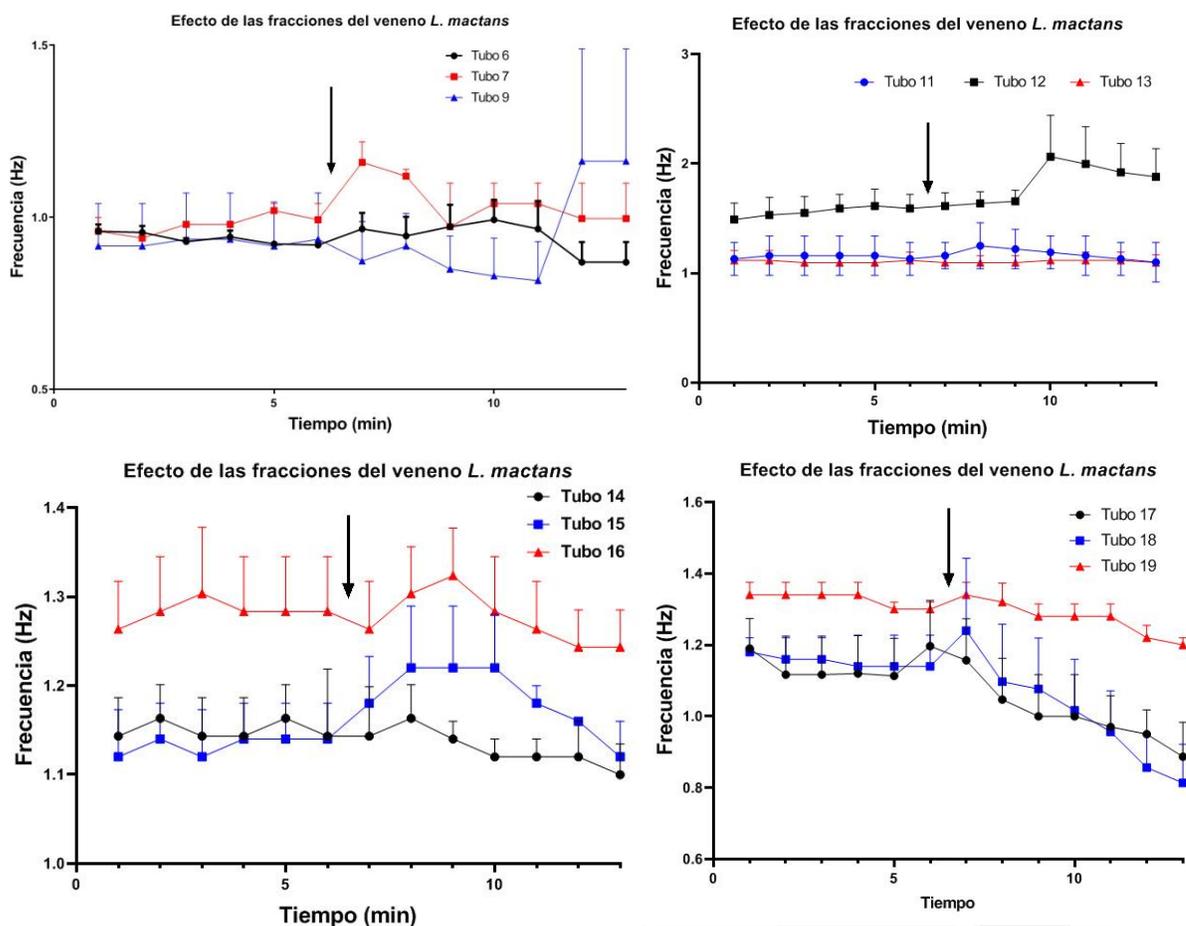


Figura 28. Efectos del veneno fraccionado de *L. mactans* en la frecuencia cardiaca de la preparación semi-aislada de *G. portentosa*. La flecha indica el tiempo de adición de la fracción.

En la amplitud de onda sistólica, la mayoría de las fracciones del veneno no causaron efectos significativos. En las fracciones de los tubos donde se observaron efectos significativos, se pueden ver aumentos en la amplitud de onda sistólica, con excepción de la fracción del tubo 18, en donde se observa una disminución sostenida. En las fracciones del tubo 14, hubo un aumento significativo, pero temporal, al cual fue en los primeros 2 minutos de haber adicionado la fracción del veneno. En tanto que en la fracción 13 el aumento en la amplitud se produjo significativamente en los minutos 9, 10, 11 y 13 y 15. En la fracción del tubo 18 se observó una disminución significativa y sostenida en los minutos 9 al 13 (**Figura 30**).

Los efectos del veneno en la frecuencia eléctrica registrada en la preparación semi-aislada de *G. portentosa*, fue analizada considerando solo la amplitud de onda diastólica. Debido a que

las frecuencias eléctricas de una preparación a otra podían variar mucho, incluso solo adicionando solo solución salina (de la cual se cuidó mucho el que solo se adicionara una mínima cantidad necesaria). Cabe mencionar que la frecuencia eléctrica se registró en Hz y tomando en cuenta solo las ondas predominantes en el análisis espectral de potencia registrado en el MP36.

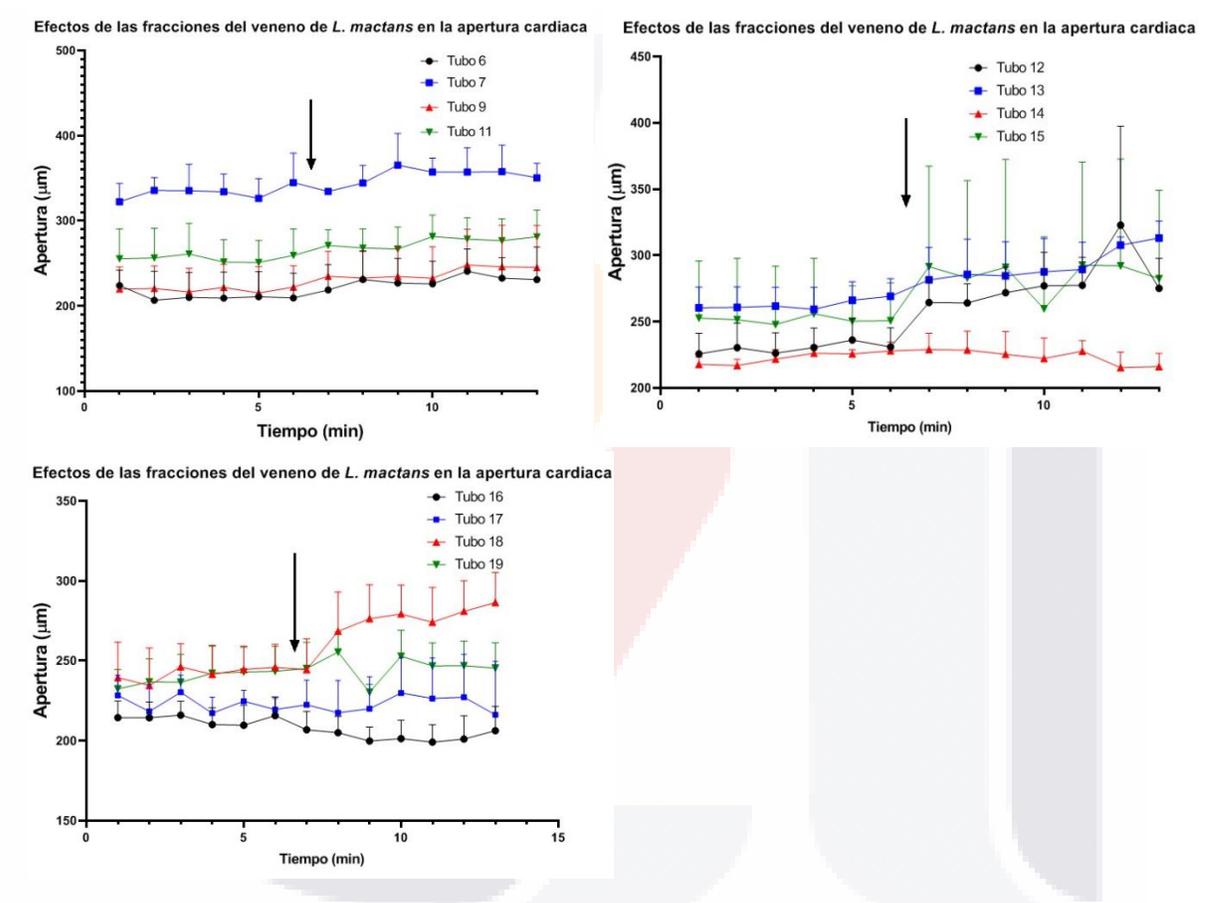


Figura 29. Efectos del veneno fraccionado de *L. mactans* sobre la apertura diastólica cardiaca de la preparación semi-aislada de *G. portentosa*. La flecha indica el tiempo de adición de la fracción.

Para estandarizar este método, se realizaron pruebas donde se comparó si la adición de solución salina fisiológica para *G. portentosa* podría causar alteraciones en las frecuencias eléctricas. Los resultados mostraron que la adición de solución salina no altera la frecuencia cardiaca (**Figura 31**).

En la mayoría de las pruebas con las fracciones del veneno sobre la preparación cardiaca semi-aislada de *G. portentosa* no causaron efectos significativos en los pulsos eléctricos del corazón de *G. portentosa*. Sin embargo, las fracciones de los tubos 9, 18 y 19 causaron tanto aumento, como disminución de la frecuencia de los pulsos eléctricos cardiacos. De esta manera, las fracciones de los tubos 9 y 19, disminuyeron de manera significativa la frecuencia eléctrica del corazón. Mientras que la fracción del tubo 18 aumento de manera significativa los pulsos cardiacos (**Figura 31**).

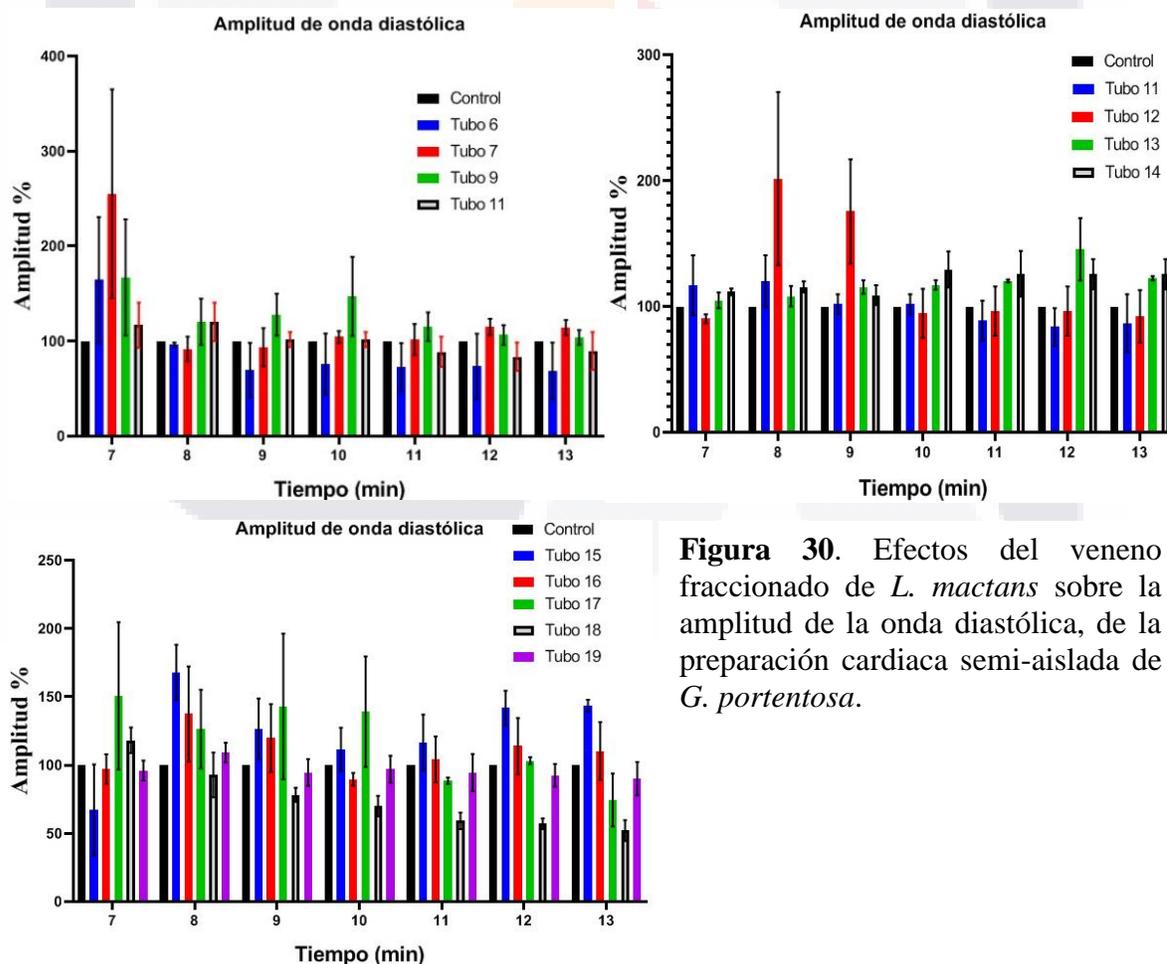


Figura 30. Efectos del veneno fraccionado de *L. mactans* sobre la amplitud de la onda diastólica, de la preparación cardiaca semi-aislada de *G. portentosa*.

Los trazos donde se registran tanto el periodo control, como los efectos de las fracciones del veneno de *L. mactas* (segunda visita al IBT), demuestran parentesco a los primeros resultados obtenidos al aplicar veneno crudo a concentraciones de 80 y 120 mg/kg. Estos resultados se caracterizaron tanto por el aumento de la frecuencia cardiaca y la amplitud de onda diastólica, como por la disminución de frecuencia cardiaca, seguido de la disminución de la amplitud onda diastólica (**Figura 32**).

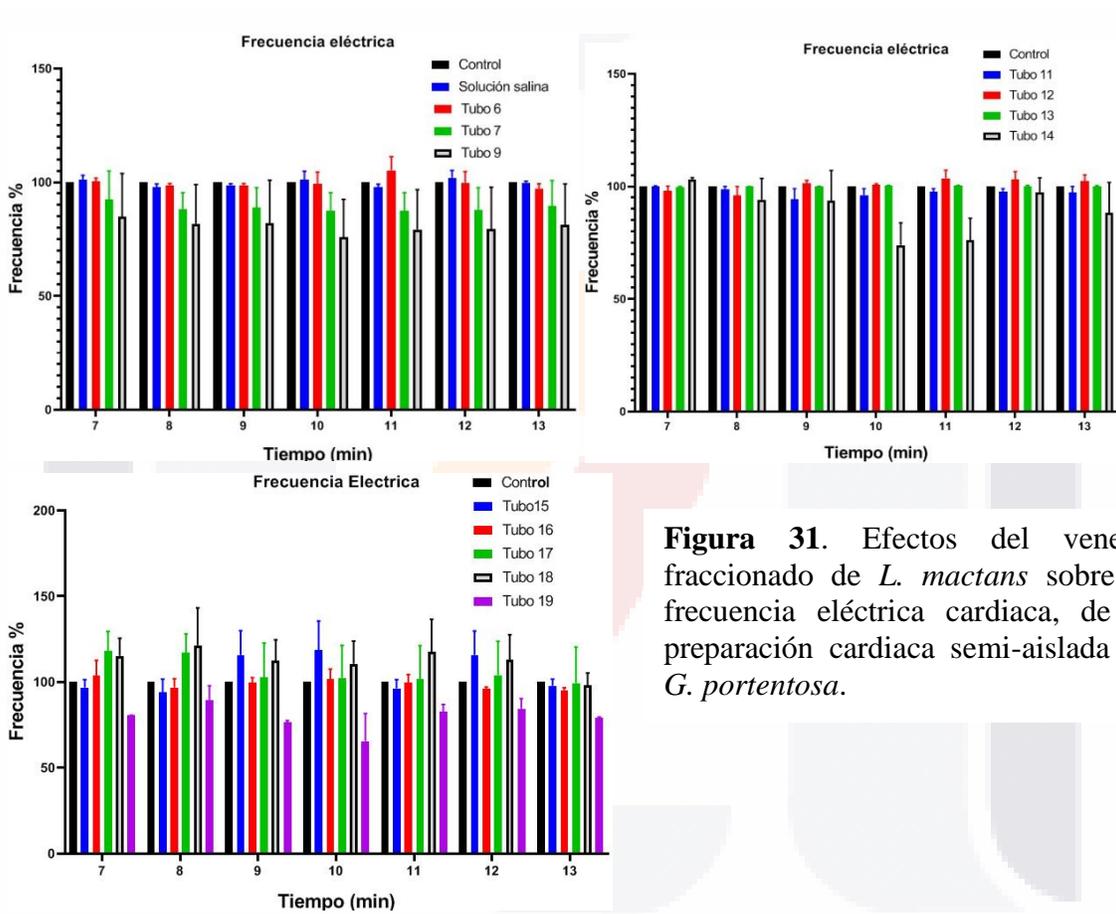


Figura 31. Efectos del veneno fraccionado de *L. mactans* sobre la frecuencia eléctrica cardiaca, de la preparación cardiaca semi-aislada de *G. portentosa*.

La mezcla de las fracciones de los tubos 7, 9, 17, 18 y 19 con antiveneno, no mostraron efectos significativos sobre la frecuencia mecánica del corazón, así como tampoco sobre la apertura del corazón. Se pueden observar ligeras disminuciones o aumentos después de la adición de la mezcla de veneno con antiveneno, tanto en la frecuencia cardiaca (**Figura 33a**), como en la apertura del corazón (**Figura 33b**); sin embargo, estos posibles efectos solo son temporales. En el caso de la frecuencia eléctrica del corazón y la amplitud de onda diastólica,

Se pueden ver también ligeras disminuciones y aumentos que tienden a regresar a la normalidad (**Figura 33c y d**). Sin embargo, en la frecuencia eléctrica del corazón, la fracción con antiveneno 9 muestra una disminución, seguida de un ligero aumento, la cual es diferente al efecto visto solo con la fracción. Mientras que, con esta misma muestra, solo se presenta un pequeño aumento en la amplitud de onda diastólica, muy diferente en comparación al efecto observado por la fracción sin el antiveneno.

En la fracción del tubo 18, hubo un ligero aumento sostenido en la frecuencia eléctrica del corazón; a diferencia del visto en la fracción sin el antiveneno, donde este efecto también es sostenido, pero se observa mucho mayor que con la mezcla con antiveneno. En cuanto a la amplitud de onda diastólica, la mezcla de la fracción del tubo 18 con antiveneno, muestra un leve aumento (**Figura 33**); mientras que en la fracción sin antiveneno, el efecto fue una gran disminución sostenida. Debido a problemas técnicos, no se muestran las pruebas de frecuencia eléctrica cardíaca ni las de amplitud diastólica, con el tubo 19 con antiveneno.

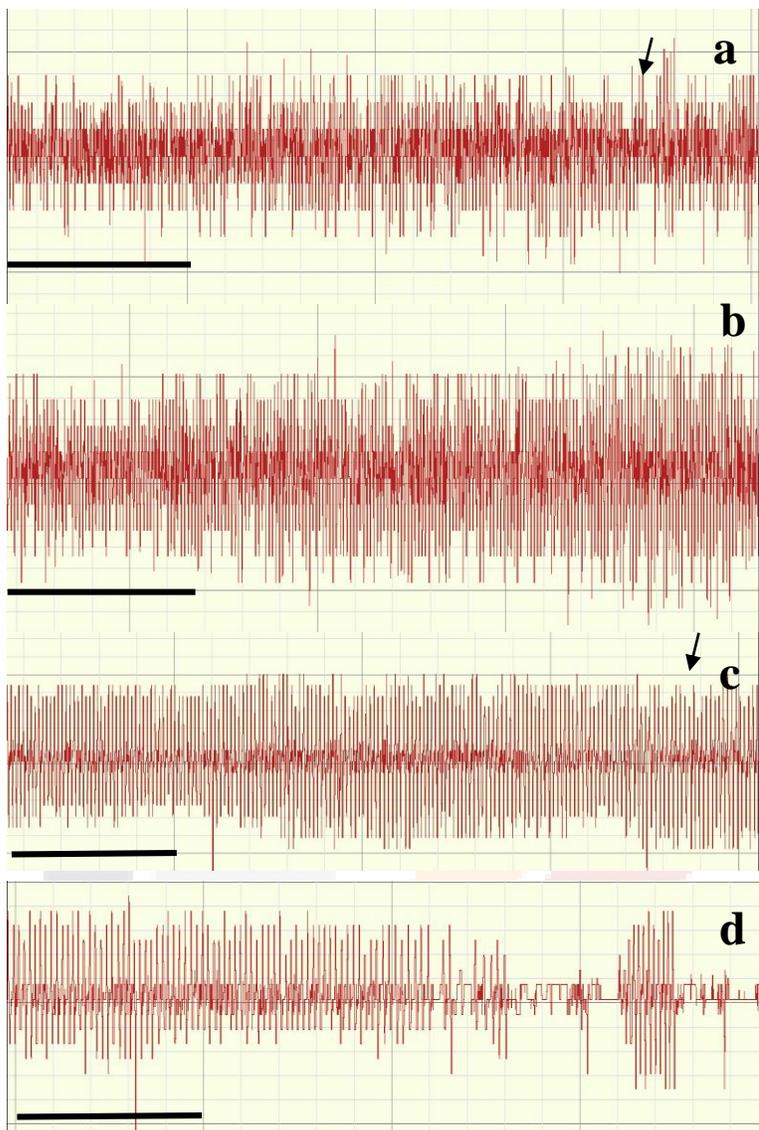


Figura 32. Trazos de las fracciones de los tubos 18 (**a** y **b**) y 17 (**c** y **d**) sobre el corazón de la preparación cardiaca semi-aislada de *G. portentosa* (**b** y **d**). El trazo con el periodo control (**a** y **c**) también muestra los primeros momentos posteriores a la adición de la dosis de las fracciones de los tubos 17 y 18 (flecha negra). Las líneas marcan el tiempo de 50 segundos.

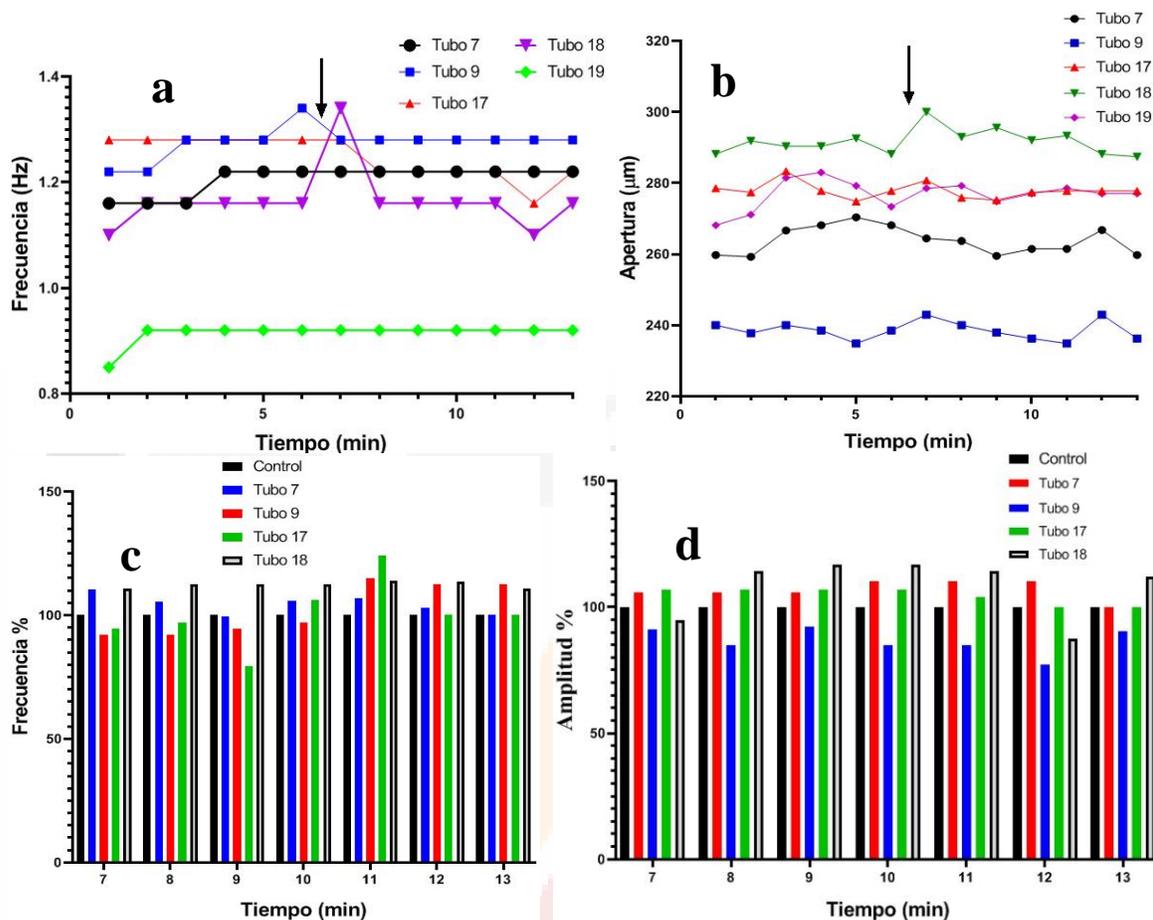


Figura 33. Gráficas de la adición de la mezcla de veneno con antiveneno: frecuencia cardíaca (mecánica) (a); apertura del corazón (b); frecuencia eléctrica cardíaca (c); y amplitud de onda diastólica (d).

5.4 EFECTOS DEL VENENO EN EL SISTEMA CARDIOVASCULAR DE LA RATA

Debido a que los efectos cardiovasculares del veneno crudo de *L. matans* sobre la rata fueron lentos, se optó por analizar los resultados manera diferente: el periodo de entre el tiempo control (sin inyectar nada) fue de 10 minutos y tiempo de prueba fueron 50 minutos, los cuales fueron divididos en 5 periodos, cada uno de 10 minutos.

Las dosis administradas a la rata fueron inyectadas intraperitonealmente. Estas dosis fueron de solución salina isotónica, como prueba control; y dosis de 0.16 mg/kg y 0.32 mg/kg de veneno crudo previamente liofilizado. No se observaron efectos significativos en el ritmo cardíaco y presión diastólica de la rata al inyectar la dosis con solución salina isotónica.

No se registraron efectos significativos en el ritmo cardiaco (BPM) a las dosis con veneno crudo en la concentración de 0.16 mg/kg (**Figura 34**). En tanto que, en la presión diastólica, se registró o una leve disminución significativa en los minutos 21 a 30; sin embargo, este efecto fue temporal, ya que regresó a los niveles estándares de presión diastólica (**Figura 35**).

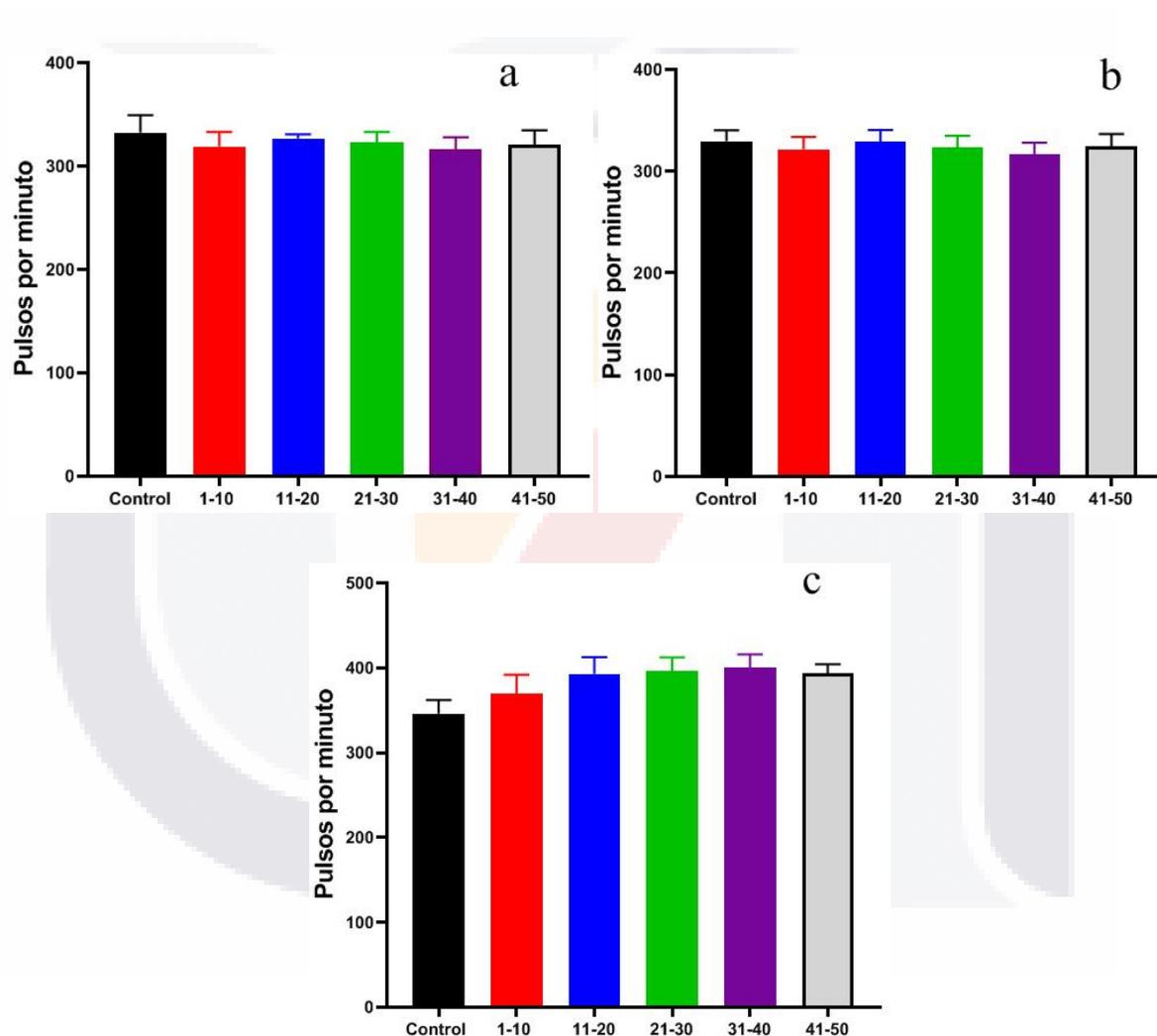


Figura 34. Efectos del veneno de *L. mactans* en el ritmo cardiaco de la rata. Cada gráfica representa los pulsos cardiacos por minuto en el eje y; y el periodo de prueba que consistió de 10 minutos de periodo control y 50 minutos de registro después de inyectar la solución salina isotónica (a), y el veneno crudo; estos se dividieron en 5 periodos, cada uno de los cuales consistió de 10 minutos (eje x). Las concentraciones de veneno crudo que se probaron fueron de 0.16 mg/kg (b) y 0.32 mg/kg (c).

En la concentración de 0.32 mg/kg de veneno crudo inyectado a la rata, se registraron efectos significativos en ritmo cardiaco y presión diastólica, que se observan como ligeros aumentos sostenidos tanto en el ritmo cardiaco, como en la presión diastólica (**Figura 34 y 35**).

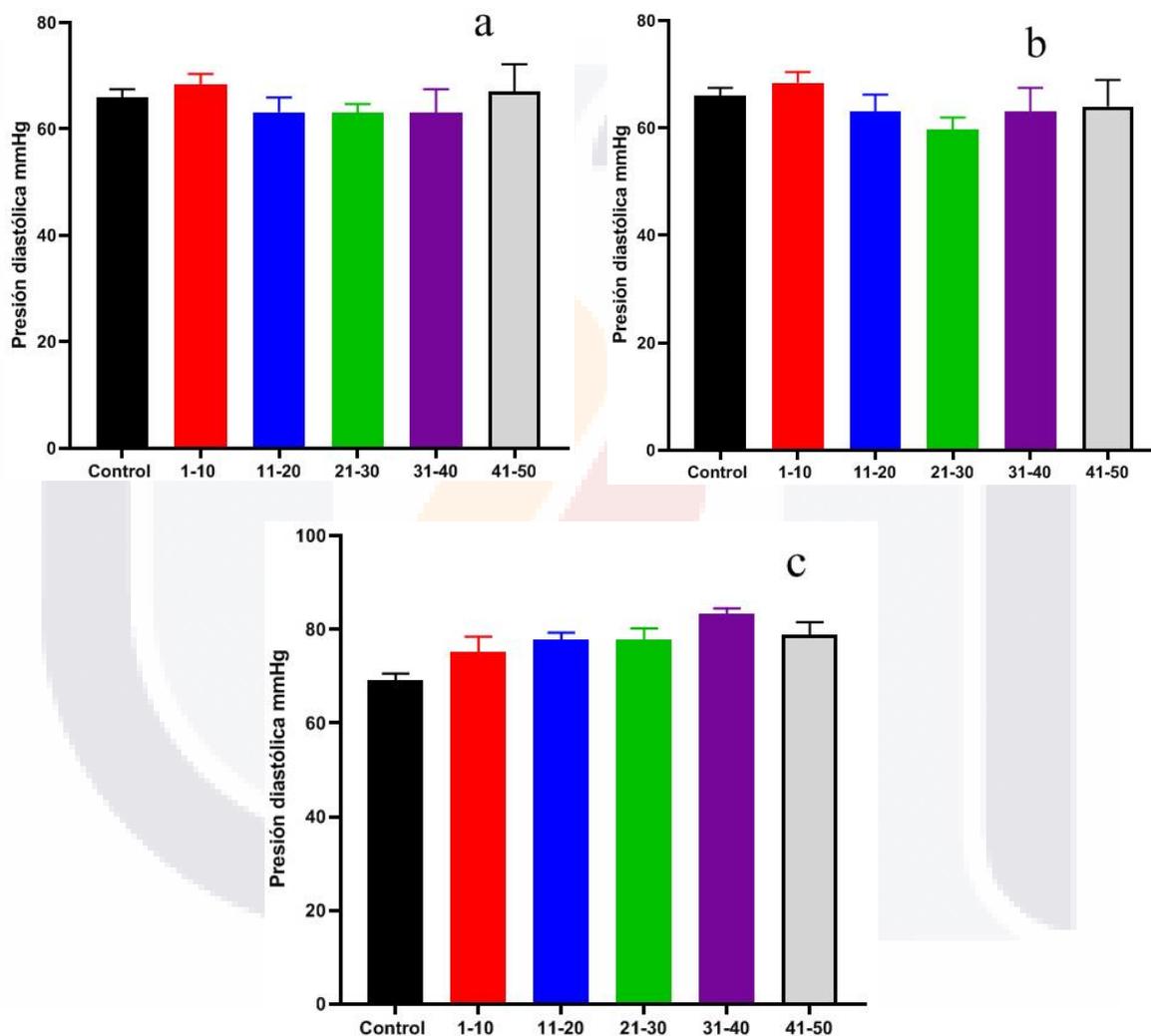


Figura 35. Efectos del veneno de *L. mactans* en la presión diastólica de la rata. Cada gráfica representa el registro de la presión diastólica en milímetros de mercurio (mmHg) en el eje y; y el periodo de prueba que consistió de 10 minutos de periodo control y 50 minutos de registro después de inyectar la solución salina isotónica (a), y el veneno crudo; estos se dividieron en 5 periodos, cada uno de los cuales consistió de 10 minutos (eje x). Las concentraciones de veneno crudo que se probaron fueron de 0.16 mg/kg (b) y 0.32 mg/kg (c).

VI. DISCUSIÓN

6.1 OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DEL VENENO DE *L. mactans*

Aunque el método más común de obtención del veneno de viuda negra es homogeneizando las glándulas de veneno previamente disecadas y luego se extraen las proteínas (Wang et al. 2007); sin embargo, nosotros preferimos el método por estimulación eléctrica sobre las glándulas del veneno de la araña, esto debido a que el método de extracción de las glándulas del veneno es susceptible de contaminarse con proteínas de tejidos extraños. Además, el método por estimulación eléctrica es más representativo del veneno puro y se puede esperar que sea más adecuado para la comprensión de las propiedades biológicas del veneno y del mecanismo de latrosectismo. También se ha reportado que α -latrotoxina aislado del veneno ordeñado era 10 veces más potente que la toxina extraída de las glándulas del veneno, probablemente debido al procesamiento del homogenizado de las glándulas del veneno (Wang et al. 2019).

Es importante demostrar que las muestras de veneno que se obtuvieron en la realización de del trabajo de tesis efectivamente eran de *L. mactans*. El análisis electroforético de las proteínas del veneno se apoya con lo reportado por otras investigaciones, tales como: Wang y colaboradores (2007) que reportan que en la especie de viuda negra *L. tredecimgutatus*, la extracción de veneno fue mediante estimulación eléctrica, se fraccionó por HPLC de fase reversa con su posterior análisis por gel de electroforesis. Ellos describen que el análisis del veneno de esta especie de araña viuda contiene proteínas con pesos moleculares superiores a 10 kDa, la mayoría de las cuales eran proteínas ácidas (pH~5.5-6.0) de masa molecular alta, con menos proteínas y péptidos por debajo de 10kDa. Las proteínas más abundantes en este veneno, estuvieron concentradas alrededor de los 100 kDa; Incluyendo las latrotoxinas, a los que se les atribuyen ser los principales componentes tóxicos del veneno de las especies de viuda negra. También mencionan que alrededor de los pesos moleculares que van de

aproximadamente 43,0 kDa y 100 kDa, había varias bandas de proteínas. Había menos bandas de proteínas por debajo de 14,4 kDa Esta descripción, aunque no se trate de la misma especie de viuda negra, es semejante a lo observado en las muestras de veneno y también con las muestras fraccionadas en la segunda visita al IBT.

Por otro lado, Rueda y colaboradores (2017) mencionan que el veneno de *L. mactans* muestra un patrón de bandas por encima de 70 kDa en el gel de electroforesis. La concentración de proteína en *L. mactans* en ese peso molecular da como resultado una banda pesada. La cual, también se observan tanto en nuestros datos, como en los Westernblot (**Figura 16 y 9**). Además, la aplicación del antiveneno Aracmyn Plus® en las pruebas de Westernblot, refuerzan nuestra confianza en que trabajamos con veneno de *L. mactans*.

En cuanto a las primeras muestras de veneno fraccionado de *L. mactans*, solo mostraron proteínas con pesos mayores a 15 kDa, pero menores a 20 kDa, Esta banda que se ubica en entre esos pesos, se puede observar frecuentemente en las muestras de veneno crudo de *L. mactans*. También, en el segundo conjunto de muestras de veneno fraccionadas, se observan proteínas que van con estos pesos en el pozo con la muestra 18 (**Figura 18**). Por otro lado, en trabajos, como de Roodt y colaboradores (2017), se observa una banda de proteínas en su Westernblot que coincide entre los pesos moleculares de 15 y 20 kDa, a los cuales ellos no hacen descripción. Además, se puede observar en el gel de electroforesis de Duan y colaboradores (2006), quienes trabajaron con las proteínas del veneno de *L. tredecimgutatus*, hay más de una banda de proteínas entre los pesos de 15 y 20 kDa. Ellos también mencionan que, aunque hay varios estudios que han descrito las propiedades biológicas y estructurales de varias proteínas venenosas como las latrotoxinas, no se dispone de un análisis exhaustivo del componente proteico del veneno de la araña.

6.2 ANÁLISIS TRIDIMENSIONAL DE LA FUNCIÓN CARDÍACA

Debido a que observamos que el movimiento mecánico del corazón es complejo, ya que implica cambios de diámetro y dirección del flujo de la hemolinfa. Nosotros planteamos la hipótesis de que este fenómeno podría explorarse mediante un análisis de tres dimensiones.

La sincronización de video con la grabación del transductor isotónico permitió un estudio efectivo de los eventos del ciclo cardíaco en un segmento del corazón. La grabación de video del vaso dorsal en dos dimensiones (eje x , y) ha sido el enfoque habitual para monitorear la apertura del corazón de los insectos (Dulcis 2005; Wasserthal 2007). La adición de la señal registrada por el transductor mecánico representa un enfoque novedoso con ventajas significativas para monitorear la función cardíaca, como a) el estudio del corazón en tres dimensiones (ejes x , y y z) que proporcionan cambios conformacionales detallados de los órganos cardíacos durante el ciclo cardíaco, b) un análisis preciso de la relación de la válvula intracardíaca con cada evento del ciclo cardíaco, y c) una metodología sencilla en tiempo real para estudiar los efectos de agentes exógenos o endógenos en el corazón. Por otro lado, la determinación visual de los límites de la sección cardíaca puede resultar difícil debido a la grasa corporal, el traqueolo y la transparencia de los tejidos del músculo cardíaco. Sin embargo, esta limitación se puede superar modificando el contraste de la imagen (Berh 2018).

6.3 UN MODELO CONVENIENTE: *Gromphadorhina portentosa*

Decidimos utilizar la cucaracha *G. portentosa* como modelo de corazón porque ofrece muchas ventajas sobre otros modelos de insectos. A diferencia de *P. americana*, *G. portentosa* es lenta y más fácil de criar y reproducir en cautiverio. Tiene una anatomía externa e interna bien definida y un sistema circulatorio más diferenciado que *D. melanogaster*, que actualmente es uno de los organismos más populares para la fisiología comparada del sistema cardiovascular y las enfermedades cardiovasculares humanas (Wasserthal LT 2007; Sláma 2010; Lehmacher y col. 2012). De hecho, los sistemas circulatorios de *G. portentosa* y *D. melanogaster* comparten muchas características, como 12 pares de músculos alares y un par de ostia entre cada par de músculos. Los ostios tienen una posición lateral en ambas especies y terminan por rendijas verticales que forman válvulas funcionales (Dailey y Graves 1976).

Basado en el movimiento de la válvula intracardíaca, los análisis de video sugieren que el flujo de hemolinfa en *G. portentosa* se inicia en la fase diastólica, que es más larga que la fase sistólica como se reporta en *P. americana* (Miller TA 1997).

Aunque la válvula intracardíaca de *G. portentosa* y *D. melanogaster* son comparables, existen algunas diferencias morfológicas y mecánicas que deben considerarse con fines experimentales. Por un lado, la válvula intracardíaca de *G. portentosa* se asemeja a dos hojas, es muy elástica y tiene una capacidad de rotación de 180 grados. Además, la válvula de *G. portentosa* oscila hacia adelante y hacia atrás siguiendo las pulsaciones del corazón (Dailey y Graves 1976). Por otro lado, las válvulas de *D. melanogaster* pueden ser más difíciles de visualizar ya que tienen forma redonda en el espacio luminal y se abren formando una forma de pera cuando el espacio luminal está cerrado (Rotstein y Paululat 2016). Además, el vaso dorsal semiaislado de *G. portentosa* tiene un tamaño más grande (de 3 a 4 pulgadas de largo) y parece ser muy estable en transcurros largos de tiempo. De hecho, la frecuencia cardíaca en todo el vaso dorsal no se altera cuando se quita la cabeza de la cucaracha. Por el contrario, el modelo de larvas de *D. melanogaster* es menos estable y pierde función con el tiempo (Malloy y col. 2016). Por lo tanto, *G. portentosa* es un modelo más robusto y confiable para estudiar la función cardíaca de los insectos en condiciones prolongadas y severas.

6.4 CARACTERIZACIÓN DE LAS RESPUESTAS COLINÉRGICAS EN *G. portentosa*

Los efectos de la ACh sobre el vaso dorsal aislado de *G. portentosa* concuerdan con los informes sobre otros insectos (Jones 1974). El aumento de la frecuencia cardíaca causado por ACh en preparaciones de *G. portetosa* también se ha documentado en *D. melanogaster* (Malloy y col. 2016 y *P. americana* (Miller y Metcalf 1968).

La baja concentración de ACh (1 mM) en *G. portentosa* no indujo ningún efecto importante. Sin embargo, la adición de una concentración más alta (5,5 mM) causó latidos cardíacos irregulares, períodos diastólicos más cortos y paro cardíaco como se reporta en *P. americana* (Collins y Miller 1977). Curiosamente, el diámetro del corazón aumentó durante la fase diastólica aumentó según lo registrado por el eje *x* (en apertura diastólica) y en el eje *z* (en amplitud de onda diastólica). Encontramos que no solo se ve afectada la contracción de la cavidad, sino también el movimiento de la válvula intracardíaca y posiblemente el transporte

neto de hemolinfa. Miller y Metcalf (1968) asumieron que la ACh tiene más bien un efecto miogénico que se propaga a través del cordón nervioso cardíaco lateral a todos los vasos dorsales a través de las uniones neuromusculares y las membranas del sarcolema de excitación-contracción del miocardio. Esta respuesta miogénica también podría estar presente en *G.portentosa*.

Los efectos de la nicotina sobre *G. portentosa* sólo se observaron en dosis más altas y consistieron en una frecuencia cardíaca disminuida que se correlaciona con la tonicidad disminuida de las secciones desnervadas del corazón de *P. americana* reportada por Miller y Metcalf (1968). Estos autores sugieren que los efectos de la nicotina son muy similares a las entradas neuronales impulsadas por la ACh

En general, los efectos de la muscarina no fueron significativos, la baja concentración de muscarina indujo una disminución sutil de los latidos del corazón, mientras que la frecuencia cardíaca se aceleró ligeramente con dosis altas. Estos hallazgos sugieren una presencia menor de receptores muscarínicos funcionales en los cardiomiocitos de *G. portentosa*. Estos receptores inducen un aumento significativo en la actividad del marcapasos, lo que lleva a un aumento de los latidos del corazón como se observa en *D. melanogaster* (Malloy y col. 2016). La apertura diastólica y la amplitud sin cambios tras la adición de muscarina a 5 mM sugieren la presencia de receptores muscarínicos de tipo B que tienen una sensibilidad constitutivamente baja a la muscarina y no están bloqueados por los antagonistas clásicos como la atropina (Collins y col. 2013).

Nuestros experimentos muestran que las respuestas a los compuestos colinérgicos en *G. portentosa* ocurren a dosis más altas en comparación con los drosófilos. Zornik y col. (1999) reportaron una disminución de la frecuencia cardíaca por ACh (1 mM – 1 M) en larvas, pupas y adultos de *D. melanogaster*, la nicotina aumentó la frecuencia cardíaca exclusivamente en adultos (10 mM – 100 nM) y disminuyó la frecuencia cardíaca en pupas y larvas (10 mM y 100 nM). La muscarina disminuyó la frecuencia cardíaca solo en pupas (1 mM). Sin embargo, estos estudios se realizaron mediante la inyección de agonistas colinérgicos en el flujo de hemolinfa de animales intactos, este procedimiento puede ser

particularmente estresante para un organismo relativamente pequeño y frágil como la mosca de la fruta (Malloy et al.2016).

Observamos respuestas bifásicas de ritmo cardíaco en el corazón de *G. portentosa*, particularmente después de la adición de ACh y muscarina. Estas respuestas parecían estar caracterizadas por una curva de campana dosis-respuesta, como la informada por Hillyer y col. (2014) en *Anopheles gambiae* sobre la influencia de péptidos cardioactivos. Las dosis bajas de estos péptidos aumentan las tasas de contracción cardíaca, mientras que las dosis altas disminuyen las tasas de contracción cardíaca y alteran la direccionalidad proporcional de las contracciones cardíacas. Se necesitan más pruebas para caracterizar en detalle una curva de campana dosis-respuesta de agonistas colinérgicos en *G. portentosa*.

La respuesta del corazón a los agonistas colinérgicos en *G. portentosa* parece afectar no solo a las válvulas sino también a los músculos alares circundantes y al tejido conectivo, como se muestra en las grabaciones de video. Estos músculos están innervados por terminaciones neurosecretoras que se distribuyen a lo largo del vaso de *G. portentosa* (Dailey y Graves 1976). Por lo tanto, es de suponer que los agonistas colinérgicos afectan el control neurogénico del corazón en *G. portentosa*.

Aunque las aminos biogénicas y los aminoácidos que afectan el ritmo cardíaco son naturalmente diferentes entre los vertebrados y los insectos, ambos grupos tienen un mecanismo de contracción miogénica para sus respectivas bombas circulatorias. Por lo tanto, la modulación del sistema nervioso del sistema cardiovascular de los insectos comparte algunas similitudes con su análogo vertebrado (Hillyer 2014). Por tanto, es válido considerar el sistema cardiovascular de *G. portentosa* como una herramienta potencial para las pruebas iniciales de los mecanismos de los fármacos y el tratamiento de enfermedades antes de realizar las pruebas en vertebrados.

En este manuscrito de tesis las pruebas que se hicieron para determinar el flujo de la hemolinfa y detalles sobre el funcionamiento de las válvulas intracardiacas de *G. portentosa*, no fueron incluidas. Los videos correspondientes a dichos resultados se pueden consultar en

la publicación generada de este trabajo de tesis (<https://doi.org/10.1007/s00359-020-01443-5>).

6.5 EFECTOS DEL VENENO EN RATA Y *G. portentosa*

Desde que Ornberg y colaboradores en 1976, se realizaron pruebas en ninfas de cucarachas, que han sugerido que α -latrotoxina o proteínas semejantes a esta, son activas en insectos. Esta toxina produce un aumento en la frecuencia del potencial de la placa en minuatara. Subsecuentes pruebas reportaron que α -latrotoxina, así como otros polipéptidos componentes del veneno de la viuda negra aumentaron la liberación de acetilcolina en los sinaptosomas de saltamontes (Umbach y col. 1998).

Se ha reportado que las latroinsectotoxinas (α -Latroinsectotoxina, β -Latroinsectotoxina, δ -Latroinsectotoxina, ε -Latroinsectotoxina) pueden causar liberación masiva de neurotransmisores del sistema nervioso y / o influir en la función de otros tejidos como los músculos de los insectos, sin toxicidad para vertebrados o crustáceos (Wang y col. 2019). También se han registrado los síntomas en cucarachas (*Periplaneta americana*), los cuales consistieron principalmente de parálisis flácida, letargo y ataxia (Wang et al. 2007). Sin embargo, los principales efectos observados del veneno crudo o las fracciones puras en preparaciones de tejido de insectos, se describen como dramáticos aumentos en la secreción de neurotransmisores (Rohou y col. 2007).

Otro efecto, el cual ha sido poco descrito, fue reportado con extracto de veneno crudo y veneno del lumen de las glándulas de viuda negra en la preparación de cardiaca semiaislada de la cucaracha *P. americana*. En este mismo trabajo se reporta que el veneno indujo latidos cardíacos irregulares y un eventual "bloqueo cardíaco" (Majori y col. 1972). Sin embargo, no concluyen el modo de acción, ni las fracciones responsables de dichos efectos.

Nuestros resultados nos han mostrado que el veneno crudo de *L. mactans*, es capaz de causar bifásica en la frecuencia cardiaca y aumentos en la apertura diastólica del corazón de *G. portentosa*. lo que contrasta con lo reportado por Majori y colaboradores (1972). Sin

embargo, las muestras fraccionadas, nos mostraron que existe una o más proteínas cuyas fracciones tienen pesos moleculares de entre 15 y 20 kDa, los cuales son capaces de causar efectos como los reportados por Majori y colaboradores (1972). Esto podría sugerir que hay componentes en el veneno de *L. mactans*, que pueden probablemente tener función de toxinas cardiotoxicas para los insectos; cuya función va de la mano con las neurotoxinas ya bien conocidas, y cuya finalidad no solo es paralizar a las presas, si no eliminar cualquier posibilidad de recuperación y con ello, matar a la presa.

En cuanto al aumento de la frecuencia cardíaca causado por el veneno crudo de *L. mactans* sobre la preparación cardíaca semi-aislada de *G. portentosa*, es un efecto que también fue observado en rata y probablemente se deba al efecto de las neurotoxinas que pueden causar la liberación de neurotransmisores como ACh y adrenalina, que por un lado en *G. portentosa* concuerda con los efectos de ACh en alta concentración en la preparación cardíaca semi-aislada (aumento de la frecuencia cardíaca, aumento de la apertura diastólica y aumento de la amplitud de onda diastólica) y en las ratas, el efecto mediado por transmisores adrenérgicos y colinérgicos (Romero y colaboradores 2003) que pueden causar el aumento de la frecuencia cardíaca y presión arterial. Romero y colaboradores (2000) reporta resultados que muestran que el veneno de *L. mactans* de Chile puede causar un efecto miotónico en el tejido muscular liso del conducto deferente y en el tejido cardíaco inducen inotropismo positivo y aumento de la frecuencia de contracción en ratas Sprague-Dawley machos. Ellos sugieren que el efecto principal se debe a la acción de una fracción proteica estructuralmente similar a la α -latrotoxina de arañas europeas y asiáticas. Sin embargo, es importante mencionar que si el veneno de *L. mactans* indujo disminución de la frecuencia cardíaca o la presión arterial diastólica en nuestros experimentos, no se tomaron en cuenta, debido a que también es un efecto que puede causar el pentobarbital sódico (Mohamed 2020).

Cabe mencionar que Majori y colaboradores (1972) también reportan que la aplicación de antisuero mezclado con el veneno de viuda negra bloquea los efectos en el corazón de la cucaracha. Sin embargo, el antiveneno no revierte los efectos del veneno una vez que el veneno fue previamente agregado a la preparación cardíaca. A diferencia Graudins y colaboradores (2012) quienes mencionan que el antiveneno del veneno de *L. mactans* y *L.*

hasselti puede revertir los efectos del veneno crudo. Las pruebas que se hicieron al aplicar la mezcla de veneno con antiveneno concuerdan con Majori y colaboradores (1972); sin embargo, hizo falta más pruebas para corroborar esto último.

VII. CONCLUSIÓN

La fracción del veneno de *L. mactans* cuyas proteínas que tiene un peso molecular de entre 15 a 20 kDa, probablemente son capaces de causar disminución y parálisis de la actividad contráctil (miogénica) del corazón de la cucaracha *G. portentosa*. Este efecto puede ir acompañado de un aumento en la apertura del vaso (diástole). Hasta que no se observa el cierre del vaso (o contracciones sistólicas), inhibiendo la actividad contráctil del músculo cardíaco. Probablemente se trate de una proteína con efectos tóxicos aún no descritos.

El análisis del funcionamiento del corazón de *G. portentosa*, así como el análisis de los efectos de los agonistas colinérgicos, fueron necesarios para entender como el veneno de *L. mactans* puede actuar sobre el corazón de *G. portentosa*. Creemos que la metodología que hemos desarrollado puede aplicarse en el estudio de otros venenos; sin embargo, sabemos que también deben emplearse otros enfoques para profundizar más en entender los efectos de los venenos y toxinas en el corazón de *G. portentosa*.

Nuestros resultados sobre agonistas colinérgicos sugieren que estos compuestos tienen un efecto dependiente de la concentración. Inducían respuestas bifásicas sobre la frecuencia cardíaca, el ciclo cardíaco y la función de la función de los músculos de las válvulas intracardíacas en *G. portentosa*. Esto representa un enfoque sólido y más detallado para explorar cambios dinámicos en la fisiología del sistema circulatorio en insectos.

El veneno crudo de *L. mactans* tuvo diversos efectos sobre la función cardíaca tanto de la rata, como de la cucaracha *G. portentosa*. Estos efectos se caracterizaron por aumentos en la frecuencia cardíaca; así como, un ligero aumento de la presión arterial en la rata. Mientras

que la respuesta cardíaca en *G. portentosa*, se caracterizó tanto por aumentos, como disminución y un aumento sostenido de la apertura diastólica.

Finalmente, aunque el veneno de la araña *L. mactans* fue capaz de causar aumentos en la frecuencia cardíaca de *G. portentosa*, al igual como se observó en nuestros resultados con la rata, también fue capaz de disminuir y paralizar la actividad contráctil. Esto podría indicar que el veneno de esta araña desempeña una función más compleja sobre las presas, que la que se ha descrito hasta ahora; como solo causante de parálisis a través del sistema nervioso y digestión.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Akasaka T, Klinedinst S, Ocorr K, Bustamante EL, Kim SK, Bodmer R (2006) The ATP-sensitive potassium (KATP) channel-encoded dSUR gene is required for *Drosophila* heart function and is regulated by tinman. Proceedings of the National Academy of Sciences 103:11999–12004. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603098103>
2. Alexandrowicz JS. (1926) The innervation of the heart of the cockroach (*Periplaneta orientalis*). The journal of comparative Neurology 41(1): 291-309
3. Berh D, Scherzinger A, Otto N, Jiang X, Klämbt C, Risse B (2018) Automatic non-invasive heartbeat quantification of *Drosophila* pupae. Comput Biol Med 93:189–199. <https://doi.org/10.1016/j.combiomed.2017.12.017>
4. Brown, C. Blood collection from the tail of a rat. LabAnimal 35, 24–25 (2006). <https://doi.org/10.1038/lab0906-24>
5. Bucio GV (2019) Diferencias entre rata y ratón. anatomía y fisiología descripción breve. Universidad de Guanajuato. Departamento de Veterinaria y Zootecnia 1-4.

6. Cabrera-Espinosa LA y Valdez-Mondragón A (2019) El género de arañas “viudas negras” *Latrodectus* (Araneae: Theridiidae) en México, ¿qué se conoce hasta ahora sobre su distribución? *Boletín de la Asociación Mexicana de Sistemática de Artrópodos (AMXSA)*. 3 (2): 15-21.

7. Claros GA (2020) Efectos tóxicos del fluido celómico de la lombriz de tierra *Eisenia fétida* en Coleoptera y Orthoptera. Tesis de maestría en ciencias. Universidad Autónoma de Aguascalientes. México.

8. Choma MA, Suter MJ, Vakoc BJ, Bouma BE, Tearney GJ (2011) Physiological homology between *Drosophila melanogaster* and vertebrate cardiovascular systems. *Dis Model Mech* 4:411–420. <https://doi.org/10.1242/dmm.005231>

9. Claros GA, Rodríguez MG, Heredia-Rivera B, González-Segovia R (2020) Three-dimensional analysis of the heart function and effect cholinergic agonists in the cockroach *Gromphadorhina portentosa*. *Journal of Comparative Physiology A Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*. 206 (6):857-870. doi: 10.1007/s00359-020-01443-5.

10. Collin C, Hauser F, Gonzalez de Valdivia E, Li S, Reisenberger J, Carlsen EMM, Khan Z, Hansen NØ, Puhm F, Søndergaard L, Niemiec J, Heninger M, Ren GR, Grimmelikhuijzen CJP (2013) Erratum to: Two types of muscarinic acetylcholine receptors in *Drosophila* and other arthropods. *Cell Mol Life Sci* 70:4197–4197. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1464-4>

11. Collins C, Miller T (1977) Studies on the action of biogenic amines on cockroach heart. *Journal of Experimental Biology* 67:1–15

12. Dailey PJ, Graves RC (1976) Gross internal anatomy of the Madagascar hissing cockroach *Gromphadorhina portentosa*. *Annals of Entomological Society of America* 69:609–616. <https://doi.org/10.1093/aesa/69.4.609>

13. de Roodt AR, Lanari LC, Laskowicz RD, Costa de Oliveira V, Irazu LE, González A, Giambelluca L, Nicolai N, Barragán JH, Ramallo L, López RA, Lopardo J, Jensen O, Larrieu E, Calabró A, Vurcharchuc MG, Lago NR, García SI, de Titto EH, Damín CF (2017) Toxicity of the venom of *Latrodectus* (Araneae: Theridiidae) spiders from different regions of Argentina and neutralization by therapeutic antivenoms. *Toxicon*. 130: 63-72. doi: 10.1016/j.toxicon.2017.02.029

14. Duan ZG, Yan XJ, He XZ, Zhou H, Chen P, Cao R, Xiong JX, Hu WJ, Wang XC, Liang SP (2006) Extraction and protein component analysis of venom from the dissected venom glands of *Latrodectus tredecimgutatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 145: 350–357 <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2006.08.006>

15. Dulcis D (2005) Glutamatergic innervation of the heart initiates retrograde contractions in adult *Drosophila melanogaster*. *Journal of Neuroscience* 25:271–280. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2906-04.2005>

16. Dulubova IE, Krasnoperov VG, Khvotchev MV, Pluzhnikov KA, Volkova TM, Grishin EV., Vais H, Bell DR, Usherwood PNR (1996) Cloning and Structure of d-Latroinsectotoxin, a Novel Insect-specific Member of the Latrotoxin Family. *Journal of Biological Chemistry*. 271(13): 7535-7543. doi: 10.1074/jbc.271.13.7535.

17. Geddes LA, Voelz M, Combs, C, Reiner, D, Babbs (1982) Characterization of the oscillometric method for measuring indirect blood pressure. *Annals of Biomedical Engineering* 10, 271–280. <https://doi.org/10.1007/BF02367308>.

18. Graudins A, Little M. J, Pineda S. S, Hains PG, King FG, Broady KW, Nicholson GM (2012) Cloning and activity of a novel α -latrotoxin from red-back spider venom. *Biochemical Pharmacology*. 1 (1). 170-183. doi: 10.1016/j.bcp.2011.09.024

19. Guerrero B., Finol H. J., Reyes L. M., Salazar A. M., Sánchez E. E., Estrella A., Roschman-G A., Ibarra C., Salvi I. y Rodríguez A. A. 2010. Activities against hemostatic proteins and adrenal gland ultrastructural changes caused by the brown widow spider *Latrodectus geometricus* (Araneae: Theridiidae) venom. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*. 151 (1). 113-1121. doi.org/10.1016/j.cbpc.2009.09.005

20. Hall JE (2012) Guyton y Hall. *Compendio de Fisiología médica*. Elsevier. 12ed. 101-105 Pp.

21. Hillyer JF, Estévez-Lao TY, de la Parte LE (2014) Myotropic effects of FMRFamide containing peptides on the heart of the mosquito *Anopheles gambiae*. *General and Comparative Endocrinology* 202: 15–25. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.03.048>

22. Jones JC (1974) Factors affecting heart rates in insects. In: Rockstein M (ed) *The physiology of insecta*, vol 5, 2nd edn. Acad Press, New York Krijgsman BJ, Krijgsman-

23. Krasnoperov VG, Bittner MA, Beavis R, Kuang Y, Salnikow KV, Chepurny OG, Little AR, Plotnikov AN, Wu D, Holz RW, Petrenko AG (1997) α -Latrotoxin

stimulates exocytosis by the interaction with a neuronal G-protein-coupled receptor. *Neuron*. 18(6): 925-37. doi: 10.1016/s0896-6273(00)80332-3

24. Krijgsman BJ, Krijgsman-Berger NE (1951) Physiological investigations into the heart function of arthropods: the heart of *Periplaneta americana*. *Bull Entomol Res* 42:143–155. <https://doi.org/10.1017/S0007485300025232>
25. Lang J, Ushkaryov YA, Grasso A, Wollheim CB (1998) Ca²⁺-independent insulin exocytosis induced by α -latrotoxin requires latrophilin, a G protein-coupled receptor. *The EMBO Journal*. 17 (3). 648-657. doi: 10.1093/emboj/17.3.648
26. Lee W-K, Socha JJ (2009) Direct visualization of hemolymph flow in the heart of a grasshopper (*Schistocerca americana*). *BMC Physiology* 9:2. <https://doi.org/10.1186/1472-6793-9-2>
27. Lehmacher C, Abeln B, Paululat A (2012) The ultrastructure of *Drosophila* heart cells. *Arthropod Struct Dev* 41:459–474. <https://doi.org/10.1016/j.asd.2012.02.002>
28. Llanderal CC, Cibrián TJ (1983). *Prácticas de Fisiología de insectos*. México: Colegio de posgraduados.
29. Ludwig D, Tefft ER, Suchyta SMD (1957) Effects of pH on the heart of the american cockroach, *Periplaneta americana* Linnaeus. *Journal of Cellular and Comparative Physiology* 49:503–508. <https://doi.org/10.1002/jcp.1030490308>
30. Magazanik LG., Fedorova IM, Kolvalevskaya GI, Pashkov VN, Bulgakov OV. Grishing EV (1992) Selective Presynaptic Insectotoxin (α -Latroinsectotoxin) isolated from black widow spider venom. *Neuroscience*. 46 (1). 181-188. doi: 10.1016/0306-4522(92)90017-v. PMID: 1594101.

31. Majori G, Bettini S, Casaglia O (1972) Effect of black widow spider venom on the cockroach heart. *Journal Insect Physiology* 18(5): 913-27. doi: 10.1016/0022-1910(72)90029-7.
32. Malloy CA, Ritter K, Robinson J, English C, Cooper RL (2016) Pharmacological identification of cholinergic receptor subtypes on *Drosophila melanogaster* larval heart. *Journal of Comparative Physiology B* 186:45–57. <https://doi.org/10.1007/s00360-015-0934-4>
33. Maynard R, Downes N (2019) *Anatomy and Histology of the Laboratory Rat in Toxicology and Biomedical Research*. 1ed. Pp79-82
34. McCowan C. y Garb J. E. 2014. Recruitment and diversification of an ecdysozoan family of neuropeptide hormones for black widow spider venom expression. *Gene*. 536 (2). 366-375.
35. McMahon HT, Rosenthal L, Meldolesi J, Nicholls DG. (1990) α -Latrotoxin Releases Both Vesicular and Cytoplasmic Glutamate from Isolated Nerve Terminals. *Journal of Neurochemistry*. 55 (6). 2039-2047. doi: 10.1111/j.1471-4159.1990.tb05793.x
36. Mejía SH, Mejía SM. (2012). Oximetría de pulso. *Revista de la Sociedad Boliviana de Pediatría*, 51(2)149-155. http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1024-06752012000200011&lng=es&tlng=es.
37. Miller T (1968a) Rôle of cardiac neurons in the cockroach heartbeat. *Journal of Insect of Physiology* 14:1265–1275. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(68\)90020-6](https://doi.org/10.1016/0022-1910(68)90020-6)

38. Miller T (1968b) Response of cockroach cardiac neurons to cholinergic compounds. *Journal of Insect Physiology* 14:1713–1717. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(68\)90203-5](https://doi.org/10.1016/0022-1910(68)90203-5)
39. Miller TA (1979) *Insect Neurophysiological Techniques*. New York, NY, USA
 Miller T (1968a) Rôle of cardiac neurons in the cockroach heartbeat. *Journal of Insect Physiology* 14:1265–1275. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(68\)90020-6](https://doi.org/10.1016/0022-1910(68)90020-6)
40. Miller T, Metcalf RL (1968) Site of action of pharmacologically active compounds on the heart of *Periplaneta americana* L. *Journal of Insect Physiology* 14:383–394. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(68\)90080-2](https://doi.org/10.1016/0022-1910(68)90080-2)
41. Miller TA (1997) Control of circulation in insects. *Gen Pharmacol Vasc Syst* 29:23–38. [https://doi.org/10.1016/S0306-3623\(96\)00522-8](https://doi.org/10.1016/S0306-3623(96)00522-8)
42. Miller T, Thomson WW (1968) Ultrastructure of cockroach cardiac innervation. *Journal of Insect Physiology* 14. 1099-1104 [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(68\)90048-6](https://doi.org/10.1016/0022-1910(68)90048-6)
43. Mohamed, A.S., Hosney, M., Bassiony, Hassanein SS, Soliman AM, Fahmy SR, Gaafar k. (2020) Sodium pentobarbital dosages for exsanguination affect biochemical, molecular and histological measurements in rats. *Scientific Reports*. 10(378). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-57252-7>.
44. Ornberg L, Smyth Jr T, Benton AW (1976) Isolation of a neurotoxin with a presynaptic action from the venom of the black widow spider (*Latrodectus mactans*, Fabr.) *Toxicon*. 14(4): 329-330. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(76\)90030-1](https://doi.org/10.1016/0041-0101(76)90030-1)

45. Ortuño LPE, Ortiz SNP, Ortega MRA (2009) Latrosectismo. Revista Científica
 Ciencia Médica. 12(1). 25-28.
 <http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1817-74332009000100009&lng=es&nrm=iso>
46. Parasuraman S, Raveendran R (2012) Measurement of invasive blood pressure in rats. J Pharmacol Pharmacother. 3(2):172-7. doi: 10.4103/0976-500X.95521. Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics: 22629093; PMID: PMC3356959.
47. Pass G, Agricola H, Birkenbeil H, Penzlin H (1988) Morphology of neurones associated with the antennal heart of *Periplaneta Americana* (Blattodea, Insecta). Cell Tissue Res. <https://doi.org/10.1007/BF00222288>
48. Peng X., Zhang Y., Liu J., Yu H., Chen J., Lei Q., Wang X. y Liang S (2014) Physiological and Biochemical Analysis to Reveal the Molecular Basis for BlackWidow Spiderling Toxicity. Journal of Biochemical and Molecular Toxicology. 28 (5). 198-205. doi: 10.1002/jbt.21553. Epub 2014 Mar 10. PMID: 24616210.
49. Ramsey M 3rd (1979) Noninvasive automatic determination of mean arterial pressure. Medical and Biological Engineering and Computing. 17(1):11-8. doi: 10.1007/BF02440948. PMID: 312369.
50. Resh V. H., Cardé R. T. (2003). *Encyclopedia of insects*. Academic Press. Estados unidos 192-194 Pp.
51. Risse B, Thomas S, Otto N, Löpmeier T, Valkov D, Jiang X, Klämbt C (2013) FIM, a novel FTIR-based imaging method for high throughput locomotion analysis. PLoS ONE 8:e53963. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053963>.

52. Rohou A, Nield J, Ushkaryov YA (2007) Insecticidal toxins from black widow spider venom. *Toxicon*. 49 (4-5). 531-549. doi: 10.1016/j.toxicon.2006.11.021.
53. Romero F, Altier E, Quiñehua C, Cayuqueo A (2000). ACTIVIDAD CONTRACTIL DEL MUSCULO PAPILAR CARDIACO Y CONDUCTO DEFERENTE DE RATA INDUCIDA POR VENENO DE LA ARAÑA LATRODECTUS MACTANS DE CHILE. *Gayana*. 64(2): 161-170. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-65382000000200006>
54. Romero MF, Altieri ME, Urrutia AM, Jara HJ (2003) Veneno de *Latrodectus mactans* de Chile (Araneae, Theridiidae): su efecto sobre músculo liso. *Revista de Biología. Tropical*. 51(2): 305-312. http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-77442003000200001&lng=en.
55. Rotstein B, Paululat A (2016) On the morphology of the *Drosophila* heart. *J Cardiovasc Dev Dis* 3:15. <https://doi.org/10.3390/jcdd3020015>.
56. Rocha-E-Silva TA, Sutti R, Hyslop S (2009) Milking partial characterization of venom from the Brazilian spider *Vitalius dubius* (Theraphosidae). *Toxicon*. 53(1):153-61. doi: 10.1016/j.toxicon.2008.10.026. Epub 2008 Nov 9. PMID: 19032960.
57. Rueda A, Realpe E, Uribe A (2017) Toxicity evaluation and initial characterization of the venom of a Colombian *Latrodectus* sp. *Toxicon*.125: 53-58. doi: 10.1016/j.toxicon.2016.11.255. Epub 2016 Nov 23. PMID: 27889602.
58. Silva J. P., Sucklin J. y Ushkaryov Y (2009) Penelope's web: α -Latrotoxin to untangle the mysteries of exocytosis. *Journal of Neurochemistry*. 111 (2): 275-290. doi: 10.1111 / j.1471-4159.2009.06329.x.

59. Silva JP, Ushkaryov YA (2010) The latrophilins, "split-personality" receptors. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 706: 59-75. doi:10.1007/978-1-4419-7913-1_5
60. Sláma K (2003) Mechanical aspects of heartbeat reversal in pupae of *Manduca sexta*. *Journal of Insect Physiology* 49:645–657. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(03\)00065-9](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(03)00065-9)
61. Sláma K (2010) Physiology of heartbeat reversal in adult *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae). *European Journal of Entomology* 107:13–31. <https://doi.org/10.1411/eje.2010.002>
62. Sláma K (2012) A new look at the comparative physiology of insect and human hearts. *J Insect Physiology* 58:1072–1081. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2012.04.014>
63. Südhof T. C. y Starke K (2008) *Pharmacology of Neurotransmitter Release*. Springer. 186, 190 Pp.
64. Tortora G. J., Grabowski S. R. (2003). *Principios de Anatomía y Fisiología*. Oxford. 643.
65. Umbach J. A., Grasso A., Zurcher S. D., Kornblum H. I., Mactrogiacomo A. Gundersen C. B. (1998) Electrical and optical monitoring of alpha-latrotoxin action at *Drosophila* neuromuscular junctions. *Neuroscience*. 87(4): 913-924. doi: 10.1016/s0306-4522(98)00664-2
66. Ushkaryov YA, Volynski KE. Ashton AC (2004) The multiple actions of black widow spider toxins and their selective use in neurosecretion studies. *Toxicon*.43 (5). 527-542. doi: 10.1016/j.toxicon.2004.02.008.

67. Vicari G, Bettini S, Collotti C, Frontali N (1965) Action of *Latrodectus mactans tredecimguttatus* venom and fractions on cells cultivated in vitro. *Toxicon*. 3(2):101-6. doi: 10.1016/0041-0101(65)90003-6.
68. Yan S, Wang X (2015) Recent Advances in Research on Widow Spider Venoms and Toxins. *Toxins*. 7. 5055–5067. doi: 10.3390/toxins7124862
69. Wasserthal LT (2007) *Drosophila* flies combine periodic heartbeat reversal with a circulation in the anterior body mediated by a newly discovered anterior pair of ostial valves and 'venous' channels. *Journal of Experimental Biology* 210:3707–3719. <https://doi.org/10.1242/jeb.007864>
70. Wang X.C., Duan Z.G., Yang J., Yan X.J., Zhou H., He X.Z. and Liang S.P. (2007) Physiological and biochemical analysis of *L. tredecimguttatus* venom collected by electrical stimulation. *J. Physiol. Biochem.* 63 (3): 221-230 <https://doi.org/10.1007/BF03165785>
71. Wang Y, Thatcher SE, Cassis LA (2017) Measuring Blood Pressure Using a Noninvasive Tail Cuff Method in Mice. In: Thatcher S. (eds) *The Renin-Angiotensin-Aldosterone System. Methods in Molecular Biology*. vol 1614. Humana Press, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7030-8_6
72. Wang X, Tang X, Xu D, Yu D (2019) Molecular basis and mechanism underlying the insecticidal activity of venoms and toxins from *Latrodectus* spiders. *Pest Management Science*.75(2):318-323. doi: 10.1002/ps.5206.
73. Wang, X.C., Duan, Z.G., Yang J, Zhou H, XZ, He XZ, Liang SP (2007) Physiological and biochemical analysis of *L. tredecimguttatus* venom collected by electrical stimulation. *Journal of Physiology Biochemistry*. 63, 221–230. <https://doi.org/10.1007/BF03165785>

74. William H, Heyborne, Maggie Fast, Daniel D, Goodding (2012) The Madagascar Hissing Cockroach: A New Model for Learning Insect Anatomy. *The American Biology Teacher* 74 (3): 185–189. doi: <https://doi.org/10.1525/abt.2012.74.3.11>
75. Zornik E, Paisley K, Nichols R (1999) Neural transmitters and a peptide modulate *Drosophila* heart rate. *Peptides* 20:45–51. [https://doi.org/10.1016/S0196-9781\(98\)](https://doi.org/10.1016/S0196-9781(98)).

