

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA

**CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DEL VENENO DE LA
TARÁNTULA *Cotztetlana* sp. Y EVALUACIÓN DE SU TOXICIDAD**

TESIS

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL
GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

PRESENTA

JUAN PABLO MARTÍNEZ FLORES

DIRIGIDA POR:

DR. ALEJANDRO GARCÍA ARREDONDO

CODIRIGIDA POR:

DR. JUAN JOEL MOSQUEDA GUALITO

QUERÉTARO, QRO. A 3 DE DICIEMBRE DE 2025

La presente obra está bajo la licencia:
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciatario no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:



Atribución — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciatario.



NoComercial — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).



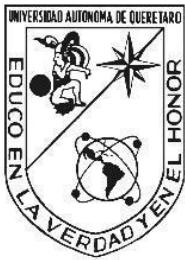
SinDerivadas — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA

MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DEL VENENO DE LA TARÁNTULA *Cotztetlana sp.*
Y EVALUACIÓN DE SU TOXICIDAD
TESIS

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

PRESENTA
JUAN PABLO MARTINEZ FLORES

DIRIGIDA POR:
DR. ALEJANDRO GARCÍA ARREDONDO

CODIRIGIDA POR:
DR. JUAN JOEL MOSQUEDA GUALITO

Dr. Alejandro García Arredondo
Presidente

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito
Secretario

Dr. Juan Manuel Murillo Maldonado
Vocal

Dra. Jesica Esther Escobar Cabrera
Suplente

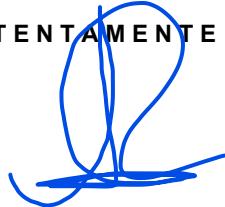
Dr. Mamadou Mosutapha Bah
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
Fecha de aprobación por el Consejo Universitario
(Diciembre de 2025)

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DEL ESTUDIANTE

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación titulada **“CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DEL VENENO DE LA TARÁNTULA *Cotztetlana* sp. Y EVALUACIÓN DE SU TOXICIDAD”** fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras. Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.

ATENTAMENTE



IBT JUAN PABLO MARTINEZ FLORES

ÍNDICE

Página

Contenido

Contenido	Página
RESUMEN.....	7
ABSTRACT	8
1 INTRODUCCIÓN.....	10
2. ANTECEDENTES	12
2.1 Importancia sobre la investigación de venenos.....	12
2.2 Avances farmacológicos desarrollados a partir del estudio de venenos	13
2.3 Composición de los venenos en arañas y sus glándulas especializadas	16
2.4 Evolución y diversidad de neurotoxinas peptídicas de arañas.	18
2.5 Principales dificultades en investigación de venenos.....	19
3. JUSTIFICACIÓN	21
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	22
5. HIPÓTESIS	22
6. OBJETIVOS.....	23
6.1 Objetivo General	23
6.2 Objetivos específicos	23
7. MATERIALES Y MÉTODOS	24
7.1 Recolecta de especies.....	24
7.2 Preparación de la muestra de veneno	24
7.2.1 Extracción de veneno	24
7.2.2 Liofilización y cuantificación de proteína.....	24
7.3 Electroforesis en gel SDS-PAGE.....	25
7.4 Espectrometría de masas (MALDI-TOF).....	25
7.5 Cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa (RP-HPLC).....	25
7.6 Actividad de hialuronidasa	26
7.7 Toxicidad.....	27
7.8 Análisis estadístico.....	27
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
8.1 Extracción de veneno y cuantificación de proteína.....	28
8.2 Electroforesis SDS-PAGE	28

8.3	Espectrometría de masas (MALDI-TOF)	30
8.4	Fraccionamiento por cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa (RP-HPLC).....	33
8.5	Actividad de hialuronidasa	38
8.6	Toxicidad.....	40
9.	CONCLUSIONES	41
10.	REFERENCIAS	1

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Línea del tiempo de los acontecimientos más relevante en estudios de venenos de organismos animales.	14
2	Curva estándar de cuantificación por método del BCA. Se usó un estándar de BSA.	28
3	Perfil electroforético del veneno de <i>Cotztetlana</i> sp. Gel SDS-PAGE 18% de acrilamida.	29
4	Perfil de masas del veneno de <i>Cotztetlana</i> sp. usando una matriz de CHCA.	31
5	Perfil de masas del veneno de <i>Cotztetlana</i> sp. usando una matriz de SA.	32
6	Acercamiento a los picos encontrados en el espectro.	32
7	Perfil cromatográfico del veneno de <i>Cotztetlana</i> sp. Se recuperaron en total 12 fracciones de la muestra total del veneno con base en los tiempos de retención y la alta intensidad de las señales.	35
8	Iones moleculares representativos de la fracción 1 del veneno de <i>Cotztetlana</i> sp.	36
9	Iones moleculares representativos de la fracción 6 del veneno de <i>Cotztetlana</i> sp.	36
10	Iones moleculares representativos de la fracción 7 del veneno de <i>Cotztetlana</i> sp.	37
11	Iones moleculares representativos de la fracción 9 del veneno de <i>Cotztetlana</i> sp.	37
12	Iones moleculares representativos de la muestra de la fracción 10 del veneno de <i>Cotztetlana</i> sp.	38
13	Actividad de hialuronidasa del veneno de <i>Cotztetlana</i> sp.	40
14	Curva logarítmica de la toxicidad sobre grillos <i>Acheta domesticus</i> a las 24 y 48 horas con dosis de 1, 10, 100 y 316 µg de proteína del veneno/g de peso corporal.	41

RESUMEN

Los venenos de animales son mezclas complejas de una cantidad enorme de moléculas con actividades farmacológicas útiles para el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos o herramientas biotecnológicas. Los estudios de veneno han sido favorecidos desde la aparición de técnicas de secuenciación masiva de RNA, así como técnicas por espectrometría de masas. Es por esto por lo que en los últimos años ha surgido un amplio interés en la investigación de estos organismos venenosos como las arañas y tarántulas, sin embargo, la cantidad de fármacos descubiertos en venenos de arañas no coincide con la gran variedad de especies en todo el mundo, siendo México el segundo país más diverso en especies de tarántulas. Es por eso que realizamos este estudio como un primer acercamiento para conocer las características bioquímicas principales acerca del veneno de la tarántula de patas gordas *Cotztetlana* sp., una especie endémica del estado de Querétaro y zonas aledañas. El veneno fue extraído de las tarántulas por medio de una técnica de electroestimulación para posteriormente ser fraccionado y analizado por electroforesis y espectrometría de masas. Además, se evaluó la actividad de hialuronidasa que presenta el veneno de esta especie. También, se realizó un análisis de toxicidad del veneno sobre grillos *Acheta domesticus*. Los resultados obtenidos sugieren que el veneno de la tarántula *Cotztetlana* sp. contiene hialuronidasas no tan potentes como otras reportadas en otros arácnidos. Su toxicidad mostró resultados donde se requiere de una gran dosis para provocar un daño severo. Este primer acercamiento nos demuestra la gran variedad de moléculas proteínicas presentes en su veneno, destacando la presencia de neurotoxinas o péptidos de bajo peso molecular y proteínas o enzimas como las hialuronidasas. Un análisis de secuenciación parcial sobre las fracciones obtenidas está en proceso de ser reportado.

Palabras clave: Toxinas, actividad farmacológica, glándula venenosa, hialuronidasa

ABSTRACT

Animal venoms are complex mixtures of a vast number of molecules with pharmacological activities useful for the discovery and development of new drugs or biotechnological tools. Venom studies have been facilitated by the advent of massive RNA sequencing techniques, as well as mass spectrometry techniques. This has led to a surge of interest in recent years in the research of venomous organisms such as spiders and tarantulas. Since the number of drugs discovered in spider venoms does not reflect the great diversity of species worldwide, Mexico being the second most diverse country in terms of tarantula species. Therefore, this study aims to provide an initial understanding of the main biochemical characteristics of the venom of the fat-legged tarantula (*Cotztetlana* sp.), an endemic species of the state of Querétaro and surrounding areas. The venom was extracted from tarantulas using an electrostimulation technique, then fractionated and analyzed by electrophoresis and mass spectrometry. Additionally, the hyaluronidase activity of this species' venom was evaluated, along with a toxicity study of the venom on house crickets (*Acheta domesticus*). The results obtained suggest that the venom of the tarantula *Cotztetlana* sp. contains hyaluronidases that are not as potent as those reported in other arachnids. Its toxicity shows that a large dose is required to cause severe damage. This initial study demonstrates the wide variety of protein molecules present in its venom, highlighting the presence of neurotoxins or low molecular weight peptides and proteins or enzymes such as hyaluronidases. A partial sequencing analysis of the obtained fractions is ongoing.

Keywords: Toxins, pharmacological activity, venom gland, hyaluronidase

Agradecimientos y dedicatorias

A mis padres que indudablemente me apoyaron en todo el transcurso de mi formación hasta motivarme para seguir con mis estudios y terminar esta maestría, sin ellos no hubiese podido llegar a donde estoy ahora. Gracias por estar ahí siempre con su amor y apoyo incondicional.

A mi hermano que siempre demostró confianza, apoyo y admiración motivándome a seguir adelante.

A mi novia Gracia Alejandra por estar siempre a mi lado ayudándome en experimentos, y principalmente estando cada que necesitaba esa motivación para seguir creciendo, y por depositar toda su confianza en mí y demostrarme que todo puede ser posible.

A mis compañeros de generación en la maestría, Dora, Luis, Karla Denisse, Karla Andrea por estar presente en cada clase apoyando con dudas y todo el recorrido que conllevo realizar esta maestría, sin duda forman parte de mi formación.

Al Dr. Alejandro García Arredondo quien fue la principal motivación para tener un gusto por los temas elegidos para mis proyectos, sus conocimientos me enseñaron la pasión que debo tener por la investigación

Al Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito por confiar en mí en cada idea o proyecto que le he propuesto por más que parezca una idea imposible me ha motivado para seguir adelante en cada situación, por escuchar todas mis dudas y ayudarme con sus consejos de vida.

Al biólogo y amigo Luis Cuellar que sin duda ha sido muy importante en todo este trayecto enfocado en mis investigaciones relacionadas a las arañas, ayudándome con su manejo y al compartir amplios conocimientos acerca de los arácnidos.

A la Dr. Moustapha Bah quien formo gran parte de mi aprendizaje durante el transcurso de la maestría y por brindarme todo su apoyo y sus asesorías en cada tutorial.

Al Dr. Juan Manuel Murillo que demostró su apoyo para poder llevar a cabo todos mis experimentos e ideas que planteábamos en nuestras charlas.

A la Dra. Jesica Esther Escobar ayudándome afinar los puntos críticos de mis metodologías que lleve a cabo en mi proyecto.

Finalmente, a todos aquellos que brindaron su apoyo, enseñanzas y palabras de aliento para poder seguir adelante y terminar esta etapa que he disfrutado.

1 INTRODUCCIÓN

Las arañas son organismos que evolucionaron a partir de un ancestro arácnido hace aproximadamente 450 millones de años, y se considera uno de los linajes animales más exitosos del planeta, dado que cuenta con más de 100.000 especies. Se sabe que un factor clave que refleja su éxito evolutivo es el uso de veneno para capturar presas y defenderse de los depredadores. Los venenos producidos por organismos han evolucionado a grandes mezclas complejas de compuestos bioactivos que a su vez pueden tener una gran importancia en el área farmacológica (Pineda y col., 2020).

El veneno de las arañas se conforma en cuatro grupos de distintas moléculas: Compuestos de pequeña masa molecular (SMMS), péptidos antimicrobianos (solo unas pocas familias de arañas), neurotoxinas peptídicas, proteínas y enzimas. En la actualidad, los venenos son reconocidos como una rica fuente de compuestos bioactivos con gran potencial para el desarrollo de productos farmacéuticos. Hay antecedentes acerca de un histórico de los venenos, ya que los humanos comenzaron a utilizarlos en su beneficio desde hace ya muchos años. Por ejemplo, los americanos nativos aplicaban veneno de serpiente de cascabel en las puntas de sus flechas para aumentar la efectividad en la caza; y en la Ayurveda, la medicina india histórica, el veneno de cobra se usaba para tratar la artritis (Langenegger y col., 2019).

A lo largo de los años, con diferentes investigaciones, se han reportado distintas moléculas con un gran potencial en el área farmacológica fungiendo como analgésicos, antidiabéticos tipo 2 (Coulter-Parkhill y col, 2023), anticonvulsivos y antiepilepticos, además de algunos tipos de péptidos antimicrobianos y toxinas con una gran utilidad en el área de los bioinsecticidas (Ahmed y col., 2023).

Los componentes del veneno de arañas más estudiados son los péptidos neurotóxicos, generalmente ricos en cisteína, ya que son de las moléculas más abundantes en el veneno y cada araña llega a tener diferentes tipos de toxinas de las cuales, se cree que la mayoría actúa sobre los canales y receptores de las células eléctricamente excitables. Estos péptidos ricos en cisteína llegan a tener

masas moleculares de 3 a 9 kDa y presentan ≥ 6 residuos de cisteína en motivos estructurales conservados.

Las técnicas ómicas han sido una base de gran importancia para el estudio de los venenos, conformando así a la “Venómica”, que es el campo de investigación en el que se estudian de manera integral todos los aspectos acerca de los venenos animales, desde el punto de vista evolutivo y ecológico, además de aportar al área de la investigación traslacional, incluyendo los antivenómicos. Esto refleja que el estudio basado en el análisis de venenos es de gran utilidad para obtener bases de datos profundas con información de modelos de estudio para fundamentar futuras investigaciones (von Reumont y col., 2022).

Según el catálogo mundial de arañas (WSC), México es uno de los países que alberga una gran cantidad de especies de tarántulas. Esto nos motiva a estudiar esta megadiversidad representativa de nuestras regiones naturales. El género de tarántulas mexicanas *Cotztetlana* comenzó a ser descrito en 2012 por J. I. Mendoza, siendo hasta 2020 que se describieron dos especies. En este estudio se caracterizó bioquímicamente el veneno de la tarántula *Cotztetlana* sp., además de evaluar sus efectos toxicos, los resultados obtenidos nos ayudarán a comprender de mejor manera la composición y funcionalidad de los venenos presentes en especies endémicas de México y establecer un acercamiento hacia su posible uso potencial como fuentes de compuestos novedosos con propiedades farmacológicas y/o biotecnológicas. Actualmente, existe una baja tasa de conocimiento relacionada al estudio de venenos de arañas, no concordando con la alta diversidad de especies en el mundo.

En este trabajo se analizaron la composición bioquímica y los efectos del veneno de la tarántula *Cotztetlana* sp., una especie endémica del estado de Querétaro y zonas aledañas. Para esto se utilizaron técnicas de separación mediante electroforesis y cromatografía de líquidos de alta resolución. Las fracciones obtenidas fueron analizadas mediante espectrometría de masas. Además, se evaluó la toxicidad del veneno en grillos y la actividad de hialuronidasa que este veneno presenta. Esta investigación basada en el análisis del veneno de la tarántula

Cotztetlana sp., fue un primer acercamiento para obtener información que ayudará a fundamentar futuras investigaciones enfocadas a las especies endémicas.

2. ANTECEDENTES

2.1 Importancia sobre la investigación de venenos

Actualmente, ha surgido un interés de la investigación translacional y aplicada por descubrir nuevos fármacos inspirados en compuestos naturales que ayuden a resolver las problemáticas en la salud humana que se viven hoy en día. Esto puede abordarse mediante el estudio de los venenos en animales, dado que contienen una mezcla muy compleja de componentes, pues durante mucho tiempo, la naturaleza ha sido considerada como una rica fuente de sustancias bioactivas. Esto ha sido obtenido como resultado de la evolución y la selección natural. Las toxinas de venenos pueden tener una amplia gama de actividades farmacológicas, ya que sus dianas se relacionan directamente con funciones biológicas, y muchas de ellas asociadas a enfermedades humanas (Bordon y col., 2020). Es por esto por lo que los venenos se han utilizado como medicinas desde hace miles de años. Algunos ejemplos de la medicina tradicional lo demuestran. Por ejemplo, en la India, sumergían las agujas en veneno de serpiente para tratar el dolor y la inflamación de las articulaciones. En China, se usan los venenos secos de la piel marrón y grumosa de los sapos como un tratamiento tradicional contra el cáncer. Por otro lado, en el sureste de México, se prepara una bebida hecha con un puré de tarántula, alcohol y hierbas; este remedio se usa de manera tradicional para aliviar el dolor de pecho y el asma (McDermott, 2020). En la actualidad, la caracterización funcional de las proteínas presentes en los venenos tiene importantes aplicaciones biomédicas, tal como en el desarrollo de fármacos o como sondas para receptores celulares (Garb, 2014).

Muchas especies animales que desarrollaron de manera independiente la capacidad de producir secreciones tóxicas pueden emplear su veneno mediante contacto directo o ingestión, o a través de heridas provocadas por aguijones, dientes, colmillos, arpones u otras herramientas específicas de cada animal.

(Langenegger y col., 2019). Los organismos venenosos ejercen papeles clave en las redes ecológicas de casi todos los hábitats naturales. El veneno es una adaptación exitosa para estos organismos, que ha evolucionado por muchísimos años. Su veneno es utilizado de manera predominantemente en interacciones interespecíficas, como puede ser la depredación (como en arañas, escorpiones, ciempiés, serpientes) y/o como defensa (tal como abejas, erizos de mar, y peces). Los venenos contienen docenas de toxinas distintas, de las cuales la mayoría actúan como neurotoxinas al dirigirse a canales iónicos y receptores en las membranas de las células excitables. Con el paso de los años, se ha identificado que los venenos de araña contienen una variedad de clases de toxinas peptídicas. Estas tienen como blanco a los canales iónicos dependientes de voltaje y son consideradas como una fuente potencial de nuevos compuestos con propiedades farmacológicas específicas. También se le ha atribuido un potencial como herramientas farmacológicas (Hu y col., 2019). Es por esta razón que el veneno de arañas atrae un gran interés debido a sus propiedades bioquímicas y estructurales, así como sus aplicaciones farmacológicas y el impacto fisiopatológico que causan en los seres humanos tras las picaduras. En la actualidad, las toxinas aisladas de venenos son utilizadas en distintos sectores translacionales, incluyendo terapias, herramientas de investigación, bioinsecticidas y marcadores clínicos en diagnóstico (von Reumont y col., 2022).

2.2 Avances farmacológicos desarrollados a partir del estudio de venenos

Con datos de 2020, se reportan hasta 11 moléculas comercializadas desarrolladas a base de toxinas aprobadas. Estas incluyen la ziconotida que se obtiene de caracoles cono, dos de lagartos (exenatida y lixisenatida), dos de sanguijuelas (bivalirudina y desirudina) y seis de serpientes (captopril, enalapril, tirofibán, eptifibatida, batroxobina y cobratida). La batroxobina y la cobratida son compuestos purificados directamente de venenos de serpiente; la desirudina es una molécula recombinante, y los demás fármacos (bivalirudina, captopril, enalapril, eptifibatida, exenatida, tirofibán y ziconotida) son moléculas sintéticas (Bordon y col., 2020).

En 1971, Ondetti y colaboradores hicieron el descubrimiento del péptido que dio origen al fármaco conocido como Captopril. Este fue obtenido a partir del veneno de la serpiente *Bothrops jararacá* (Ondetti y col., 1971). Fue en este momento donde se conoció a los venenos de animales como una rica fuente de compuestos bioactivos con un gran potencial para desarrollar nuevos fármacos (Figura 1.). Por otro lado, los venenos de invertebrados no han sido ajenos a estas investigaciones, en 1985, se hizo el descubrimiento del péptido ω -MVIIA, que fue aislado de *Conus magus*, para posteriormente desarrollarlo y conocerlo como Ziconotide (fármaco para el tratamiento del dolor en pacientes con cáncer) (Pereañez y col., 2009).

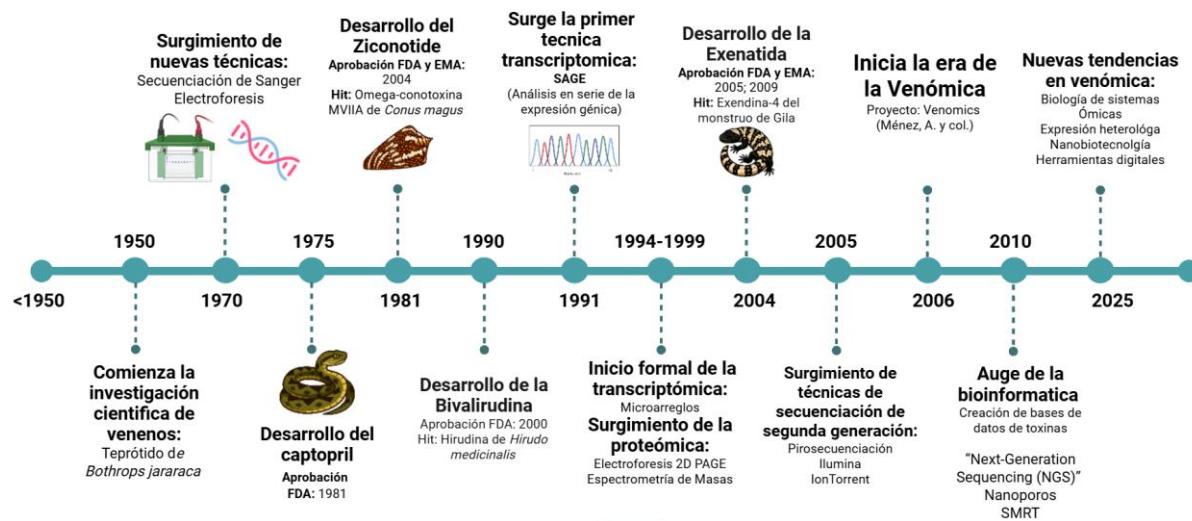


Figura 1. Línea del tiempo de los acontecimientos más relevantes en estudios de venenos de organismos animales.

Contemplando lo anterior, se logra observar la ausencia de la diversidad de toxinas provenientes de arácnidos en los fármacos aprobados, y esto tiene una justificación que será analizada más adelante. Hay una investigación en la década de los 80 donde se realizó el descubrimiento de un grupo de toxinas aisladas de los venenos de la avispa solitaria *Philanthus triangulum* y de las arañas *Nephila clavata* y *Argiope trifasciata*. Estas fueron clasificadas como acilpoliaminas o toxinas poliamínicas, que se demostró que tienen actividad bloqueadora de las sinapsis glutaminérgicas, debido a que bloquean de forma no competitiva los receptores catiónicos del glutamato, especialmente los del NMDA. Este grupo de toxinas promovió el desarrollo de fármacos anticonvulsivantes o antiepilepticos, que

inclusive pueden ayudar a tratar enfermedades como el Parkinson. Otro ejemplo son las ω -agatoxinas, que fueron aisladas del veneno de arañas del género *Agelenopsis*. Estas son polipéptidos ricos en cisteínas y puentes disulfuro; su peso molecular puede ser de entre 5 y 10 KDa y se clasifican de acuerdo con su selectividad, homología y mecanismo de acción. La ω -agatoxina ha sido útil en la explicación del papel de varios tipos de canales de calcio en la liberación de neurotransmisores. Además, es un potente bloqueador de los canales de calcio tipo P/Q en mamíferos, que son asociados con la contracción en los vasos renales de resistencia. Esta toxina demostró tener actividad anticonvulsivante en ensayos sobre ratones estimulados con un ruido intenso. También se han aislado toxinas importantes en venenos de tarántulas; tal es el caso de la tarántula suramericana *Psalmopoeus cambridgei*, de donde se logró identificar la toxina psalmotoxina 1, que es capaz de bloquear los canales de voltaje sensibles a H⁺. Ha sido reportado que este tipo de canales juegan un papel importante en distintas patologías, como la isquemia cerebral y epilepsia, además son responsables de la sensación de dolor mediada por la acidosis en los tejidos y de la inflamación. De esta manera, el mecanismo de acción de esta toxina favorece el desarrollo de fármacos analgésicos y anticonvulsivantes (Pereañez y col., 2009).

Un estudio reciente reportó la identificación de un nuevo péptido de 28 residuos de aminoácidos, el cual es llamado Δ -terafototoxina-Ac. Este péptido fue aislado del veneno de la tarántula rubia mexicana *Aphonopelma chalcodes*. Se determinó que el péptido aislado cuenta con un efecto insulinotrópico, dado que puede regular los canales iónicos de las células beta pancreáticas promoviendo la secreción de insulina (Coulter-Parkhill y col., 2023). Esto nos demuestra que el veneno de arañas es de gran importancia para descubrir nuevos péptidos bioactivos con un potencial terapéutico para diferentes enfermedades en humanos. Otro estudio reciente reportó el aislamiento de un grupo de péptidos con actividad insecticida, específicamente contra mosquitos; este fue aislado del veneno de la tarántula *Lasidora klugi*, una tarántula endémica de Brasil. El proyecto fue inspirado bajo la problemática de las enfermedades transmitidas por mosquitos como el dengue, la fiebre amarilla, el chikungunya y el zika. Estas enfermedades causan miles de

muertes alrededor del mundo. Tras esto, se ha presentado una resistencia a los insecticidas químicos por parte del mosquito *A. aegypti*, que es el transmisor principal de estas enfermedades. Si bien los insecticidas químicos también afectan a la salud humana, así como al medio ambiente, este tipo de compuestos como las toxinas sería una gran alternativa para controlar estos insectos transmisores de enfermedades (Ahmed y col., 2023).

2.3 Composición de los venenos en arañas y sus glándulas especializadas

Actualmente, la caracterización bioquímica de los venenos de arañas se ha concentrado en un pequeño número de especies que normalmente son asociadas con el envenenamiento humano, dejando de lado aquellas especies que no son de importancia médica. De esta manera, los estudios proteómicos y transcriptómicos recientes acerca de los venenos de araña indican que generalmente contienen muchas proteínas y péptidos únicos. Los avances en la secuenciación de cDNA de alto rendimiento y la identificación de péptidos por espectrometría de masas han ayudado enormemente al descubrimiento de estas proteínas venenosas (Garb, 2014). Se sabe que el veneno de arañas es eficaz contra grandes grupos de presas. Sin embargo, se cree que su efecto en humanos está sobreestimado a grandes rasgos. Esto se debe a que en el mundo ocurren más muertes ocasionadas por otros animales venenosos como escorpiones o serpientes. Esto resta importancia a el bajo número de muertes ocasionadas por picaduras de araña. Se tiene que tomar en cuenta que más del 85 % de especies de arañas tienen una longitud menor a 15 mm y producen una cantidad muy pequeña de veneno (10 µL por par de glándula venenosa). Otra razón es que la mayoría de los taxones de arañas no son agresivos y no suelen tener piezas bucales ni quelíceros lo suficientemente grandes para penetrar la piel humana (Langenegger y col., 2019).

Los migalomorfos pertenecientes al suborden de arañas, son tarántulas y depredadores terrestres que se sientan y esperan y someten a las presas que pasan (Sanggaard, y col., 2014). El veneno en arañas es producido en glándulas venenosas especializadas. Estas glándulas estuvieron presentes en el taxón de arañas más antiguo, los mesotelos (*Mesothelae*), que se desarrollaron hace unos

300 millones de años. Durante su evolución, las glándulas venenosas y su sistema para la administración de veneno también evolucionaron, siendo estas glándulas muy pequeñas y apenas funcionales hasta ser glándulas totalmente desarrolladas y ubicadas en el segmento queliceral basal de las arañas migalomorfas (“tarántulas”). Con la separación y evolución de las arañas araneomorfas (“arañas verdaderas”), las glándulas venenosas fueron trasladadas al prosoma, donde estas podían ocupar más espacio y ser de mayor tamaño. La reubicación de la glándula del veneno y una reorientación de los quelíceros permitieron una reducción del tamaño corporal en las arañas verdaderas, esto sin afectar sus funciones para ataque y defensa. Por esto se cree que la reducción del tamaño en sus cuerpos fue un requisito previo para el uso de redes funcionales, así como sus redes aéreas las cuales se han desarrollado en varios linajes. En la actualidad, más del 90 % de todas las arañas conocidas son araneomorfas y entre ellas, el 50 % construyen telas (Langenegger y col., 2019). Existen casos donde los machos de arañas suelen tener venenos más tóxicos; este es el caso de las arañas de tela en embudo australianas. La explicación para este dimorfismo sexual se debería a que los machos necesitan abandonar la seguridad de su madriguera para buscar una hembra con la que aparearse. De esta manera se exponen a los depredadores y requieren “toxinas defensivas” en lugar de toxinas depredadoras (Koua, D y col., 2020).

Las arañas producen el veneno en células secretoras especializadas que se encuentran en la glándula de veneno. Esta glándula está rodeada de capas musculares que se encargan de controlar la liberación del veneno, apretando la glándula del veneno. La liberación del veneno puede ser distinta en cada especie de araña. Se puede liberar por secreción holocrina mediante la desintegración de células enteras en la glándula o mediante secreción apocrina, formando vesículas unidas a membranas extracelulares que favorecen la liberación de los componentes del veneno. De manera general, el veneno de araña es una mezcla de más de cien componentes que actúan sobre distintos objetivos, incluyendo varios receptores, que están ubicados en el sistema muscular o nervioso, las membranas celulares y también en la matriz extracelular. Aunque cada componente de manera individual puede ser tóxico, es la acción sinérgica entre todos los componentes lo que

desencadena toda la toxicidad del veneno. Es importante tomar en cuenta la concentración de péptidos y proteínas en los venenos de araña, pues esta suele ser relativamente alta; se han reportado concentraciones de entre 65 µg/µL y 150 µg/µL. Como se mencionó anteriormente, el veneno está compuesto por cuatro grandes grupos: 1) Compuestos de pequeña masa molecular (SMMS), 2) Péptidos antimicrobianos (solo algunas familias de arañas), 3) Neurotoxinas peptídicas y 4) Proteínas y enzimas (Langenegger y col., 2019). Entre las enzimas que más destacan en los venenos de arañas suelen estar las hialuronidasas. Estas enzimas no presentan alguna toxicidad, pero se considera que desempeñan un papel muy importante, ya que su propósito es propagar el veneno en sus víctimas, pues son capaces de degradar los componentes de la matriz extracelular contribuyendo a los efectos locales y sistémicos ocasionados por el veneno y de esta manera favoreciendo la difusión de las toxinas. Otra aplicación de estas hialuronidasas se encuentra en el área dermatológica, siendo utilizada para degradar el relleno de ácido hialurónico y revertir el aumento cutáneo (De-Bona, E. y col., 2021).

Las hialuronidasas suelen llamar la atención al sector farmacológico y biotecnológico, ya que se ha demostrado que ciertas hialuronidasas pertenecen a la misma clase de hialuronidasas de los mamíferos y estas podrían tener cierta utilidad para facilitar la administración, dispersión y absorción de fármacos en humanos. Tal es el caso de una hialuronidasa humana recombinante llamada PH20 (rHuPH20; Halozyme Therapeutics, Inc.), un fármaco aprobado por la FDA que actúa degradando el ácido hialurónico, facilitando la vía de administración y optimizando la dosis de las terapias subcutáneas (Gremski, L. H.y col., 2021).

2.4 Evolución y diversidad de neurotoxinas peptídicas de arañas.

La información acerca de la gran diversidad de los componentes presentes en el veneno de muchos organismos como los arácnidos (escorpiones y arañas), era limitada debido a la falta de técnicas y enfoques bioquímicos para analizar pequeñas cantidades de venenos, dado que era realmente tardado realizar estas extracciones de veneno. Anteriormente los estudios consistían en caracterizar los componentes del veneno en extensos pasos cromatográficos para poder aislarlos y posteriormente evaluar su actividad biológica. Sin embargo, el gran avance

científico en el campo de las ómicas (genómica, transcriptómica y proteómica) permitió un alto rendimiento en la caracterización de la composición del veneno de muchas especies, lo cual facilita el descubrimiento de nuevos péptidos y proteínas con usos potenciales en la farmacología y otras áreas (Marchi y col., 2022).

Las toxinas presentes en el veneno cuentan con un mecanismo de acción sobre diversos órganos y sistemas, así como el sistema nervioso central o periférico, donde actúan sobre canales iónicos, funcionando como agonistas o antagonistas de receptores de neurotransmisores e inhibiendo los transportadores de estos. (Pereañez y col., 2009). Es por eso que se les denomina como péptidos neurotóxicos o péptidos similares a neurotoxinas. Los péptidos ricos en cisteína son los componentes del veneno con mayor interés científico; estos existen en la mayoría de los venenos de araña. Los péptidos ricos en cisteína pueden tener masas moleculares entre 3 y 9 kDa y llegan a presentar ≥ 6 residuos de cisteína. Además, estos péptidos ricos en cisteína pueden contar con distintos motivos estructurales. El nudo inhibidor de cistina (ICK) es el motivo que más destaca entre los péptidos ricos en cisteína. Este motivo proporciona una resistencia eficaz contra la descomposición enzimática circulante. Otros motivos estructurales se encuentran con menos frecuencia en los péptidos del veneno de araña. Estos pueden ser: A) Pliegue en horquilla β (DDH) dirigido por disulfuro, B) El motivo Kunitz, C) Pliegue tipo colipasa o pliegue tipo MIT1 y D) Motivo helicoidal derivado de neuropéptidos de artrópodos (HAND) (Langenegger y col., 2019).

2.5 Principales dificultades en investigación de venenos

Uno de los inconvenientes presentes en el desarrollo de investigaciones relacionadas con el estudio de venenos es que se requieren volúmenes realmente considerables, lo cual ralentiza la obtención de resultados precisos. Actualmente una de las prioridades es encontrar mejores herramientas que permitan a los investigadores trabajar con volúmenes pequeños de los venenos o mediante otras técnicas y esto pueda favorecer la aceleración del descubrimiento de nuevos fármacos (McDermott, 2020). Un estudio de 2022 propuso realizar análisis de venenos de arañas usando sus glándulas de veneno y someterlas a espectroscopía de Raman (Wang, 2022).

La investigación sobre venenos ha estado yendo al alza y el número de candidatos a fármacos en proceso está creciendo. Se sabe que unas 220.000 especies animales son venenosas, y de estas solo se han estudiado en profundidad unas cuantas. Sin embargo, el surgimiento de nuevas herramientas, como la transcriptómica, que pueden ayudar a revelar los cientos de péptidos que un organismo podría utilizar como toxinas. De esta manera se espera que en unas décadas haya un incremento de información relevante sobre venenos y animales venenosos (McDermott, 2020).

3. JUSTIFICACIÓN

Este proyecto de investigación reportará información sobre la composición del veneno de la tarántula queretana *Cotztetlana* sp., lo cual será el primer acercamiento hacia conocer los venenos de especies endémicas y poco estudiadas, buscando facilitar futuras investigaciones. Como se ha comentado, es importante aumentar la información acerca de las composiciones de venenos, dada la cantidad de componentes con gran potencial terapéutico que se encuentra presente en la naturaleza. De esta manera se podrá acelerar de manera objetiva el desarrollo de nuevas alternativas para enfermedades que suelen tener pocas vías de tratamiento. Dado que los venenos cuentan con una gran cantidad de componentes bioactivos, mediante el estudio y caracterizaciones de estas mezclas se puede realizar el descubrimiento de nuevas moléculas con posibles aplicaciones en distintas áreas como la farmacología. Si bien las arañas y tarántulas han dejado de ser un objetivo amplio de estudio debido a que se toma en cuenta con mayor prioridad aquellas especies animales que son de importancia médica como serpientes o escorpiones, no se puede dejar de lado estos organismos arácnidos que a través de los años han demostrado ser de utilidad para el desarrollo e innovación en el área farmacológica y biotecnológica. La tarántula del género *Cotztetlana* sp. es un organismo que en recientes años se ha descrito en algunas regiones de la república mexicana. Hasta ahora se han descrito sólo dos especies de este género. La especie queretana aún no está descrita, por lo que la información reportada tras este estudio puede favorecer la identificación de especies en el país, el cual cuenta con una gran diversidad de tarántulas.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es la composición bioquímica el veneno de la tarántula *Cotztetlana* sp.?

5. HIPÓTESIS

El veneno de la tarántula *Cotztetlana* sp. contiene una amplia diversidad de componentes, entre los que se encuentran toxinas peptídicas únicas, así como otros componentes de alto peso molecular.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo General

Caracterizar la composición bioquímica y los efectos tóxicos del veneno de la tarántula *Cotztetlana* sp.

6.2 Objetivos específicos

- Determinar la composición del veneno de la tarántula *Cotztetlana* sp. mediante electroforesis SDS-PAGE y espectrometría de masas.
- Fraccionar el veneno por medio de RP-HPLC y analizar las fracciones por espectrometría de masas
- Evaluar la actividad de hialuronidasa del veneno mediante un ensayo turbidimétrico
- Evaluar la toxicidad del veneno en grillos.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Recolecta de especies

Los especímenes de tarántulas *Cotztetlana* sp. fueron concedidos y resguardados por el aracnario de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro. Las tarántulas fueron resguardadas en pequeños terrarios por separado y monitoreadas cada día y se alimentaron dos veces por semana con grillos (*Acheta domesticus*).

7.2 Preparación de la muestra de veneno

7.2.1 Extracción de veneno

El veneno se obtuvo realizando una estimulación eléctrica en los quelíceros de las tarántulas, esto basado en un método descrito previamente (Rocha-e-Silva y col., 2009). Las arañas fueron anestesiadas ligeramente colocándolas en un frasco cerrado junto con un paño empapado con 0.5 mL de isoflurano, se esperó de 5-10 minutos hasta que las tarántulas quedaron totalmente anestesiadas, para posteriormente sujetarlas del cefalotorax. Los colmillos fueron levantados y se colocaron en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml, cuidando que no haya ninguna contaminación con fluidos digestivos y saliva. En este momento, se aplicó la electroestimulación sobre los colmillos con un par de electrodos modificados usando un electro-fuente de alimentación de foresis (PowePac Basic, Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU. Cat #164-5050) a 15 V durante 2 s con un intervalo de 3 s entre descargas durante 1 min y este procedimiento se realizó 3 veces con cada tarántula. Despues de la extracción, el veneno debe ser centrifugado y almacenado a -80 °C hasta su uso. Se realizó la extracción del veneno de manera mensual para dar suficiente tiempo a las tarántulas para reponer su suministro de veneno.

7.2.2 Liofilización y cuantificación de proteína

El veneno recolectado fue resuspendido en agua y se realizó una cuantificación de proteína por el método del ácido bicinconínico (BCA). Para

realizarla se tomaron 4 μ l del veneno resuspendido y al obtener la concentración final de proteína, esta fue separada en 14 viales con 1 mg de proteína del veneno de la tarántula *Cotztetlana* sp. Estos viales fueron liofilizados y resguardados a -80 °C para su posterior uso en los siguientes análisis

7.3 Electroforesis en gel SDS-PAGE

Se obtuvo el perfil electroforético del veneno mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (Glycine-SDS-PAGE), como lo describieron previamente Schagger y Von-Jagow (1987). Usando geles al 18% de acrilamida, se colocaron 40 μ g de proteína por cada pocillo y cada muestra de proteína fue diluida en tampón de muestra 1:1, en condiciones nativas. Los geles se sometieron a electroforesis a 90 V durante 2 h a 4° C usando un tampón de funcionamiento Tris-Glicina-SDS. Las bandas de proteínas se visualizaron utilizando una solución de tinción premezclada Bio-Safe Coomassie. Los perfiles de proteínas se registraron como imágenes digitalizadas bajo luz blanca utilizando un sistema ChemiDoc MP.

7.4 Espectrometría de masas (MALDI-TOF)

Se usaron muestras liofilizada del veneno (VCsp) de 60 μ g de proteína. Se aplicó un análisis de 0-100 kDa usando dos matrices Ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (CHCA) y ácido sinapico (SA). Las muestras se resuspendieron en agua ultrapura (mQH₂O). Se utilizó una placa de ionización por desorción láser asistida por matriz (MALDI) y se secó a temperatura ambiente. Este análisis se realizó en un espectrómetro de masas MALDI-time of flight (TOF) (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania) equipado con un láser de nitrógeno con $\lambda = 377$ nm y un voltaje de aceleración de 20 kV.

7.5 Cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa (RP-HPLC)

Alícuotas del veneno fueron sometidas a un proceso de separación por RP-HPLC. Se estandarizó el método de separación haciendo inyecciones de 50

a 100 µL (200 a 400 µg de proteína), con el fin de obtener la mejor separación posible. Se hicieron un total de 12 inyecciones para un total de 1400 µg de proteína. Las muestras fueron disueltas en agua grado HPLC (J.T. Baker) 0.1 % TFA. El fraccionamiento cromatográfico del veneno se llevó a cabo utilizando una columna de fase reversa C18 (Waters® 250 mm x 4.6 mm, 5 µm; Symmetry, CA, USA). La composición de la fase móvil fue: fase A (Agua con 0.1 % ácido trifluoroacético) y fase B (Acetonitrilo 100 %), utilizando una pendiente proporcional a 1 % de solución B/min (60 min). La composición de la fase móvil fue isocrática durante los primeros 5 minutos (Fase A), y posteriormente se empleó un gradiente que alcanzó el 60% de la fase B en los siguientes 60 minutos con un flujo fijo de 1 mL/min. Las fracciones eluídas fueron monitoreadas a una longitud de onda de 220 nm y recolectadas en tubos de polipropileno de 50 mL.

Obtuvimos 13 fracciones de las cuales cinco fueron analizadas por espectrometría de masas MALDI-TOF por la metodología descrita en el punto anterior, De este análisis, se pudo determinar la composición y las masas moleculares de los componentes que fueron separados en cada fracción.

7.6 Actividad de hialuronidasa

Se utilizó un método turbidimétrico (DI FERRANTE N., 1956) para determinar la actividad de hialuronidasa del veneno de *Cotztetlana* sp. empleando diferentes concentraciones de proteína del veneno (0, 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20, 25, 50 y 65 µg de proteína/ml), diluidas en 150 µl de tampón de acetatos (acetato de sodio 0.2 M, pH 6.0, con NaCl 0.15 M), con 100 µl de sustrato (1 mg de sal sódica de ácido hialurónico de *Streptococcus equi* en 1 mL de tampón de acetato) y las muestras se incubaron a 37 °C durante 15 min. Posteriormente, se añadió a cada muestra 1 mL de hexadeciltrimetilamonio (2,5 %) en NaOH al 2 % para parar la reacción enzimática. Las muestras se dejaron reposar por 30 minutos a temperatura ambiente para posteriormente leer la turbidez resultante a 400 nm en un espectrofotómetro de microplacas (Benchmark Plus, Bio-Rad, EE. UU.). Los resultados obtenidos se expresaron tomando el control (muestra sin veneno) como el máximo de

turbidez (0% de actividad) y el blanco (muestra sin ácido hialurónico) como el 100 % de actividad.

Por último, se realizó un ensayo bajo las mismas condiciones, pero usando como sustrato los polisacáridos Sulfato de condroitina A y Sulfato de condroitina B, con el fin de comprobar la especificidad de las hialuronidasas presentes en el veneno.

7.7 Toxicidad

La toxicidad del veneno se evaluó determinando la dosis letal media (DL_{50}) en grillos *Acheta domesticus* de sexo indeterminado con un peso de 290-330 mg. Se aplicó el veneno mediante inyección torácica en los grillos ($n = 5$, para cada dosis de veneno) en las dosis de 1, 10, 100 y 316 μg proteína/g de peso corporal. El veneno fue disuelto en solución salina, se tomó un volumen de inyección de 20 μL . Las inyecciones se realizaron con una jeringa de insulina de 0,3 ml (B-D Ultra-Fine, Terumo Medical Corporation, EE. UU.). Posteriormente, los grillos fueron colocados en recipientes de plástico con alimento y agua. Se determinó la letalidad a las 24 y 48 horas posteriores a la inyección. Los valores de DL_{50} se interpolaron ajustando curvas de dosis-respuesta logarítmicas mediante análisis de regresión no lineal en Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc., EE. UU.) y se expresaron como la media \pm EEM de tres réplicas.

7.8 Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron por triplicado, reportando los resultados como la media \pm el error estándar. Todos los análisis fueron realizados empleando el software GraphPad Prism. La concentración de proteína se estimó mediante un ajuste lineal, mientras que el valor de la dosis letal media (DL_{50}) se estimó mediante un ajuste no lineal de la curva semilogarítmica.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Extracción de veneno y cuantificación de proteína

De un total de 5 extracciones de veneno, se determinó que el veneno total, disuelto en agua grado HPLC, tenía una concentración de proteína de 22.75 mg/mL, dando un total de proteína de 18.5 mg. El veneno se separó en viales que contendrían 1 mg de proteína. La concentración de proteínas totales se obtuvo a partir de una curva de calibración con estándar de albúmina sérica bovina (BSA) (Figura 2.).

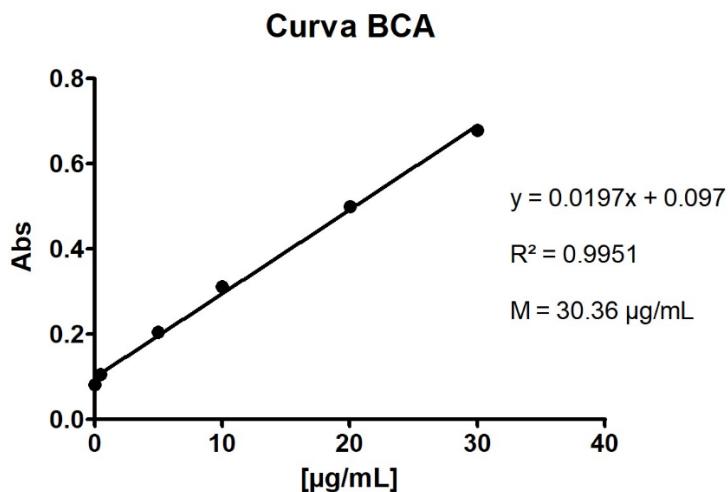


Figura 2. Curva estándar de cuantificación por método del BCA. Se usó un estándar de BSA.

8.2 Electroforesis SDS-PAGE

El perfil electroforético del veneno extraído de *Cotztetlana sp.* se puede observar en la Figura 3, en donde se cargaron 40 μg de proteína del veneno en condiciones nativas y reductoras. Los perfiles muestran la presencia de proteínas de alto peso molecular, con pesos relativos de 202–114 kDa, 83.4 y 46 y 34 kDa. En este último rango, se encuentra una banda prominente con un peso molecular cercano a 40 kDa, que corresponde a enzimas con actividad de hialuronidasa. Estas enzimas son un componente común en los venenos de tarántula y se les ha atribuido la función como agente

propagante, que ayuda en la distribución de las toxinas del veneno al degradar el ácido hialurónico de la matriz extracelular (Rodríguez-Rios y col., 2017).

Por otro lado, el perfil de electroforesis del veneno también muestra la presencia de abundantes péptidos de bajo peso molecular, con pesos moleculares relativos inferiores a 10 kDa. La abundancia de este tipo de componentes no permite la observación de bandas definidas, por lo que se observa un barrido de bandas de diferentes pesos moleculares. De acuerdo con la literatura, la presencia de estas bandas corresponde a péptidos neurotóxicos clásicos en los venenos de arañas (Guo y col., 2023).

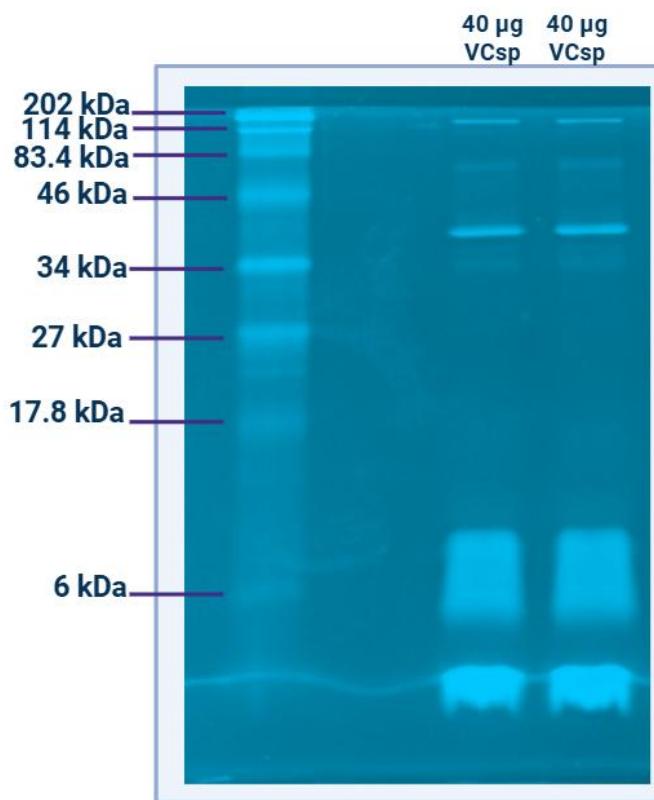


Figura 3. Perfil electroforético del veneno de *Cotztetlana* sp. en gel SDS-PAGE al 18% de acrilamida. El carril 1 muestra un control de pesos moleculares de amplio espectro, el carril 2 y 3 son un duplicado de la muestra de veneno con 40 µg de proteína en condiciones nativas.

En este estudio, se realizó un gel SDS-PAGE de Tris-Glicina al 18% de acrilamida para lograr observar la totalidad de rangos de pesos moleculares presentes en el veneno. En un estudio de 2022 realizado por Fernandes y colaboradores, se realizó un análisis exhaustivo sobre el perfil venómico de tres arañas del género *Phoneutria*, un género que llama la atención por ser una araña con veneno de importancia médica para los humanos. Resulta interesante observar la separación de los componentes proteicos en un gel de electroforesis (Tricina-SDS-PAGE) y en este se logra apreciar una separación adecuada de muchos de sus componentes, recalmando que la mayoría de estos son péptidos neurotóxicos con un peso molecular menor a 6kDa. Considerando esto, para lograr observar una mayor definición de las bandas de bajo peso molecular podría realizarse un análisis electroforético bajo estas condiciones.

Por otro lado, un estudio de 2017 realizado por Santana y colaboradores analizó el veneno de la tarántula australiana *Phlogius crassipes*, reportando datos acerca de la composición del veneno de tarántulas en diferente etapa de crecimiento y recolectadas en diferentes zonas. En el estudio obtuvieron que las tarántulas de menor tamaño contaban con un veneno más complejo en comparación a las más grandes. Sin embargo, en sus perfiles electroforéticos se logra observar que las cuatro muestras que tomaron siguen un patrón muy similar al que se presenta en esta investigación del veneno de la tarántula *Cotztetlana* sp., dado que coinciden las bandas de alto peso molecular ubicadas entre 202 y 114 kDa, las bandas entre 46 y 34 kDa y finalmente aquel barrido de bandas que se ubica en la parte inferior del gel (Aprox. <10 kDa).

8.3 Espectrometría de masas (MALDI-TOF)

Con la finalidad de obtener más información acerca de los péptidos de bajo peso molecular del veneno, se analizó el perfil por espectrometría de masas MALDI-TOF, mismo que arrojó resultados complementarios al perfil electroforético, donde se confirma la abundante presencia de péptidos de

bajo peso molecular (Figura 4). Dicha matriz permite una mayor identificación de proteínas pequeñas. En este espectro, se observan bandas con alta intensidad, las cuales tendrían una relación masa/carga (m/z) menor a 5000. Esto corrobora que los péptidos presentes en el veneno de *Cotztetlana* sp. tendrían un peso molecular de 5 kDa o menor. Por otro lado, se realizó otro análisis de masas usando como matriz una solución de ácido sinapínico (SA), la cual facilita la identificación de proteínas con mayor peso molecular (Figura 5), se observa una gran presencia de proteínas con un rango de m/z de 40,000 a 120,000. Es notable la presencia de picos con alta intensidad como el que se encuentra a $43,909.597\text{ m/z}$, siendo equivalente a la banda encontrada en el gel de electroforesis, donde una banda intensa ubicada entre 46 – 34 kDa se le catalogó como posible enzima con actividad de hialuronidasa, es importante mencionar que cada veneno puede contener varias isoformas de hialuronidas, por lo que esa banda del gel de electroforesis podría ser un acumulado de varias proteínas con pesos moleculares similares (Rodríguez-Rios y col., 2017).

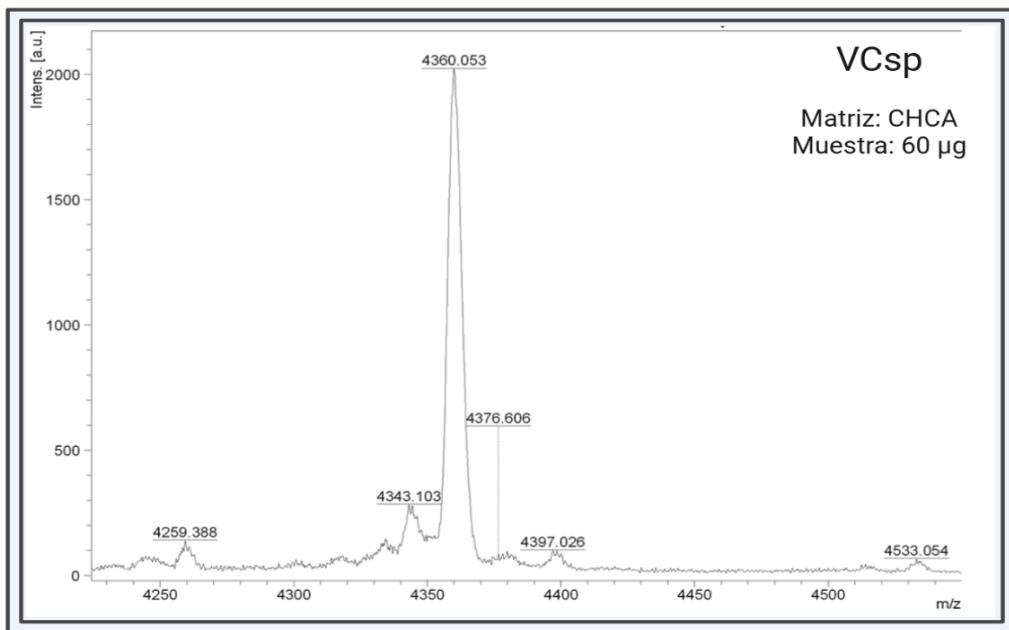


Figura 4. Perfil de masas del veneno de *Cotztetlana* sp. usando una matriz de CHCA. En su mayoría se logra observar una cantidad considerable de moléculas con m/z de 4,000 – 5,000.

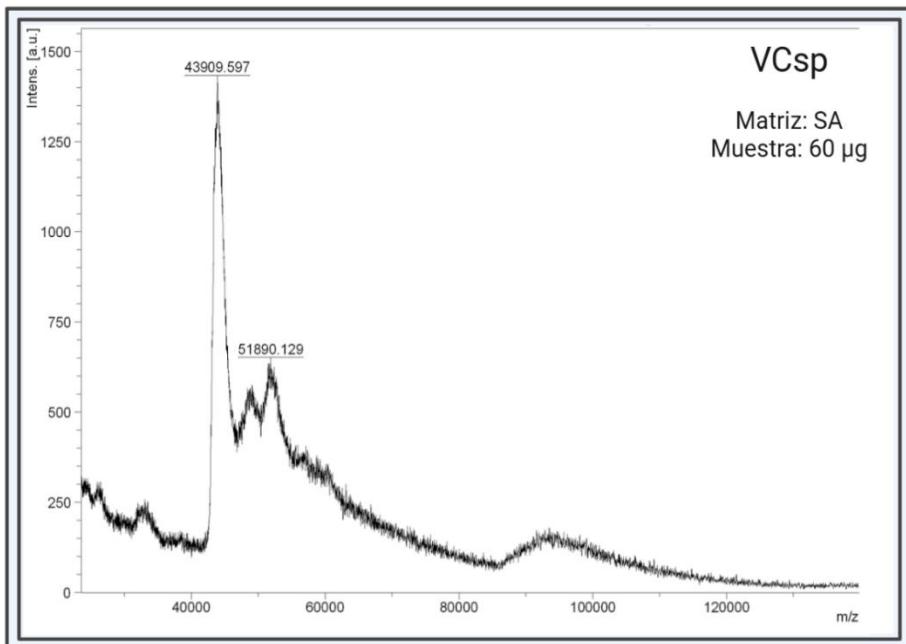


Figura 5. Perfil de masas del veneno de *Cotztetlana* sp., usando una matriz de SA. Se observan picos con alta intensidad, asociándolos con aquellas enzimas características presentes en los venenos.

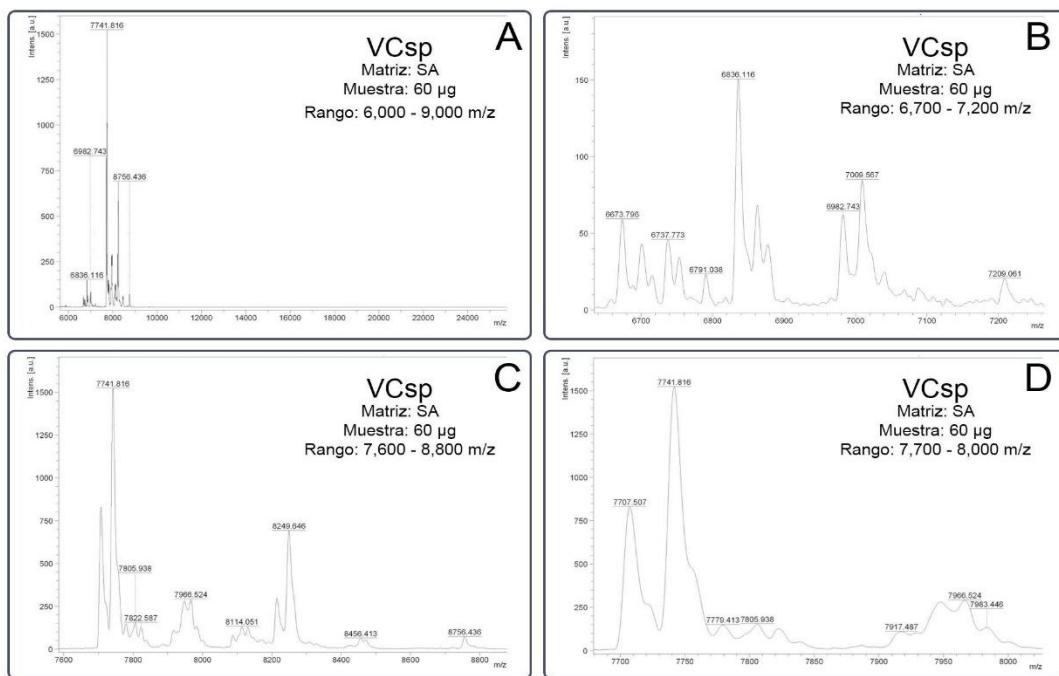


Figura 6. Acercamiento a los picos encontrados en el espectro. En cada una se observan picos de alta intensidad con m/z de 6,000 a 8,000.

8.4 Fraccionamiento por cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa (RP-HPLC)

El fraccionamiento cromatográfico por medio de RP-HPLC dio como resultado el cromatograma mostrado en la Figura 7. Con las condiciones aplicadas, en este análisis se pudo realizar una separación de los componentes del veneno en 12 fracciones. En el cromatograma, se puede observar mayor abundancia relativa en los picos que se encuentran en las fracciones 6, 7 y 10, por lo que se escogieron estas fracciones para realizar posteriores análisis para tener mejor rendimiento de las moléculas recolectadas por este método, además la fracción 9 llama la atención al tener pequeños picos entre los 32 a 36 minutos de tiempo de retención.

La metodología que se siguió en este análisis cromatográfico se basó en la mayoría de los estudios realizados para analizar la composición de venenos en arácnidos; tal es el caso de un estudio publicado en 2008, donde Herzog y colaboradores determinaron que puede haber variaciones intersexuales en la composición de los venenos entre especies. Lo cual demostraron mediante el análisis del veneno de dos arañas *Missulena pruinosa* y *M. bradleyien*, también conocidas como arañas ratón en Australia. En la separación cromatográfica, encontraban picos en los venenos extraídos de hembras que no se encontraban en el veneno de los machos. Esto indica que la diversidad de toxinas es diferente no solo por la especie de arácnido, también interviene su sexo y que se amplía la cantidad de toxinas que se pueden encontrar en estos venenos, estas variaciones pueden deberse a circunstancias ecológicas que han provocado estos cambios en los venenos, ya que se cree que el macho, al tener que dejar la madriguera para buscar una hembra para poder aparearse, este tendría que producir toxinas defensivas, ya que se expone a depredadores, en lugar de producir toxinas depredadoras.

En este estudio, a las fracciones cromatográficas 1, 6, 7, 9 y 10, se les realizó un análisis de espectrometría de masas MALDI-TOF, mostrando una abundante presencia de moléculas de bajo peso molecular. El análisis usando como matriz CHCA (Ácido α -ciano-4-hidroxicinámico) arrojó

resultados que muestran la presencia de moléculas con una masa molecular de 1 a 10 kDa, estos datos fueron organizados en distintas tablas que se muestran dentro de la Figura 8 a Figura 12, donde se recopilaron las masas moleculares más representativas de cada espectro. Cabe recalcar que también se realizó un análisis usando ácido sináptico como matriz para favorecer la ionización de moléculas mayores a 10 kDa. Sin embargo, estos resultados no fueron favorables y no se logró observar alguna ionización en este análisis, lo que podría indicar que en estas fracciones, únicamente se encuentran péptidos o proteínas de muy bajo peso molecular, por lo que las enzimas con actividad de hialuronidasa y otros componentes de alto peso molecular podrían obtenerse con otro tipo de métodos cromatográficos, como exclusión molecular. Por ejemplo, en un estudio de 2012 realizado por Clement y colaboradores, se encargaron de sintetizar de manera recombinante una hialuronidasa identificada en el veneno de la tarántula americana *B. vagans*. Anteriormente este grupo de trabajo logró aislar la hialuronidasa BvHyal usando dos métodos de purificación, el primero mediante cromatografía de exclusión en gel Sephadex G-75 para posteriormente aplicar una cromatografía líquida de intercambio aniónico, dejando estas alternativas como una perspectiva para el estudio del veneno de *Cotztetlana* sp.

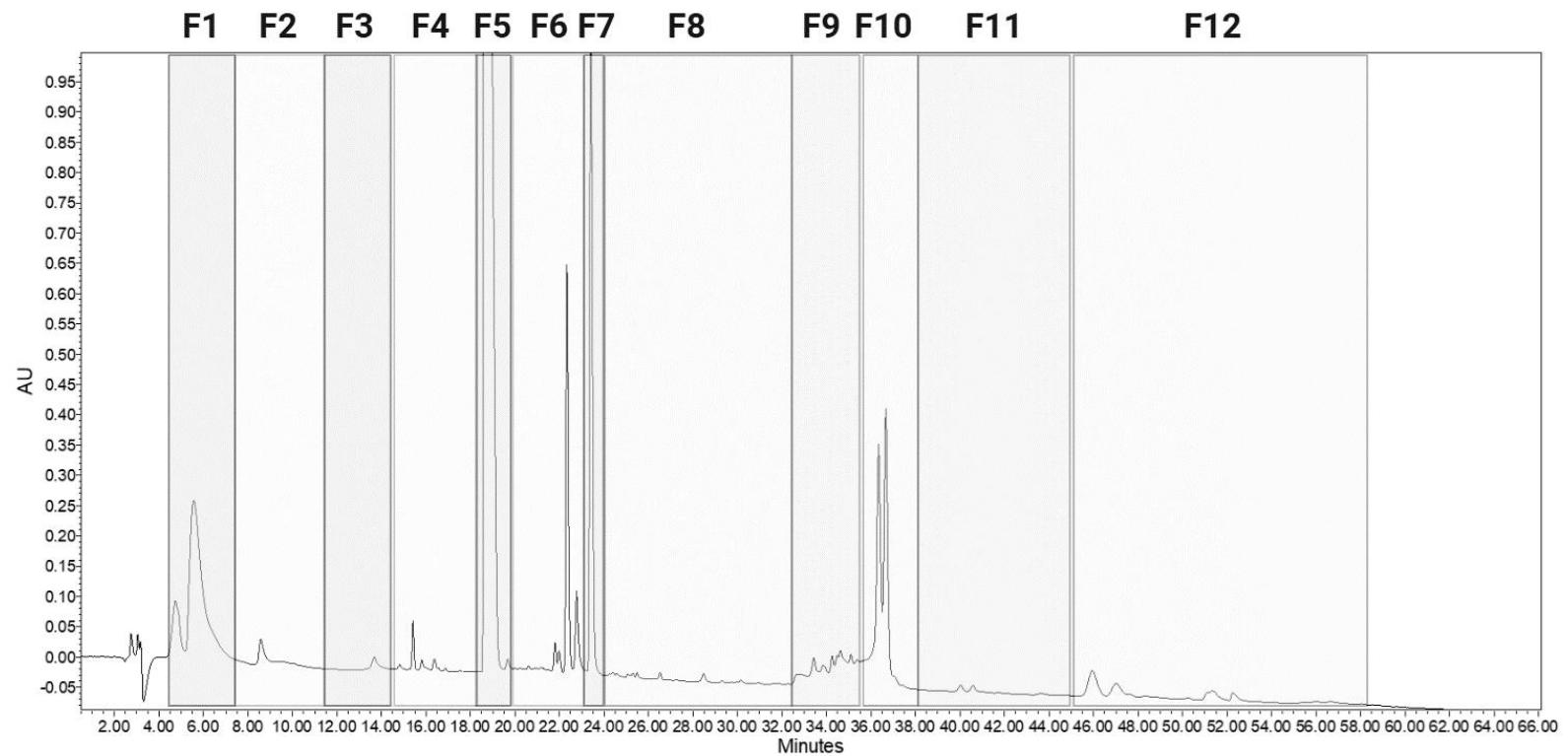


Figura 7. Perfil cromatográfico del veneno de *Cotztetlana* sp. Se recuperaron en total 12 fracciones de la muestra total del veneno con base en los tiempos de retención y la alta intensidad de las señales.

Masas moleculares detectadas más representativas (kDa)

Fracción 1

2 - 3 kDa	3 – 4 kDa	> 4 kDa
2.041696	3.627702	4.010080
2.049644	3.760548	4.079593
2.069105	3.801.401	4.135130
2.077240	3.842222	4.357192
2.187755	3.873879	4.371822
	3.889881	4.891286
	3.924718	6.780004

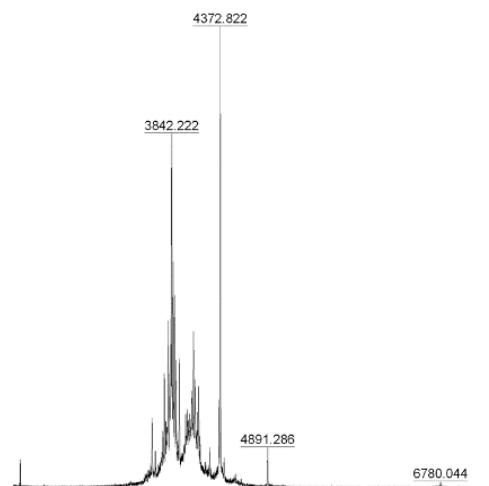


Figura 8. Iones moleculares representativos de la fracción 1 del veneno de *Cotztetlana* sp. La muestra fue procesada con ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico el cual favorece la ionización de moléculas peptídicas menores a 10 kDa. *

Masas moleculares detectadas más representativas (kDa)

Fracción 6

2.889030

2.889992

2.890999

2.891978

2.892957

2.894952

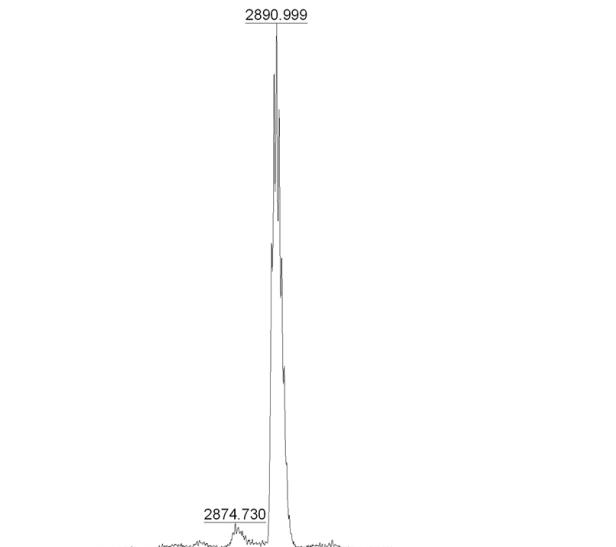


Figura 9. Iones moleculares representativos de la fracción 6 del veneno de *Cotztetlana* sp. La muestra fue procesada con ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico. *

Masas moleculares detectadas más representativas (kDa)

Fracción 7

2.835146
2.852428
2.860303
2.875094
2.891117
3.048902
3.250569

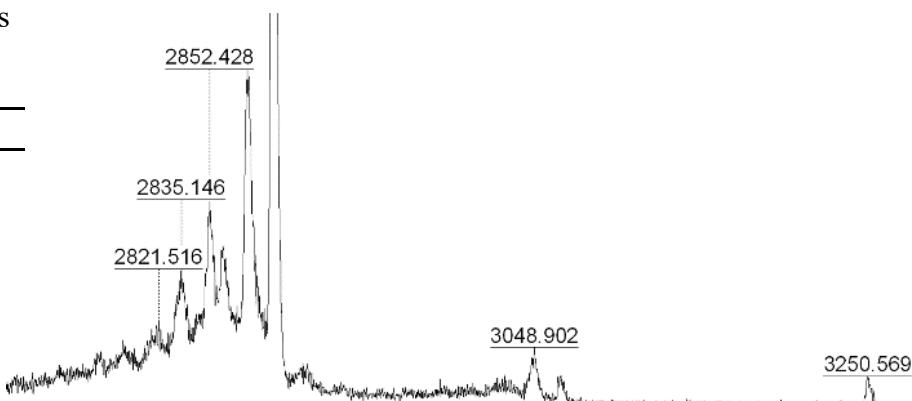


Figura 10. Iones moleculares representativos de la fracción 7 del veneno de *Cotztetlana* sp. La muestra fue procesada con ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico. *

Masas moleculares detectadas más representativas (kDa)

Fracción 9

3.940492
4.258376
4.343165
4.359435
4.383379
4.512400
6.630865

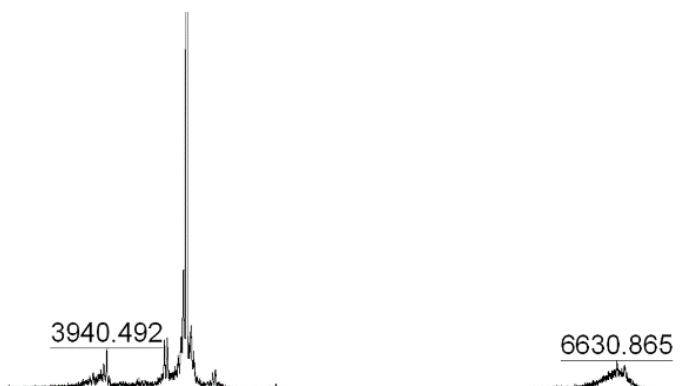


Figura 11. Iones moleculares representativos de la fracción 9 del veneno de *Cotztetlana* sp. La muestra fue procesada con ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico. *

En 2013, Estrada-Gomez y colaboradores reportaron los primeros datos acerca del veneno de *Pamphobeteus aff. nigricolor.*, una tarántula de los Andes colombianos. Al analizar el veneno de machos y hembras encontraron pequeñas diferencias en los cromatogramas. También realizaron un análisis de masas donde lograron identificar tres péptidos anteriormente reportados en venenos de arañas de la familia Theraphosidae (Theraphotoxin-Pn1a, Theraphotoxin-Pn1b y Theraphotoxin-Pn2a). Además, obtuvieron el perfil electroforético de los picos en la fracción que eluyó de 34 a 38 minutos de tiempo de retención, la cual obtuvieron al fraccionar el veneno por RP-HPLC. En esa muestra, se encontraba una gran cantidad de proteínas de bajo peso

molecular, indicando que en esa fracción se encuentran algunos de los péptidos neurotóxicos. Lo anterior nos ayuda a comprender y complementar nuestros resultados, ya que el análisis de masas MALDI-TOF de cada fracción nos demostraba que había péptidos menores a 6 kDa. Esta información respalda que, de haber realizado una separación por electroforesis a las fracciones recolectadas, habríamos obtenido un perfil electroforético donde se visualizarían los péptidos que se detectaron en los espectros de masas. Sin embargo, esto no fue posible debido al poco rendimiento de las fracciones recuperadas.

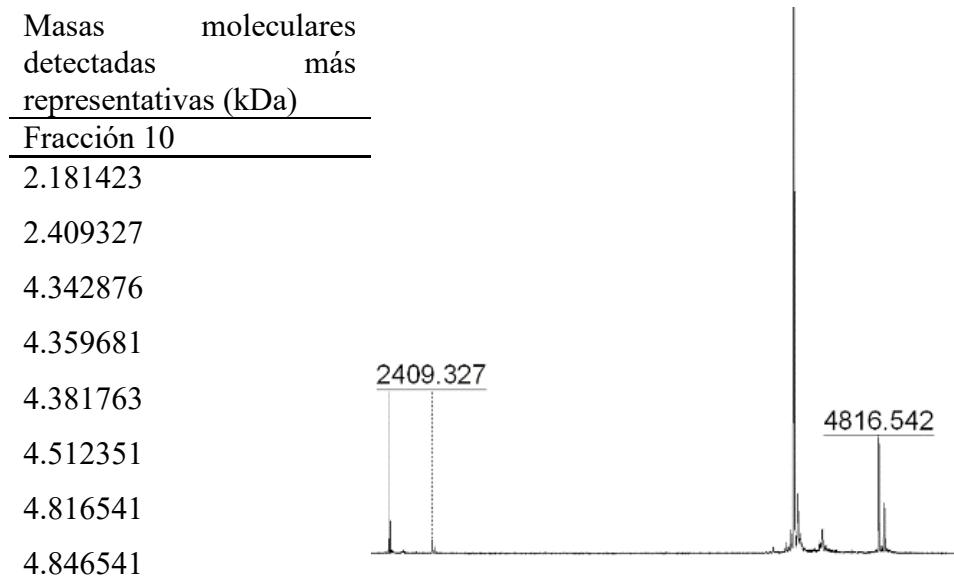


Figura 12. Iones moleculares representativos de la muestra de la fracción 10 del veneno de *Cotztetlana* sp. La muestra fue procesada con ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico. *

8.5 Actividad de hialuronidasa

En la Figura 13 se muestra el gráfico correspondiente a la actividad de hialuronidasa del veneno de *Cotztetlana* sp. Estos resultados muestran que la actividad enzimática del veneno es similar a la actividad de una hialuronidasa de testículo bovino. Como puede observarse en las gráficas, a las concentraciones evaluadas no logra observarse una degradación del sustrato del 100 % del sustrato, se alcanzó un 86 % de actividad a una concentración de proteína en el veneno de 65 µg/mL. Estos datos brindan información acerca de cómo el veneno de esta especie puede llegar a tener

herramientas eficientes para promover la propagación de sus toxinas gracias a la degradación de tejido provocado por estas hialuronidas. En comparación con otros venenos esta actividad no es tan alta. Por ejemplo, en estudios previos, se ha observado que el veneno de la tarántula arborícola de la India *Poecilotheria regalis*, considerada por algunos autores como tarántula subestimada por la intensidad de los efectos de su veneno, alcanza porcentajes cercanos al 100 % de actividad a la concentración de 25 µg/mL (García-Arredondo y col., 2015; Rodríguez-Rios y col., 2017). En otras especies de araña, se han reportado altos niveles de actividad en los venenos de araña violinista (*Loxosceles* sp.), estas especies destacan por promover la difusión de las toxinas de su veneno que desencadenan en la necrosis de los tejidos (Gremski y col., 2021). Es importante mencionar que los niveles de toxicidad de los venenos no están directamente relacionados con la actividad de hialuronidasa, ya que los efectos tóxicos de los venenos de araña se atribuyen a las características particulares y farmacológicas de las toxinas de cada especie, pues en un estudio de 2022 Fernandes y colaboradores, compararon la actividad de hialuronidasa de 3 especies distintas de araña del género *Phoneutria*, estas arañas conocidas como arañas errantes, son de importancia media y modelo de estudio muy recurrente, sin embargo, reportaron que el veneno de entre las tres especies que analizaron tuvieron actividades enzimáticas muy distintas, siendo de 3 a 6 veces más potentes en comparación a la de menor actividad.

Un estudio de 2025 presentó una compilación de actividades enzimáticas en venenos de distintas tarántulas, se reporta una hipótesis acerca de la diferencia que presentan las hialuronidas en venenos de diferentes especies. Si bien la función de estas enzimas está relacionada a mejorar la propagación de las toxinas degradando el ácido hialurónico en tejidos de mamíferos (sus depredadores), los insectos (sus presas) carecen de ácido hialurónico en su matriz extracelular. Siendo el sulfato de condroitina la que estos presentan. Por ellos se cree que aquellas tarántulas que mantienen hialuronidas tan potentes se deben a su papel ecológico y defensivo

que estas han conservado. Mientras que tarántulas de la subfamilia Theraphosinae, que son tarántulas establecidas en regiones americanas, cuentan con otro mecanismo de defensa como lo es el uso de los pelos urticantes. Teorizando que, al contar con otro mecanismo de defensa, las hialuronidas comenzaron a perder relevancia en el aspecto defensivo de estos organismos (Dresler y col., 2025).

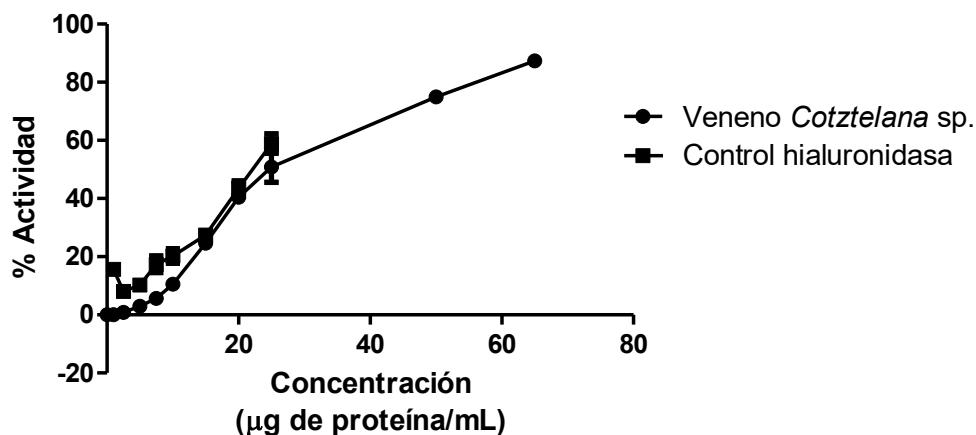


Figura 13. Actividad de hialuronidasa del veneno de *Cotztetlana* sp. El porcentaje de actividad es proporcional al porcentaje de degradación del sustrato (HA: Ácido hialurónico) Se utilizó como control una hialuronidasa de testículo bovino (Sigma).

8.6 Toxicidad

El análisis de la toxicidad del veneno de *Cotztetlana* sp. en grillos se muestra en la Figura 14. Mediante un ajuste no lineal, se estimó que la dosis letal media (DL_{50}) a las 24 horas fue $102.3 \mu\text{g/g}$ de peso corporal ($\text{Log}DL_{50} 24\text{h}=2.01 \pm 0.25$). Para las 48 horas, la $DL_{50}=40.45 \mu\text{g/g}$ de peso corporal ($\text{Log} DL_{50} 48\text{h}=1.607 \pm 0.65$). Estos datos no dan una referencia de los efectos que podría presentar el veneno de esta especie (*Cotztetlana* sp.), si se compara con resultados obtenidos por nuestro grupo de trabajo, se observa que es un veneno poco potente, esto comparado con el veneno de *P. regalis*, que se considera como especie de significancia clínica por los síntomas que

provoca en humanos (García-Arredondo y col., 2015; García-Arredondo y col., 2024). En un estudio previo, se encontró que la dosis letal media de 3 especies de tarántulas geográficamente distantes *P. regalis*, *Ceratogyrus darlingi* y *Brachypelma epicureanum* fueron de 20.6 ± 6.2 , 119.4 ± 29.5 , 31.5 ± 9.6 ($\mu\text{g/g}$) a las 24 h respectivamente y de 5.23 ± 3.1 , 120.2 ± 32.3 , 14.4 ± 5.0 ($\mu\text{g/g}$) a las 48 h respectivamente. Con base a estos datos, se puede tener una perspectiva de la potencia del veneno de *Cotztetlana* sp., teniendo una similitud de LD₅₀ a las 24 horas con la especie *C. darlingi*, una tarántula africana. Mientras tanto, si se comparan los datos obtenidos con tarántulas procedentes de la India, que son consideradas de significancia clínica como lo es *P. regalis*, se observa la gran diferencia de potencia que estos presentan. Para tener mayor información acerca de la toxicidad del veneno, es importante completar esta información con la toxicidad en ratones, por lo que podría ser una perspectiva a futuro para ampliar la información obtenida en este estudio.

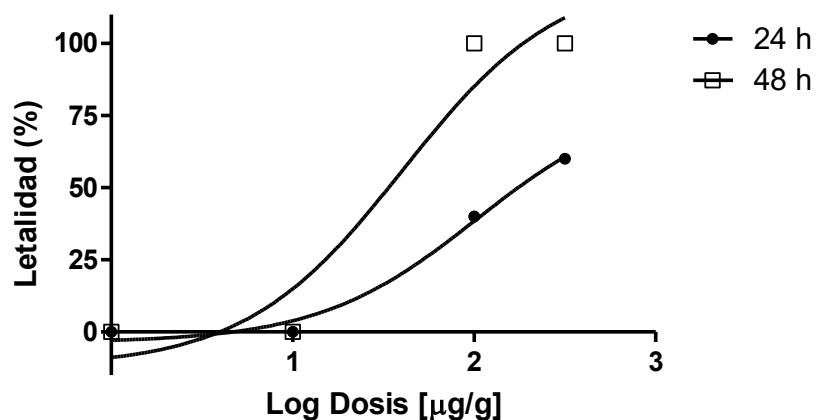


Figura 14. Curva logarítmica de la toxicidad sobre grillos *Acheta domesticus* a las 24 y 48 horas con dosis de 1, 10, 100 y 316 μg de proteína del veneno/g de peso corporal.

9. CONCLUSIONES

Mediante el presente estudio se logró realizar por primera vez una caracterización bioquímica del veneno de la tarántula endémica de México

Cotztetlana sp., esta investigación aporta información sobre su composición bioquímica, toxicidad y actividad enzimática. La determinación del perfil cromatográfico del veneno, así como los análisis mediante espectrometría de masas y electroforesis, mostraron la presencia de una mezcla compleja de péptidos de bajo peso molecular, en un rango de 4 a 9 kDa. Además, se determinó la toxicidad en grillos para establecer un parámetro toxicológico del veneno y sus niveles de actividad de hialuronidasa. Este estudio amplía el conocimiento sobre la biodiversidad de arácnidos en México y sustenta las bases para futuras investigaciones dirigidas a aislar y secuenciar toxinas específicas con potencial farmacológico. Entre las perspectivas de este estudio, se encuentra como siguiente paso la secuenciación de las fracciones cromatográficas obtenidas para indagar acerca de su función y posible aplicación farmacológica. Las especies endémicas aún tienen muchos secretos por descubrir, por ello se espera seguir explorando estos aspectos desconocidos que presenta esta mega diversidad de tarántulas en México.

10. REFERENCIAS

Ahmed, J., Walker, A. A., Perdomo, H. D., Guo, S., Nixon, S. A., Vetter, I., Okoh, H. I., Shehu, D. M., Shuaibu, M. N., Ndams, I. S., King, G. F., & Herzig, V. (2023). Two Novel Mosquitocidal Peptides Isolated from the Venom of the Bahia Scarlet Tarantula (*Lasiodora klugi*). *Toxins*, 15(7), 418. <https://doi.org/10.3390/toxins15070418>

Bordon, K. C. F., Cologna, C. T., Fornari-Baldo, E. C., Pinheiro-Júnior, E. L., Cerni, F. A., Amorim, F. G., Anjolette, F. A. P., Cordeiro, F. A., Wiezel, G. A., Cardoso, I. A., Ferreira, I. G., de Oliveira, I. S., Boldrini-França, J., Pucca, M. B., Baldo, M. A., & Arantes, E. C. (2020). From Animal Poisons and Venoms to Medicines: Achievements, Challenges and Perspectives in Drug Discovery. *Frontiers in pharmacology*, 11, 1132. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.01132>

Clement, H., Olvera, A., Rodríguez, M., Zamudio, F., Palomares, L. A., Possani, L. D., Odell, G. V., Alagón, A., & Sánchez-López, R. (2012). Identification, cDNA cloning and heterologous expression of a hyaluronidase from the tarantula *Brachypelma vagans* venom. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*, 60(7), 1223–1227. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.08.018>

Coulter-Parkhill, A., Dobbin, S., Tanday, N., Gault, V. A., McClean, S., & Irwin, N. (2023). A novel peptide isolated from *Aphonopelma chalcodes* tarantula venom with benefits on pancreatic islet function and appetite control. *Biochemical pharmacology*, 212, 115544. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2023.115544>

De-Bona, E., Chaves-Moreira, D., Batista, T. B. D., Justa, H. C. D., Rossi, G. R., Antunes, B. C., Matsubara, F. H., Minozzo, J. C., Wille, A. C. M., Veiga, S. S., Senff-Ribeiro, A., & Gremski, L. H. (2021). Production of a novel recombinant brown spider hyaluronidase in baculovirus-infected insect cells. *Enzyme and microbial technology*, 146, 109759. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2021.109759>

DI FERRANTE N. (1956). Turbidimetric measurement of acid mucopolysaccharides and hyaluronidase activity. *The Journal of biological chemistry*, 220(1), 303–306.

Dresler, J., Herzig, V., Schulte, L., & Lüddecke, T. (2025). Bioactivity profiling of spider venoms reveals predominant hyaluronidase activities. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*, 108667. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2025.108667>

Estrada-Gomez, S., Vargas Muñoz, L. J., & Quintana Castillo, J. C. (2013). Extraction and partial characterization of venom from the Colombian spider *Pamphobeteus aff. nigricolor* (Aranae:Theraphosidae).

Fernandes, F. F., Moraes, J. R., Dos Santos, J. L., Soares, T. G., Gouveia, V. J. P., Matavel, A. C. S., Borges, W. C., Cordeiro, M. D. N., Figueiredo, S. G., & Borges, M. H. (2022). Comparative venomic profiles of three spiders of the genus *Phoneutria*. *The journal of venomous animals and toxins including tropical diseases*, 28, e20210042. <https://doi.org/10.1590/1678-9199-JVATID-2021-0042>

Garb J. E. (2014). Extraction of venom and venom gland microdissections from spiders for proteomic and transcriptomic analyses. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (93), e51618. <https://doi.org/10.3791/51618>

García-Arredondo, A., Rodríguez-Rios, L., Díaz-Peña, L. F., & Vega-Ángeles, R. (2015). Pharmacological characterization of venoms from three theraphosid spiders: *Poecilotheria regalis*, *Ceratogyrus darlingi* and *Brachypelma epicureanum*. *The journal of venomous animals and toxins including tropical diseases*, 21, 15. <https://doi.org/10.1186/s40409-015-0017-8>

García-Arredondo, J. A., Mosqueda, J., Cuéllar-Balleza, L., Sánchez-Morales, F. P., Buitrón, I., Pescador-Tovar, D. L., & Mohan, A. (2024). Envenomation by the Indian ornamental tarantula (*Poecilotheria regalis*): A case report on treatment with *Latrodectus mactans* antivenom. *Toxicon*, 247, 107842. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2024.107842>

Görg, A., Weiss, W., & Dunn, M. J. (2004). Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*, 4(12), 3665–3685. <https://doi.org/10.1002/pmic.200401031>

Gremski, L. H., Matsubara, F. H., da Justa, H. C., Schemczssen-Graeff, Z., Baldissera, A. B., Schluga, P. H. C., Leite, I. O., Boia-Ferreira, M., Wille, A. C. M., Senff-Ribeiro, A., & Veiga, S. S. (2021). Brown spider venom toxins: what are the functions of astacins, serine proteases, hyaluronidases, allergens, TCTP, serpins and knottins?. *The journal of venomous animals and toxins including tropical diseases*, 27, e20200188. <https://doi.org/10.1590/1678-9199-JVATID-2020-0188>

Guo, R., Guo, G., Wang, A., Xu, G., Lai, R., & Jin, H. (2023). Spider-Venom Peptides: Structure, Bioactivity, Strategy, and Research Applications. *Molecules* (Basel, Switzerland), 29(1), 35. <https://doi.org/10.3390/molecules29010035>

Herzig, V., Khalife, A. A., Chong, Y., Isbister, G. K., Currie, B. J., Churchill, T. B., Horner, S., Escoubas, P., Nicholson, G. M., & Hodgson, W. C. (2008). Intersexual variations in Northern (*Missulena pruinosa*) and Eastern (*M. bradleyi*) mouse spider venom. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*, 51(7), 1167–1177. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2008.02.001>

Hu, Z., Chen, B., Xiao, Z., Zhou, X., & Liu, Z. (2019). Transcriptomic Analysis of the Spider Venom Gland Reveals Venom Diversity and Species Consanguinity. *Toxins*, 11(2), 68. <https://doi.org/10.3390/toxins11020068>

Koua, D., Mary, R., Ebou, A., Barrachina, C., El Koulali, K., Cazals, G., Charnet, P., & Dutertre, S. (2020). Proteotranscriptomic Insights into the Venom Composition of the Wolf Spider *Lycosa* tarantula. *Toxins*, 12(8), 501. <https://doi.org/10.3390/toxins12080501>

Langenegger, N., Nentwig, W., & Kuhn-Nentwig, L. (2019). Spider Venom: Components, Modes of Action, and Novel Strategies in Transcriptomic and Proteomic Analyses. *Toxins*, 11(10), 611. <https://doi.org/10.3390/toxins11100611>

Marchi, F. C., Mendes-Silva, E., Rodrigues-Ribeiro, L., Bolais-Ramos, L. G., & Verano-Braga, T. (2022). Toxinology in the proteomics era: a review on arachnid venom proteomics. *The journal of venomous animals and toxins including tropical diseases*, 28, 20210034. <https://doi.org/10.1590/1678-9199-JVATITD-2021-0034>

McDermott, A. (2020). News Feature: Venom back in vogue as a wellspring for drug candidates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 202004486. doi:10.1073/pnas.2004486117

Ménez, A., Stöcklin, R., & Mebs, D. (2006). 'Venomics' or: The venomous systems genome project. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*, 47(3), 255–259. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.12.010>

Ondetti, M. A., Williams, N. J., Sabo, E. F., Pluscenc, J., Weaver, E. R., & Kocy, O. (1971). Angiotensin-converting enzyme inhibitors from the venom of Bothrops jararaca. Isolation, elucidation of structure, and synthesis. *Biochemistry*, 10(22), 4033–4039. <https://doi.org/10.1021/bi00798a004>

Pereañez, J. A., & Vargas, L. J. (2009). Neurotoxinas de invertebrados como alternativas terapéuticas y herramientas en investigación básica. *Vitae*, 16(1), 155–163.

Pineda, S. S., Chin, Y. K., Undheim, E. A. B., Senff, S., Mobli, M., Dauly, C., Escoubas, P., Nicholson, G. M., Kaas, Q., Guo, S., Herzog, V., Mattick, J. S., & King, G. F. (2020). Structural venomics reveals evolution of a complex venom by duplication and diversification of an ancient peptide-encoding gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(21), 11399–11408. <https://doi.org/10.1073/pnas.1914536117>

Rocha-E-Silva, T. A., Sutti, R., & Hyslop, S. (2009). Milking and partial characterization of venom from the Brazilian spider *Vitalius dubius* (Theraphosidae). *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*, 53(1), 153–161. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2008.10.026>

Rodríguez-Rios, L., Díaz-Peña, L. F., Lazcano-Pérez, F., Arreguín-Espinosa, R., Rojas-Molina, A., & García-Arredondo, A. (2017). Hyaluronidase-like enzymes are a frequent component of venoms from theraphosid spiders. *Toxicon*, 136, 34–43. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.07.001>

Sanggaard, K. W., Bechsgaard, J. S., Fang, X., Duan, J., Dyrlund, T. F., Gupta, V., Jiang, X., Cheng, L., Fan, D., Feng, Y., Han, L., Huang, Z., Wu, Z., Liao, L., Settepani, V., Thøgersen, I. B., Vanthournout, B., Wang, T., Zhu, Y., Funch, P., ... Wang, J. (2014). Spider genomes provide insight into composition and evolution of venom and silk. *Nature communications*, 5, 3765. <https://doi.org/10.1038/ncomms4765>

Santana, R. C., Perez, D., Dobson, J., Panagides, N., Raven, R. J., Nouwens, A., Jones, A., King, G. F., & Fry, B. G. (2017). Venom Profiling of a Population of the Theraphosid Spider *Phlogius crassipes* Reveals Continuous Ontogenetic Changes from Juveniles through Adulthood. *Toxins*, 9(4), 116. <https://doi.org/10.3390/toxins9040116>

Schägger, H., y von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical biochemistry*, 166(2), 368–379. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90587-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90587-2)

von Reumont, B. M., Anderluh, G., Antunes, A., Ayvazyan, N., Beis, D., Caliskan, F., Crnković, A., Damm, M., Dutertre, S., Ellgaard, L., Gajski, G., German, H., Halassy, B., Hempel, B. F., Hucho, T., Igci, N., Ikonomopoulou, M. P., Karbat, I., Klapa, M. I., Koludarov, I., ... Zancolli, G. (2022). Modern venomics-Current insights, novel methods, and future perspectives in biological and applied animal venom research. *GigaScience*, 11, giac048. <https://doi.org/10.1093/gigascience/giac048>

Wang, M., Xu, P., Yang, Z., Si, M. (2022). Analysis of Eight Spider Venom Glands Using Raman Spectroscopy. Journal of Molecular Structure. 1263. 133009. 10.1016/j.molstruc.2022.133009.