

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

“IDENTIFICACIÓN DE LAS PRINCIPALES TOXINAS
PEPTÍDICAS PRESENTES EN EL VENENO DE LA
TARÁNTULA *Poecilotheria regalis* (Pocock, 1899)”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

PRESENTA

Q.F.Bt. LUIS FERNANDO DÍAZ PEÑA

DIRIGIDO POR

Dr. JOSÉ ALEJANDRO GARCÍA ARREDONDO

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2017



Universidad Autónoma de Querétaro
 Facultad de Química
 Maestría en Ciencias Químico Biológicas

"Identificación de las principales toxinas peptídicas presentes en el Veneno de la tarántula *Roecilothea regalis* (Pocock, 1899)"

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
 Maestro en Ciencias Químico Biológicas

Presenta:

Q.F.Bt Luis Fernando Díaz Peña

Dirigida por:

Dr. José Alejandro García Arredondo

Dr. José Alejandro García Arredondo
 Presidente



 Firma

Dr. Mamadou Moustapha Bah
 Secretario



 Firma

M. en C. Héctor Arturo Hurtazo Oliva
 Vocal



 Firma

Dra. Juana Isela Rojas Molina
 Suplente



 Firma

Dr. César Ibarra Alvarado
 Suplente



 Firma



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



Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
 Directora De Investigación Y Posgrado

AGRADECIMIENTOS

A Daniela, hasta el último instante.

C'est tout

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Investigación Química y Farmacológica de Productos Naturales de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro, bajo la dirección del Dr. José Alejandro García Arredondo, con apoyo de una beca completa CONACYT (**número de becario 588445**), otorgada por parte del proyecto de investigación titulado "**CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE LOS VENENOS DE TARÁNTULAS DEL GÉNERO *Poecilotheria***", mismo que tiene financiamiento por parte del Fondo Sectorial de Investigación para la Educación con clave **CONACYT CB-2013-01/223591**. Agradezco atentamente al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por haberme apoyado durante la realización de este proyecto. Además, quisiera agradecer al posgrado en Ciencias Químico Biológicas por abrirme sus puertas.

"Science is a method for deciding whether what one believes obeys the laws of nature or not."

"Cuanto más alto escala el mono, mejor se le ve el culo..."

RESUMEN

El veneno de las tarántulas está constituido por una mezcla heterogénea de compuestos bioactivos, cuya acción sinérgica sobre receptores predeterminados permite a estos arácnidos subyugar a sus presas y ahuyentar a sus depredadores. Así mismo, estos componentes varían en su composición y concentración en virtud de múltiples factores, siendo el sexo uno de los más importantes. Un aspecto importante a considerar es el hecho que, cuando estas toxinas son estudiadas individualmente, pueden ser utilizadas para el desarrollo de fármacos, útiles para tratar diversos padecimientos, en especial los péptidos, los cuales exhiben una alta afinidad por receptores específicos y son resistentes a la temperatura y a la degradación enzimática, debido a que presentan arreglos tridimensionales que les provee de una estructura química estable. Por otro lado, la tarántula ornamental de la India *Poecilotheria regalis*, representa una de las especies arborícolas más comercializadas en el mundo, a pesar de que los síntomas por envenenamiento sean más severos y prolongados con respecto a los de otras especies. Aunque el proceso de obtención del veneno de *P. regalis* es sencillo y se pueden realizar múltiples extracciones, existe escasa información sobre la composición e identidad de las toxinas peptídicas presentes en su veneno. En este trabajo se exploraron las diferencias de la expresión y composición de las toxinas presentes en el veneno de tarántulas hembras y machos de *P. regalis*, a través de electroforesis, espectrometría de masas y cromatografía de líquidos. Además, se identificaron toxinas peptídicas con potencial aplicación biotecnológica mediante técnicas acopladas de cromatografía de líquidos y espectrometría de masas. También se evaluó el potencial toxicológico del veneno en ratones ($DL_{50} = 10.76 \pm 2.038 \mu\text{g/g}$) y en larvas de *Drosophila melanogaster* ($DL_{50} = 0.01685 \pm 0.008 \mu\text{g/g}$). Mediante este estudio, se establecieron diferencias entre la composición de los venenos de machos y hembras de *P. regalis*, se encontró homología con algunas toxinas con efecto insecticida con mecanismos que involucran canales de calcio operados por voltaje y se observó que este veneno es letal en modelos de vertebrados e invertebrados.

(Palabras Clave: *P. regalis*, composición química, veneno, aplicaciones biotecnológicas).

SUMMARY

Venoms from tarantulas are composed by mixtures of heterogeneous bioactive compounds whose synergistically action in predetermined cell receptors allows these arachnids to subdue their prey and deter predators. Moreover, these compounds differ in their concentration and composition by virtue of multiple factors, being gender the most meaningful. Interestingly, when these toxins are studied individually, they can be useful for drug development and to treat diverse diseases, especially peptides because of their high affinity for specific receptors and their thermic and enzymatic resistance, due to their key tridimensional arrangements. Furthermore, the Indian ornamental tarantula *Poecilotheria regalis* represents one of the most commercialized arboreal tarantulas, regardless the symptoms produced by its envenomation are more severe and harder than other species. In spite of the ease related to milking procedure, and the possibility of multiple extractions, there is scarce information regarding concentration and composition of peptide toxins. In this study, we explored the differences in venom composition and expression from male and female tarantulas of *P. regalis* through electrophoresis, mass spectrometry, and liquid chromatography. Likewise, we identified peptide toxins with a biotechnological potential application using hyphenated techniques as HPLC-MS/MS. Also, we tested the toxicity of the venom in mice (LD50 = 10.76 $\mu\text{g/g} \pm 2.038 \mu\text{g/g}$) and in *Drosophila melanogaster* larvae (LD50 = 0.01685 $\mu\text{g/g} \pm 0.008 \mu\text{g/g}$). We established the differences concerning toxins composition and concentration in the venom from male and female *P. regalis* tarantulas and found homology with some toxins with insecticidal activity with mechanisms that relate voltage-gated calcium channels, lethality effects were also observed in vertebrate and invertebrate animal models.

(Keywords: *P. regalis*, venom, chemical composition, biotechnological applications)

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE TABLAS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1 Importancia del estudio de toxinas de origen animal	4
2.2 Las tarántulas como animales venenosos	7
2.3 Composición del veneno de tarántulas	9
2.3.1 Toxinas de bajo peso molecular	11
2.3.2 Toxinas de alto peso molecular	13
A. Enzimas	13
B. Péptidos	15
2.4 Efectos principales de los venenos de tarántulas	21
2.5 Métodos de extracción y almacenamiento de veneno de tarántulas	25
2.6 Aplicaciones prácticas de péptidos purificados del veneno de tarántulas	27
2.6.1 Aplicaciones de péptidos como herramientas farmacológicas	27
2.6.2 Descubrimientos concomitantes a la aplicación biotecnológica de péptidos	29
2.7 Tarántula ornamental de la India <i>Poecilotheria regalis</i> (Pocock, 1899)	30
2.8 Técnicas empleadas en venómicas	32
2.8.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida 'Tricine SDS-PAGE'	33
2.8.2 Cromatografía de líquidos de alta resolución en fase reversa 'RP-HPLC'	34
2.8.3 Espectrometría de masas 'MALDI-TOF'	34
2.8.4 Cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a espectrometría de masas <i>en tandem</i> 'LC-ESI-Q-TOF-MS'	35
2.8.5 Ensayos de toxicidad	37

3. JUSTIFICACIÓN	38
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	39
5. HIPÓTESIS	40
6. OBJETIVOS	41
6.1 Objetivo principal	41
6.2 Objetivos específicos	41
7. METODOLOGÍA	43
7.1 Obtención y mantenimiento de tarántulas de la especie <i>Poecilotheria regalis</i>	43
7.2 Extracción de veneno	43
7.3 Liofilización	44
7.4 Cuantificación de proteína	44
7.5 Electroforesis en gel de poliacrilamida 'Tricine SDS-PAGE'	44
7.6 Cromatografía de líquidos de alta resolución en fase reversa 'RP-HPLC'	44
7.7 Espectrometría de masas 'MALDI-TOF-MS'	45
7.8 Secuenciación parcial 'RP-HPLC-ESI-MS/MS'	45
7.9 Ensayos de toxicidad	46
8. RESULTADOS	48
8.1 Extracción del veneno	48
8.2 Distribución de los componentes del veneno de <i>P. regalis</i> de acuerdo a su peso molecular	48
8.3 Distribución de las toxinas peptídicas presentes en el veneno de <i>P. regalis</i> de acuerdo a su peso molecular	51
8.4 Identificación de péptidos presentes en las fracciones representativas	54
8.5 Ensayos de toxicidad	54
9. DISCUSIÓN	58
10. CONCLUSIÓN	63
11. BIBLIOGRAFÍA	64
12. ANEXO	74

ÍNDICE DE TABLAS

TABLAS		Página
Tabla 1	Identificación de las toxinas peptídicas presentes en las fracciones 6, 8 y 23 separadas del veneno de <i>P. regalis</i>	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
Figura 1	Esquema de la distribución de animales venenosos en el reino animal	5
Figura 2	Convergencia de acción toxicológica	6
Figura 3	Glándula de veneno de <i>P. regalis</i>	8
Figura 4	Cromatogramas de 'RP-HPLC' del veneno de hexatélidas machos y hembras de la especie <i>Atrax robustus</i>	10
Figura 5	Compuestos de bajo peso molecular presentes en el veneno de arañas	12
Figura 6	Clasificación de las proteínas identificadas en el veneno de <i>Grammostola inheringi</i> , con base en su actividad catalítica	14
Figura 7	Distribución de péptidos de acuerdo a su peso molecular, presentes en el veneno de múltiples tarántulas y arañas	16
Figura 8	Estructuras conservadas de péptidos purificados del veneno de tarántulas	19
Figura 9	Arquitectura de las toxinas peptídicas purificadas de diversas especies de Hexatélidas	20
Figura 10	Representaciones tridimensionales de la superficie molecular de la toxina peptídica PcTx1 interactuando con el bolsillo ácido del receptor ASIC1a	23
Figura 11	Esquema de la nomenclatura de toxinas peptídicas propuestas por Glenn King en 2008	24
Figura 12	Métodos de extracción de veneno	26
Figura 13	Distribución geográfica de la tarántula <i>P. regalis</i>	31

Figura 14	Estrategias analíticas en el descubrimiento de toxinas, basadas en venómicas	33
Figura 15	Diagrama de flujo empleado en la búsqueda de toxinas peptídicas con potencial biotecnológico del veneno de <i>G. inheringi</i>	36
Figura 16	Exploración de las toxinas presentes en el veneno de tarántulas hembras y machos de la especie <i>P. regalis</i> , mediante electroforesis 'Tricine SDS-PAGE'	49
Figura 17	Exploración del peso molecular de las toxinas peptídicas presentes en el veneno de tarántulas de ambos sexos de la especie <i>P. regalis</i>	50
Figura 18	Perfil cromatográfico del veneno de tarántulas de ambos sexos de la especie <i>P. regalis</i>	52
Figura 19	Histograma de abundancia de toxinas peptídicas con base en su peso molecular	53
Figura 20	Distribución de las toxinas peptídicas de acuerdo a su peso molecular presentes en las fracciones separadas del veneno de <i>P. regalis</i>	53
Figura 21	Curvas dosis-respuesta que muestran la toxicidad del veneno de <i>P. regalis</i>	56
Figura 22	Fotografías representativas de microscopía de luz que muestran el análisis histológico de los ratones a los que se les administró el veneno de <i>P. regalis</i>	57

1. INTRODUCCIÓN

Las tarántulas son un grupo de 962 especies descritas de animales venenosos que, con respecto a otros arácnidos, se caracterizan por su gran tamaño y amplia distribución mundial (World Spider Catalog, 2017). Estos animales pueden ser clasificados en función del hábitat que ocupan para la elaboración de sus madrigueras, como tarántulas arborícolas o excavadoras, las cuales tienen presas y depredadores diferentes (Pérez-Miles *et al.*, 2015). Por otro lado, con el fin de mantener el *status quo* de su entorno, administran secreciones producidas por glándulas especializadas a través de dispositivos puntiformes, evolucionados con el fin de infligir heridas en sus presas y depredadores. Dichas secreciones son conocidas como veneno y están elaboradas de múltiples compuestos orgánicos denominados toxinas, las cuales han sido diseñadas por presiones evolutivas acoplado su acción biológica de manera sinérgica hacia una misma dirección: parálisis para alimentarse y dolor para defenderse (Vassilevski *et al.*, 2009; Morales-Gonzalez *et al.*, 2015). De manera general, los venenos de tarántulas están compuestos por moléculas peptídicas y proteínas codificadas por genes expresados en la glándula venenosa, mismos que abarcan pesos moleculares desde 1 a 100 kDa. Los péptidos son los componentes más abundantes de estas secreciones y comparten entre ellos estrechas similitudes tanto estructurales como fisicoquímicas (Escoubas y Rash, 2004).

En relación a su actividad biológica, los péptidos actúan principalmente como neurotoxinas alterando la fisiología de canales iónicos operados por voltaje, mientras que entre las proteínas destacan enzimas que ayudan a la propagación del resto de los componentes, desde la zona de la mordedura, hacia su sitio de acción. De este modo, los componentes del veneno intervienen conjuntamente para inducir los efectos toxicológicos durante el envenenamiento (Siemens *et al.*, 2006). Curiosamente, cuando los péptidos purificados del veneno son analizados de manera individual, pueden ser desarrollados como herramientas biotecnológicas útiles en virtud de la alta potencia y especificidad que presentan por sus blancos biológicos. De esta manera, el estudio venómico de toxinas peptídicas ha permitido dilucidar

nuevos estados conformacionales de canales iónicos operados por voltaje y receptores que integran múltiples señales (Siemens *et al.*, 2006; Liao *et al.*, 2013). Por ejemplo, con respecto al receptor TRPV1a, se ha propuesto una nueva conformación activa provocada por la interacción de la toxina peptídica de doble nudo inhibitorio de cistina *DkTx*, purificada del veneno de la tarántula tigre de tierra de Malasia *Haplopelma schmidtii*, sobre el sexto segmento transmembranal de dos de las subunidades formadoras del poro del canal (Bohlen *et al.*, 2010; King, 2011). Este receptor se ha caracterizado como un receptor farmacológico que involucra parte de los componentes fisiológicos relacionados con la nocicepción, por lo cual el conocimiento de su fisiología impulsa el desarrollo de fármacos útiles para el tratamiento de este padecimiento (Eskander *et al.*, 2015). Por otro lado, se han encontrado toxinas peptídicas que interactúan específicamente sobre diversas isoformas de canales iónicos operados por voltaje de sodio y que se han aplicado como herramientas farmacológicas, como el péptido ‘ μ -theraphotoxin-Tp1a’ purificado del veneno de la tarántula de terciopelo verde de Perú *Thrixopelma pruriens*, el cual retarda la apertura del canal iónico de sodio operado por voltaje $Na_v1.7$ con una especificidad de 2.1 y 2.5 nM, empleando la toxina nativa y recombinante respectivamente (Cardoso *et al.*, 2015). Por otra parte, los péptidos ‘Hm1a’ y ‘Hm2a’, purificados del veneno de la tarántula radiante de Togo *Heteroscodra maculata* actúan individualmente con canales iónicos operados por voltaje de sodio $Na_v1.1$ en fibras mielinizadas de la asta dorsal de la médula espinal produciendo dolor mecanosensitivo, lo cual ha ayudado a caracterizar a este receptor como una diana farmacológica implicada en la propagación del potencial de acción de la nocicepción mecanosensitiva (Osteen *et al.*, 2016). Además, se ha determinado mediante ensayos de toxicidad *in vivo* e *in vitro* el efecto insecticida selectivo para distintos insectos del veneno crudo y de toxinas purificadas del veneno de arañas. Por consiguiente, estas secreciones son consideradas una nueva fuente de bioinsecticidas que pueden ser aplicadas en la agroindustria (Hardy *et al.*, 2013). Otra característica que resalta de las toxinas peptídicas es su secuencia primaria dotada de aminoácidos en posiciones claves, misma que inducen conformaciones

terciarias con arreglos estructurales que les proveen a las toxinas de resistencia a altas temperaturas y a diferentes proteasas con elementos denominados nudos inhibitorios de cistina (Kikuchi *et al.*, 2015). La presencia de estos arreglos es muy importante en la búsqueda de toxinas oralmente activas del veneno de tarántulas, algunas de las cuales han sido patentadas y se emplean como herramientas de investigación e incluso algunas de ellas han llegado a convertirse en fármacos (McGivern, 2007; King, 2011). Por otra parte, se cree que los péptidos han evolucionado produciendo múltiples variantes discretas de aminoácidos localizados alrededor de la estructura del nudo inhibitorio, en respuesta a la necesidad de adaptarse a las diferencias estructurales de los receptores de sus diversas presas. Como consecuencia, cada tarántula produce en promedio 700 péptidos con variantes discretas de cada uno, lo cual hace que los venenos de tarántulas representen verdaderas bibliotecas de química combinatoria de péptidos con potencial aplicación biotecnológica (Chen *et al.*, 2009; Cunha, 2013; Pineda *et al.*, 2014a). La tarántula ornamental hindú *Poecilotheria regalis*, es una especie de tarántula arborícola endémica del sur de la India que se caracteriza por su largo tamaño y su amplia comercialización como mascota (Nanayakkara *et al.*, 2015; Andreev-Andrievskiy *et al.*, 2017). En contraste con otras especies, la mordedura de esta tarántula ocasiona dolor, inflamación y entumecimiento prolongado desde la zona de la mordedura hacia el resto de las extremidades lesionadas, lo cual difiere con los efectos producidos por la mordedura de otras especies de tarántulas tanto terrestres como arborícolas (Ahmed *et al.*, 2009; Fuchs *et al.*, 2014). Es por esta razón que, los componentes del veneno de *P. regalis* son, desde el punto de vista toxinológico, interesantes. Desafortunadamente, a pesar de su amplia comercialización y facilidad de extracción de sus secreciones venenosas, la información sobre la composición química y funcional de sus toxinas es escasa. En este trabajo de investigación, se realizó un estudio dirigido del veneno de *P. regalis* con el fin de buscar toxinas peptídicas potencialmente útiles en el desarrollo de herramientas farmacológicas y/o biotecnológicas.

2. ANTECEDENTES

2.1 Importancia del estudio de toxinas de origen animal

Los animales venenosos son organismos que se distribuyen en diferentes clados en el reino animal y se caracterizan por sobrevivir en entornos hostiles donde son asediados continuamente por depredadores y por condiciones ambientales amenazantes [Figura 1]. De manera interesante, durante millones de años de evolución, estos animales han logrado diseñar, a partir de los componentes básicos de su metabolismo, compuestos orgánicos especializados que participan en diversos procesos claves en su vida como la alimentación, la defensa, la reproducción, la comunicación, la competencia, entre otras (Casewell *et al.*, 2013; Zhang, 2015). Estos compuestos orgánicos se denominan toxinas y son en su mayoría péptidos y proteínas codificados por genes que se expresan en glándulas especializadas, los cuales son secretados mediante mecanismos holocrinos y apocrinos en un líquido discreto conocido como veneno (Vassilevski *et al.*, 2009; Kuhn-Nentwig *et al.*, 2011; Harvey, 2014). Cada animal venenoso está dotado de un dispositivo anatómico conectado directamente con las glándulas especializadas, el cual es capaz de producir heridas que permiten el acceso al medio interno de quienes atacan, para administrar simultáneamente al veneno. Este proceso es conocido como envenenamiento y permite subyugar a sus presas y ahuyentar a sus depredadores (Lucas, 2015). Los componentes del veneno varían según la predisposición genética de los animales productores, las condiciones ambientales, la edad, el sexo, las especies de sus presas y depredadores, etc. Sin embargo, estos componentes actúan, de manera conjunta, alterando procesos fisiológicos en sus presas y/o depredadores para producir efectos sistémicos inmediatos [Figura 2]. Los principales sistemas afectados suelen ser el sistema nervioso central, el sistema circulatorio y el sistema inmunológico (Fry, 2005; Gonçalves-Machado *et al.*, 2016). Es importante agregar, que las toxinas actúan en conjunto de manera sinérgica alterando, con alta potencia y especificidad, distintas dianas biológicas de procesos fisiológicos determinados para producir los efectos toxicológicos durante el envenenamiento (Utkin, 2015).

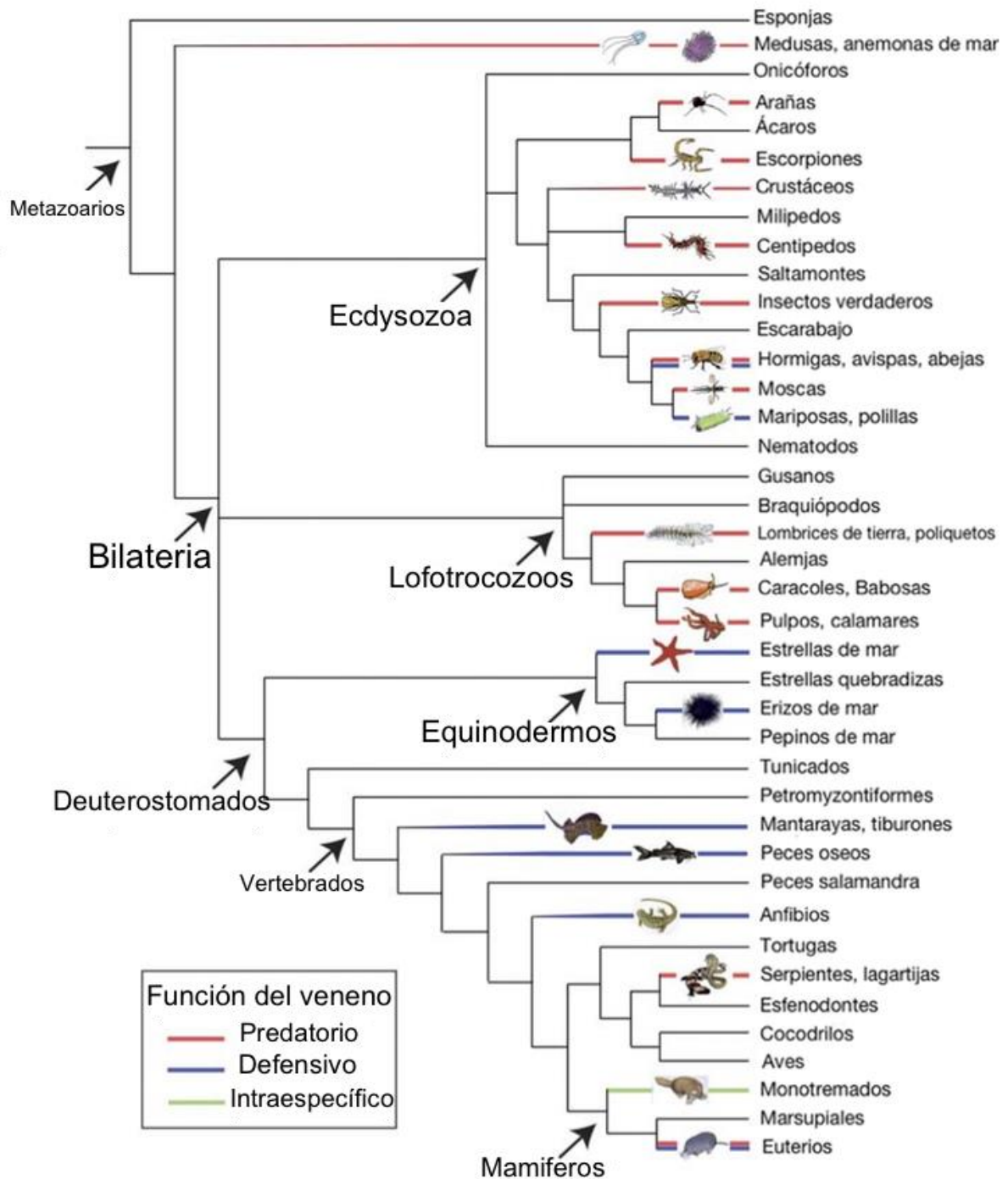


Figura 1. Esquema de la distribución de animales venenosos en el reino animal. Las ramas con color indican animales que cuentan con un sistema de inyección de veneno bien definido (modificado de Casewell *et al.*, 2013).

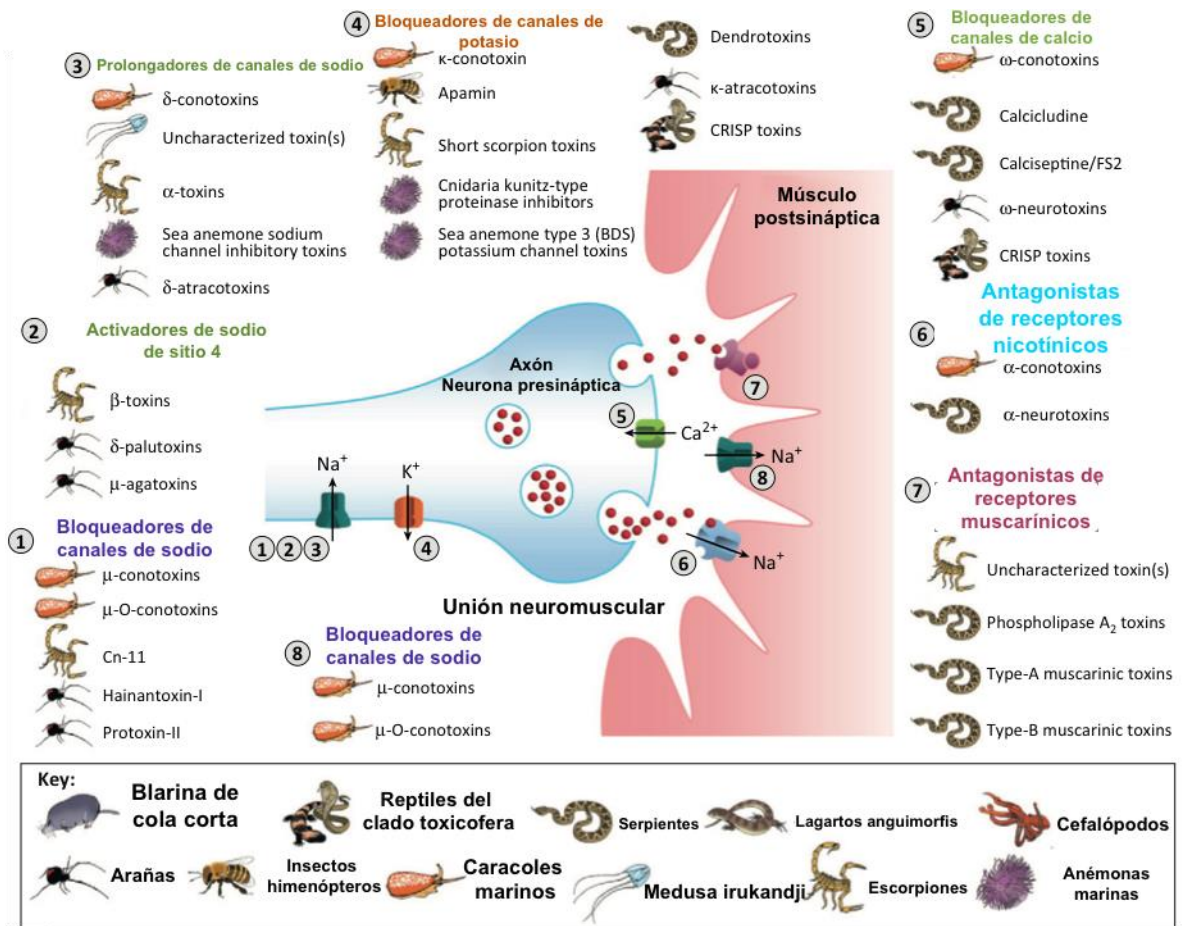


Figura 2. Convergencia de acción toxicológica. Las neurotoxinas purificadas del veneno de múltiples animales venenosos actúan en común sobre dianas biológicas expresadas por sus presas y depredadores (modificado de King, 2015).

De manera interesante, cuando las toxinas son separadas del veneno y analizadas de manera individual, pueden ser desarrolladas como herramientas farmacológicas útiles para investigar con más detalle los mecanismos fisiopatológicos involucrados en diversos padecimientos (Middleton *et al.*, 2002; Abdelhamid y Sluka, 2015; Zhang, 2015). De hecho, algunas toxinas han logrado conquistar el mercado farmacéutico y actualmente se cuentan con múltiples patentes en fase de experimentación clínica (King, 2011). Por otro lado, las técnicas analíticas actuales han impulsado significativamente el descubrimiento de nuevas características estructurales de las toxinas de venenos y, gracias a esto, se ha logrado adjudicar nuevas funciones a receptores fisiológicos de vertebrados (Guette *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2009; Osteen

et al., 2016). Además, gracias al uso de herramientas bioinformáticas se han determinado nuevos elementos fisiológicos denominados proteínas semejantes a toxinas, los cuales se ha comprobado que regulan mecanismos de señalización de algunos receptores fisiológicos. En concreto, las toxinas no sólo ofrecen un uso potencial en el desarrollo de medicamentos y compuestos con aplicación biotecnológica, sino que nos permiten caracterizar, clasificar y adjudicar nuevas funciones a receptores fisiológicos en el ser humano que anteriormente se desconocían (Fernández-Ballester *et al.*, 2011; Weiss *et al.*, 2011; Emery *et al.*, 2016).

2.2 Las tarántulas como animales venenosos

Las tarántulas (Filo: Arthropoda, Clase: Arachnida, Orden: Araneae, Suborden: Mygalomorphae, Infraorden: Opisthothelae, Familia: Theraphosidae), son una familia de animales venenosos que forma parte del mismo orden que las arañas y que hasta el momento cuenta con 962 especies descritas distribuidas en 144 géneros (Fernández-Montraveta y Moya-Laraño, 2007; Petersen *et al.*, 2007; Bond *et al.*, 2012).

Un rasgo particular de las tarántulas es su gran tamaño, algunas especies pueden alcanzar de 28 a 30 cm de longitud y pesar hasta 100 g, lo cual las contrasta significativamente con las arañas del suborden Aranomorphae, características por su tamaño milimétrico (Fernández-Montraveta y Moya-Laraño, 2007). Además, las tarántulas pueden ser clasificadas con base al entorno que habitan, como excavadoras o arborícolas. Las tarántulas excavadoras habitan madrigueras producidas regularmente debajo de la hojarasca y piedras, mientras que las arborícolas elaboran sus madrigueras en los árboles (Pérez-Miles *et al.*, 2015). Cabe destacar que, como producto de la evolución, las tarántulas han desarrollado estrategias de supervivencia y defensa. Por ejemplo, las tarántulas arborícolas presentan colores en su cuerpo que les permite camuflarse en los troncos de los árboles, o en algunos casos colores amenazantes para ahuyentar a sus depredadores, mientras que las tarántulas excavadoras presentan apéndices que les permiten elaborar sus madrigueras en el suelo con mayor facilidad (Gawryszewski

et al., 2017). Curiosamente, los colores extravagantes de algunas tarántulas arborícolas las hacen ser muy atractivas para los coleccionistas por lo cual, se han convertido en animales ampliamente comercializados en el mundo como mascotas ornamentales.

Con respecto a su anatomía, estos animales están conformados por dos secciones bien definidas denominadas prosoma y opistosoma, las cuales están posicionadas en el plano anterior y posterior respectivamente (Pérez-Miles *et al.*, 2015). Del prosoma se distinguen los primeros apéndices conocidos como quelíceros, de donde emergen un par de estructuras puntiformes compuestas de quitina densa llamadas colmillos [Figura 3B]. Estas estructuras componen al dispositivo de producción de heridas característico de los animales venenosos, el cual se cree que fue modificado a partir del primer par de apéndices. Así mismo, en el segmento par basal de cada quelíceros se encuentran dos glándulas especializadas para la producción de veneno, las cuales están conectadas a los colmillos (Vassilevski *et al.*, 2009) [Figura 3A]. Estos dispositivos son utilizados cuando se enfrentan a una presa o a un depredador con el fin de alimentarse o defenderse. Para esto, los colmillos son introducidos violentamente en una mordedura sobre la capa de quitina de sus presas o en la piel de sus depredadores, al mismo tiempo que liberan el veneno (Hoffmann, 1998).

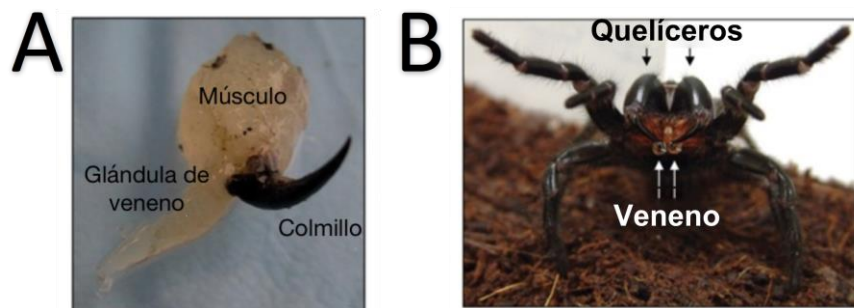


Figura 3. Glándula de veneno de *P. regalis*. **A)** La glándula de veneno está conectada discretamente a los colmillos. **B)** Los colmillos son una estructura rígida de quitina que se ubican en los quelíceros.

El veneno de las tarántulas consiste en una secreción líquida generalmente transparente, la cual contiene múltiples componentes capaces de alterar procesos fisiológicos del sistema nervioso con el fin de paralizar a sus presas o producir dolor en sus depredadores (Escoubas y Rash, 2004). Por lo que se refiere a su toxicidad, las tarántulas arborícolas producen síntomas de envenenamiento más prolongados y exacerbados con respecto a las tarántulas excavadoras (Fuchs *et al.*, 2014). Es importante mencionar, que hasta la fecha no se ha registrado la muerte como consecuencia de envenenamiento por mordedura de tarántulas en humanos. Sin embargo, el envenenamiento produce síntomas exacerbados como calambres musculares, dolor intenso y entumecimiento (Isbister *et al.*, 2003; Ahmed *et al.*, 2009; Fuchs *et al.*, 2014; Pouraghaei *et al.*, 2015).

2.3 Composición del veneno de tarántulas

El veneno de tarántulas está compuesto por múltiples compuestos orgánicos elaborados a partir de elementos básicos del metabolismo celular, de los cuales la mayoría son producidos únicamente en las glándulas especializadas. De acuerdo a su peso, los componentes del veneno son clasificados en toxinas de alto y bajo peso molecular (Dauly *et al.*, 2011; Palagi *et al.*, 2013; Touchard *et al.*, 2015; Quinton *et al.*, 2016). Por otro lado, estas mezclas producen efectos paralizantes en sus presas, interactuando sobre diferentes blancos involucrados en la contracción muscular, mientras que en vertebrados producen dolor (King, 2011, 2015). Así mismo, con el propósito de producir las manifestaciones del envenenamiento mencionadas, las toxinas deben actuar de manera dinámica y conjunta con sus receptores biológicos (Estrada y Corzo, 2007). Por otro lado, cabe mencionar que tanto la composición como la concentración de toxinas varía en virtud de múltiples factores como la edad, el sexo, la distribución, la variabilidad genética intraespecífica, entre otras. Sin embargo, estos estudios proteómicos y ecológicos son novedosos y existe escasa evidencia con respecto a venenos de tarántulas. De manera interesante, se ha comprobado que los venenos de arañas machos [Figura 4A] producen toxinas peptídicas que no se presentan en las hembras [Figura 4B], y los

cuales parecen ser de mayor interés debido a que se ha comprobado que algunos podrían estar involucrados directamente con el envenenamiento. Por lo tanto, con la finalidad de obtener un perfil amplio de la composición del veneno de una especie de tarántula, se debe tomar en consideración al sexo como un factor de variabilidad fundamental (Wilson, 2016).

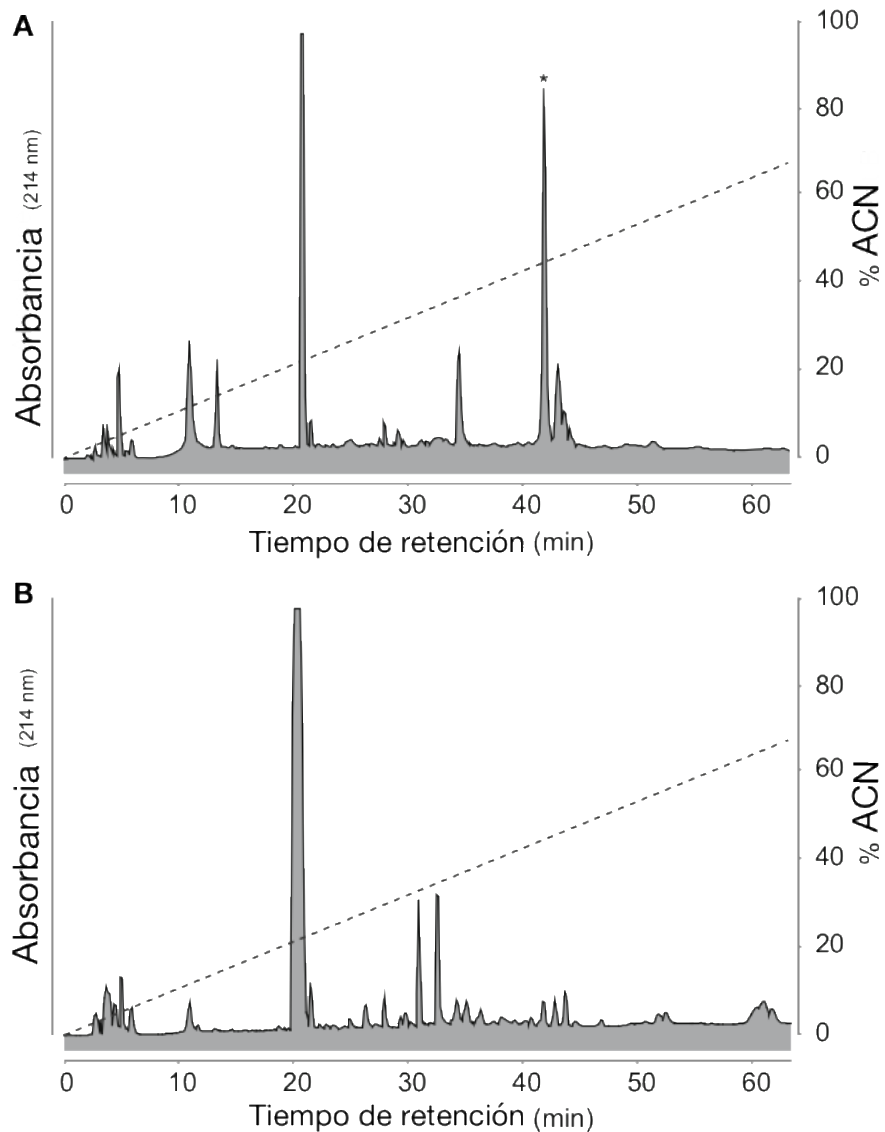


Figura 4. Cromatogramas de 'RP-HPLC' del veneno de hexatélidas **A)** machos y **B)** hembras de la especie *Atrax robustus*. Se emplearon condiciones estandarizadas de separación. *Denota el pico del péptido δ -HXTX-Ar1a, presente únicamente en el veneno de machos. Esta neurotoxina podría estar involucrada con los síntomas ocasionados por el envenenamiento (tomada de Wilson, 2015).

2.3.1 Toxinas de bajo peso molecular

Las toxinas de bajo peso molecular abarcan pesos menores a 1 kDa y están altamente conservadas en venenos de arañas (Orden: *Araneae*), aunque se expresan de manera diferencial en sus diferentes familias. Los compuestos que se han caracterizado son: i) acilpoliaminas, ii) análogos de nucleósidos, iii) bis(agmantin) oxalamidas, iv) alcaloides derivados de β -carbolina, v) compuestos organometálicos diazenarilicos, vi) análogos dioxopiperidínicos, vii) poliaminas, viii) ácidos inorgánicos, ix) sales inorgánicas y x) aminoácidos libres (Estrada-Gomez *et al.*, 2013) [Figura 5]. Particularmente, la familia *Theraphosidae* las produce discretamente en comparación con otras familias pertenecientes al suborden *Aranomorphae*, las cuales constituyen la mayoría de arañas verdaderas productoras de tela, en donde sorprendentemente también se han purificado algunos de estos componentes (Skinner *et al.*, 1990; Rash y Hodgson, 2001; Estrada-Gomez *et al.*, 2013). Por otro lado, estas toxinas han sido caracterizadas gracias a la información proporcionada por el uso de diversas técnicas analíticas que incluyen cromatografía multidimensional de líquidos de alta resolución, espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear. Desafortunadamente, debido a las limitantes analíticas, muchos investigadores se han enfocado en las toxinas de alto peso molecular, las cuales son más sencillas de caracterizar, mientras que las toxinas de bajo peso molecular, no se han estudiado sistemáticamente, desaprovechando el potencial biotecnológico de estos componentes (Nentwig, 2013; Matavel *et al.*, 2015). En relación a sus dianas biológicas, se ha determinado mediante técnicas electrofisiológicas su actividad sobre múltiples canales iónicos dependientes de ligando como los receptores pentaméricos de GABA_A (ácido γ -aminobutírico), receptores serotoninérgico, receptores tetraméricos de glutamato del tipo NMDA (N-metil-D-Aspartato), AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionico), kainato, una isoforma caracterizada en insectos denominada ibotenato cuya acción es inhibitoria, y finalmente sobre canales iónicos operados por voltaje de potasio K_v^+ , sodio Na_v^+ y calcio Ca_v^{+2} del tipo P y L, (Estrada-Gomez *et al.*,

2013; Kuhn-Nentwig *et al.*, 2011). Así mismo, se ha reportado que las actividades biológicas de las toxinas son, en su mayoría, inductoras de parálisis, proconvulsivantes y nociceptivas (Tedore *et al.*, 2015). Es importante mencionar, que para una gran parte de estas toxinas no se han caracterizado dianas determinadas y que las acilpoliaminas son las toxinas más estudiadas (Vassilevski *et al.*, 2009)

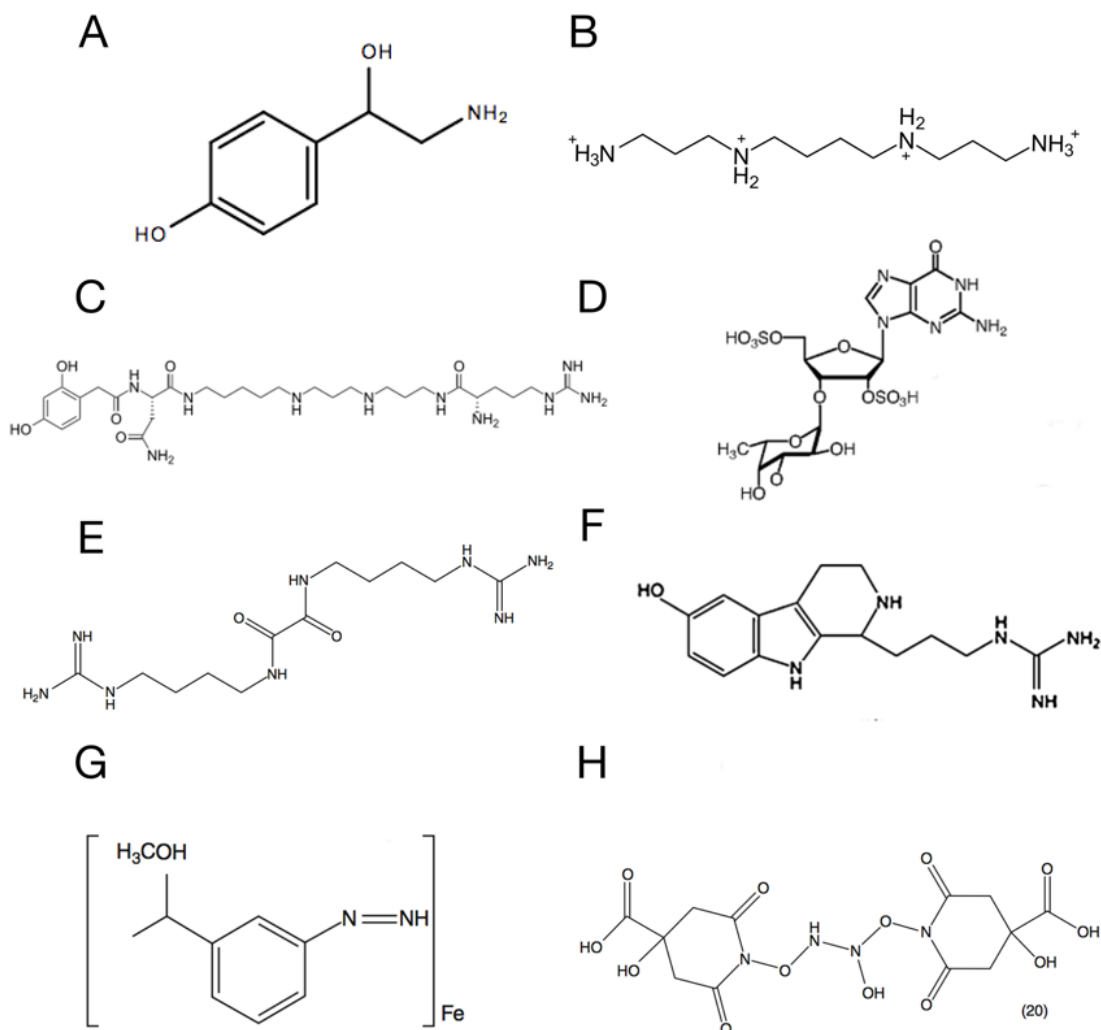


Figura 5. Compuestos de bajo peso molecular presentes en el veneno de arañas.

A) Amina biogénica (octopamina), **B**) Poliamina (espermina), **C**) Acilpoliamina (argiotoxinal), **D**) Nucleósidos modificados (2,5 disulfuro de guanosina), **E**) Bis-(agmantin)oxalamida (*N,N*-Bis(4-guanidinobutil)oxalamida), **F**) β -Carbolinas (Pw-Tx1), **G**) Diazenarílicos (1-(diazenilaril)etanol) y **H**) Dioxopiperidínicos (nigriventí).

2.3.2 Toxinas de alto peso molecular

Los péptidos y proteínas conforman a los componentes de alto peso molecular del veneno de tarántulas y de la mayoría de arañas. Estos, están codificados por genes expresados exclusivamente en glándulas especializadas para su producción y constituyen más del 90 % del peso del veneno (Liao *et al.*, 2007; Bordon *et al.*, 2012). Por su parte, los péptidos se caracterizan por poseer en su estructura primaria arreglos de aminoácidos que les provee de conformaciones claves para su acción biológica, mientras que las enzimas y proteínas actúan sobre estructuras clave de la matriz extracelular o potenciando el efecto de toxinas de bajo peso molecular respectivamente (King, 2015).

A. Enzimas

Las toxinas con actividad enzimática son componentes clave del veneno de tarántulas para desencadenar los efectos toxicológicos del envenenamiento (Kreil, 1995; Clement *et al.*, 2015; Cheng *et al.*, 2016). Así mismo, se ha determinado mediante técnicas como electroforesis y espectrometría de masas, que las enzimas y proteínas del veneno abarcan pesos moleculares que van desde 15 a 100 kDa. Desafortunadamente, los registros de las toxinas identificadas suelen ser confusos, debido a la facilidad de contaminación entre las secreciones venenosas y salivales, causadas por la cercanía anatómica que existe entre la zona preoral y los colmillos (Borges *et al.*, 2016). Además, existen factores de riesgo de contaminación inherentes a la bioeconomía de las secreciones venenosas, pues para compensar los volúmenes discretos producidos de estas secreciones, los investigadores se ven obligados a acumular los venenos de múltiples especímenes. En general, se han identificado enzimas y proteínas involucradas con el metabolismo celular, diversas proteasas que actúan sobre diversos aminoácidos, proteínas de adhesión y proteínas musculares, sin embargo, considerando su función se cree que son parte de la contaminación durante el proceso de extracción [Figura 6]. Por otro lado, existen componentes que fácilmente son detectados mediante técnicas como electroforesis, que permanecen sin ser caracterizados química o funcionalmente (Liao *et al.*, 2007).

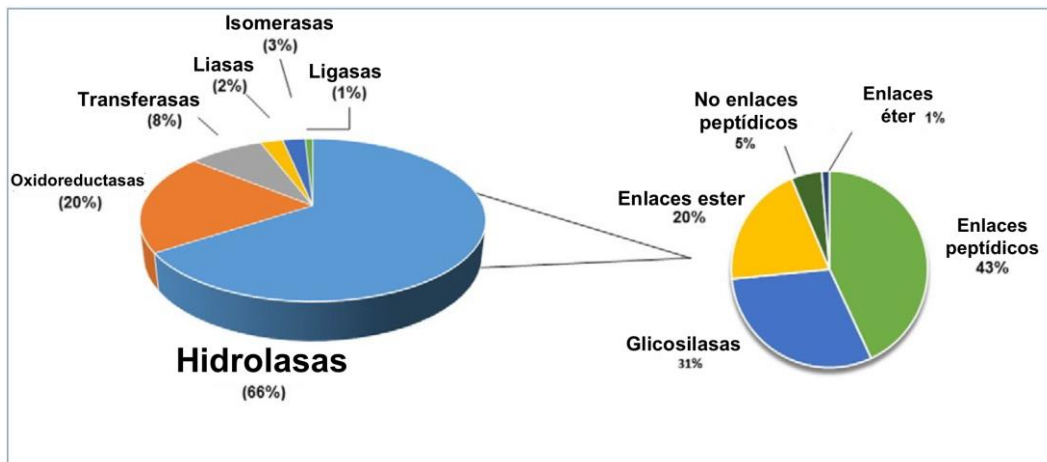


Figura 6. Clasificación de las proteínas identificadas en el veneno de *Grammostola inheringi*, con base en su actividad catalítica (modificado de Borges *et al.*, 2016).

Al contrario, las enzimas semejantes a hialuronidasas son los componentes más conservados de los cuales incluso se ha encontrado actividad en el veneno tanto de arañas como de tarántulas arborícolas y excavadoras mediante métodos turbidimétricos y de zimografía (Clement *et al.*, 2012; García-Arredondo *et al.*, 2015). En particular, estas toxinas hidrolizan el ácido hialurónico constituido por un polisacárido de unidades repetitivas de [ácido D-glucorónico (1- β -3) N-acetil-D-glucosamina (1- β -4)]. Este polímero se encuentra predominantemente en la matriz extracelular de los vertebrados, donde se sintetiza y forma soluciones espesas lo que proporciona viscosidad (Kemparaju *et al.*, 2006). Estas enzimas catalizan una reacción de transglicosilación produciendo tetra y disacáridos mediante la ruptura del enlace glicosídico (1- β -3) o (1- β -4) del ácido hialurónico presente en la matriz extracelular de vertebrados. Estas enzimas de entre 32 y 44 kDa, se han detectado también en venenos de víboras, serpientes, peces, avispas, escorpiones y arañas (Wahby *et al.*, 2012; Gunasekara *et al.*, 2017). En el veneno de la tarántula arborícola *Poecilotheria regalis* se ha determinado una actividad enzimática superior a la de los venenos de tarántulas terrestres. Es importante mencionar, que estas enzimas son consideradas como factores de dispersión debido a su acción propagadora que actúa sobre blancos de sus depredadores, por lo cual constituyen también un componente defensivo del veneno (Rodríguez-Rios *et al.*, 2017)

B. Péptidos

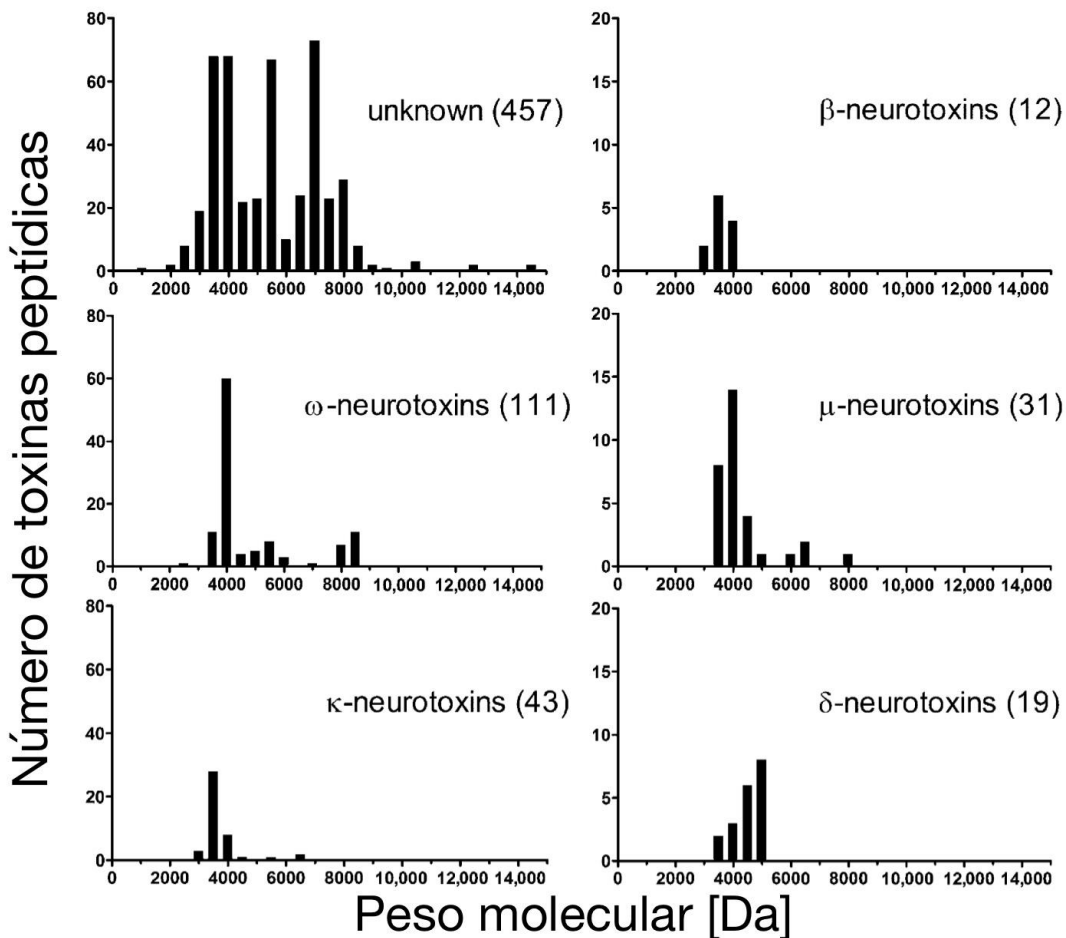
Los péptidos presentes en el veneno de tarántulas, también conocidos como toxinas peptídicas, constituyen los componentes de mayor abundancia. De manera puntual, se ha determinado mediante cromatografía de líquidos de alta resolución y espectrometría de masas que en promedio cada tarántula produce 700 péptidos, lo cual contrasta con la cantidad de enzimas y proteínas (Kozlov *et al.*, 2006; Lau *et al.*, 2016). Estas toxinas se caracterizan por abarcar pesos moleculares desde 1 a 8 kDa y están conformadas por estructuras conservadas denominadas nudos inhibitorios de cistina (ICK: inhibitor cystine knot), que les proveen de resistencia a ambientes físicos y químicos hostiles (Mourão *et al.*, 2013; Park *et al.*, 2014; Kikuchi *et al.*, 2015) [Figura 7]. Otra característica a resaltar, es que los péptidos se encuentran presentes en el veneno con variantes muy discretas en su secuencia primaria lo cual les dota de características fisicoquímicas similares. No obstante, se cree que estas variaciones no son producto de 'splicing alternativo' sino de un proceso de duplicación y divergencia genética que han producido modificaciones en la estructura primaria a partir de un gen ancestral, posiblemente como una estrategia para aumentar su población de presas y contrarrestar los mecanismos evolutivos de sus depredadores (Casewell *et al.*, 2013; Pineda *et al.*, 2014a; Dugon, 2015).

Con respecto a su función, estas toxinas actúan modificando las cinéticas de activación e inactivación de canales iónicos operados por voltaje de sodio Na_v^+ , potasio K_v^+ y calcio Ca_v^{2+} , y como bloqueadores de poro o modificadores de potencial de activación de algunos otros receptores como los canales sensibles a ácido (ASICs: acid sensing ion channels), purinérgicos de ATP (P2X) y receptores de vanilloides de potencial transitorio (TRPV: transient receptor potential vanilloid) (Bohlen *et al.*, 2010; Saez *et al.*, 2011; Min *et al.*, 2013; Tao *et al.*, 2013; Franceschini y Adinolfi, 2014; Harvey, 2014). Es importante mencionar, que estas toxinas actúan sobre sus blancos a partir de concentraciones nanomolares e incluso logran identificar a sus blancos biológicos entre diferentes isoformas, lo cual difiere con las de metabolitos secundarios purificados de plantas y microorganismos (Cardoso *et al.*, 2015). De manera sorprendente, cuando los péptidos son estudiados individualmente, pueden ser útiles en el campo de la biotecnología en virtud su alta

potencia y especificidad (Grishin *et al.*, 2010; King, 2011; Gui *et al.*, 2014; Saez *et al.*, 2011, 2010).

Desafortunadamente, a pesar de la relativa facilidad de extracción del veneno en tarántulas, menos del 9 % de las especies descritas han sido caracterizadas, por lo cual resta cerca de 608,000 variantes de péptidos por analizar (Herzig *et al.*, 2011). Por esta razón, se considera al veneno de tarántulas como una biblioteca de química combinatoria de péptidos (Olivera *et al.*, 1995; Sollod *et al.*, 2005).

Figura 7. Distribución de péptidos de acuerdo a su peso molecular, presentes en el veneno de múltiples tarántulas y arañas. El número en paréntesis refleja los



registros (modificado de Kuhn–Nentwig *et al.*, 2011).

Con la finalidad de conocer con detalle los péptidos purificados del veneno de tarántulas, los investigadores los exploran, mediante las técnicas de dicroísmo

circular y resonancia magnética nuclear, determinando estructuras secundarias y terciarias respectivamente. De esta manera, se logra clasificar a los péptidos ya caracterizados funcionalmente con base en sus dianas biológicas y, mediante técnicas bioinformáticas y de química computacional, se adjudican posibles funciones a aquellas que aún no han sido caracterizadas (Fernández-Ballester *et al.*, 2011; Herzig y King, 2015).

En cuanto a la información actual sobre los péptidos purificados del veneno de tarántulas, se ha comprobado que poseen un motivo estructural altamente conservado denominado nudo inhibidor de cistina 'ICK' o plegamiento de nudo (knot folding). De manera puntual, este motivo está compuesto por tres puentes disulfuro que enlazan a 3 β -plegadas antiparalelas. Estos puentes son producidos por la oxidación de 6 grupos funcionales sulfhidrilo provenientes de 6 residuos de cisteínas del péptido, los cuales están distribuidos específicamente en la estructura primaria con un consenso: C^I-C^{IV}, C^{II}-C^V y C^{III}-C^{VI}, desde el extremo amino al carboxilo terminal (Domingues *et al.*, 2015; King, 2015) [Figura 8A, E]. Así mismo, con el fin de provocar un espacio químico apropiado para la formación de los puentes disulfuro, el resto de los aminoácidos forman parte de la estrategia que conduce al plegamiento que dará lugar, tanto a la cercanía de los residuos para la formación del nudo inhibitorio, como al componente de unión a su diana biológica (Pineda *et al.*, 2014a), [Figura 8 C y D].

Por otro lado, se ha comprobado mediante mutagénesis sitio dirigida que la formación de este nudo inhibitorio le provee a los péptidos de resistencia a diversas proteasas y estabilidad en condiciones de temperatura alta. De hecho, se ha confirmado que existen toxinas con estabilidad en suero de humano hasta por 12 días, y que han presentado vida media prolongada en fluidos gástricos simulados, por lo cual las convierte en herramientas de investigación farmacológica interesantes (Saez *et al.*, 2010; Zhang, 2015).

Adicionalmente, se han encontrado otras estructuras que, aunque con registros muy limitados, promueven el conocimiento de estos péptidos. Las horquillas β -DDH son un motivo estructural que carece de nudo inhibidor de cistina y el cual está conformado por una horquilla beta antiparalela estabilizada por dos puentes

disulfuro. Su secuencia consenso consta de C^I-C^{III}, C^{II}-C^V, C^{IV}-C^{VI}. Este motivo estructural se caracteriza por tener 3 puentes disulfuro y, a diferencia de los motivos 'ICK', no se encuentran dos residuos de cisteína contiguos, por lo que se consideran péptidos laxos con mayor susceptibilidad a ser degradados (Saez *et al.*, 2015) [Figura 8C, F]. Es importante mencionar, que estos motivos se encuentran predominantemente en el orden *Araneae* y, en menor proporción, en la familia *Theraphosidae*. Debido a esto, algunos investigadores proponen que este motivo estructural es un punto de inflexión en la evolución de los nudos inhibitorios de cistina y que definen a las estructuras 'ICK' actuales (Casewell *et al.*, 2013). Por otro lado, también se han encontrado otras estructuras conservadas como el dominio inhibitor de Kunitz, también denominado inhibidor de tripsina pancreático bovino (BPTI: bovine pancreatic trypsin inhibitor), el cual pertenece a una familia de inhibidores de proteinasas, ricos en residuos de cisteína, cuyo marco de lectura en su estructura primaria se caracteriza por tener la unión de 3 puentes disulfuro, mediante residuos de cisteína en: C^I-C^{VI}, C^{II}-C^{IV}, C^{III}-C^V y un plegamiento consenso α - β , denominado motivo Kunitz, el cual constituye el dominio responsable de la inhibición de serina proteasas como: tripsina, quimiotripsina, catepsina y plasmina (King, 2015) [Figura 8B].

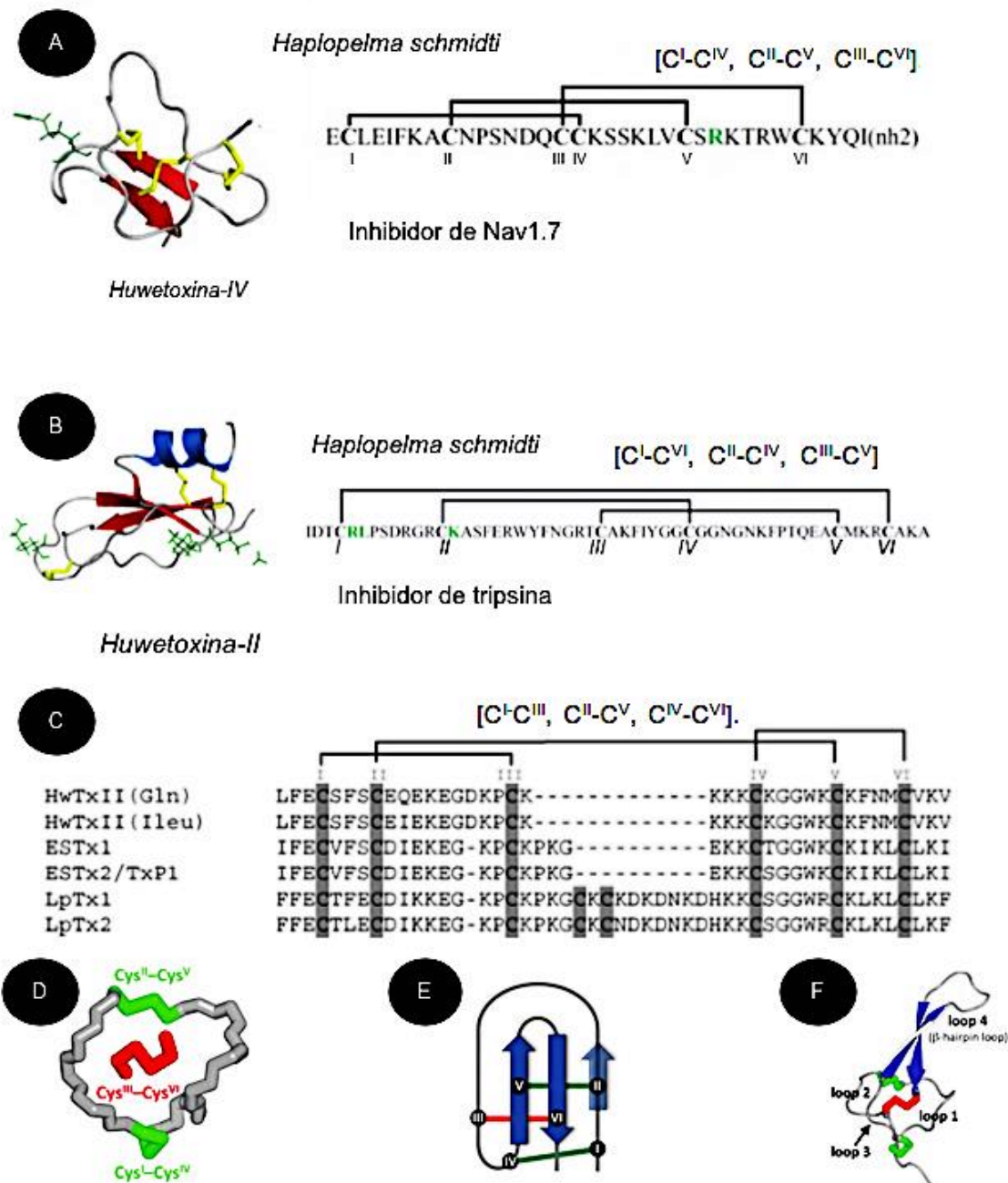


Figura 8. Estructuras conservadas de péptidos purificados del veneno de tarántulas. **A)** Nudo inhibidor de cistina ‘ICK’, **B)** dominio inhibidor de ‘Kunitz’, **C)** 6 secuencias de toxinas de tarántulas con motivos estructurales de horquilla β dirigido por disulfuro ‘DDH’, **D)** estructura tridimensional del nudo de cistina, **E)** estructura secundaria del nudo inhibidor de cistina (las líneas en verde y rojo representan los puentes disulfuro), **F)** estructura secundaria del arreglo del asa β-hairpin presentes en un nudo ICK (modificado de Escoubas & Rash 2004; Saez *et al.*, 2010; King, 2015).

Otra característica interesante de las toxinas peptídicas es que son producidas en variantes discretas que pueden diferenciarse por la secuencia de aminoácidos en su estructura primaria, y que les permite ejercer funciones similares sobre regiones y conformaciones diferentes de sus blancos biológicos. De esta manera, se pueden encontrar en el mismo veneno una variedad tanto de péptidos agonistas como antagonistas de un receptor en particular. Así mismo, se ha propuesto que las variantes mencionadas son producidas por un proceso evolutivo, el cual asemeja al diseño basado en receptor usado en química medicinal. Estas variantes se generan induciendo cambios mínimos en las secuencias señales y propeptídicas del rRNA maduro, los cuales forman al péptido y son indispensables para su síntesis y maduración [Figura 9].

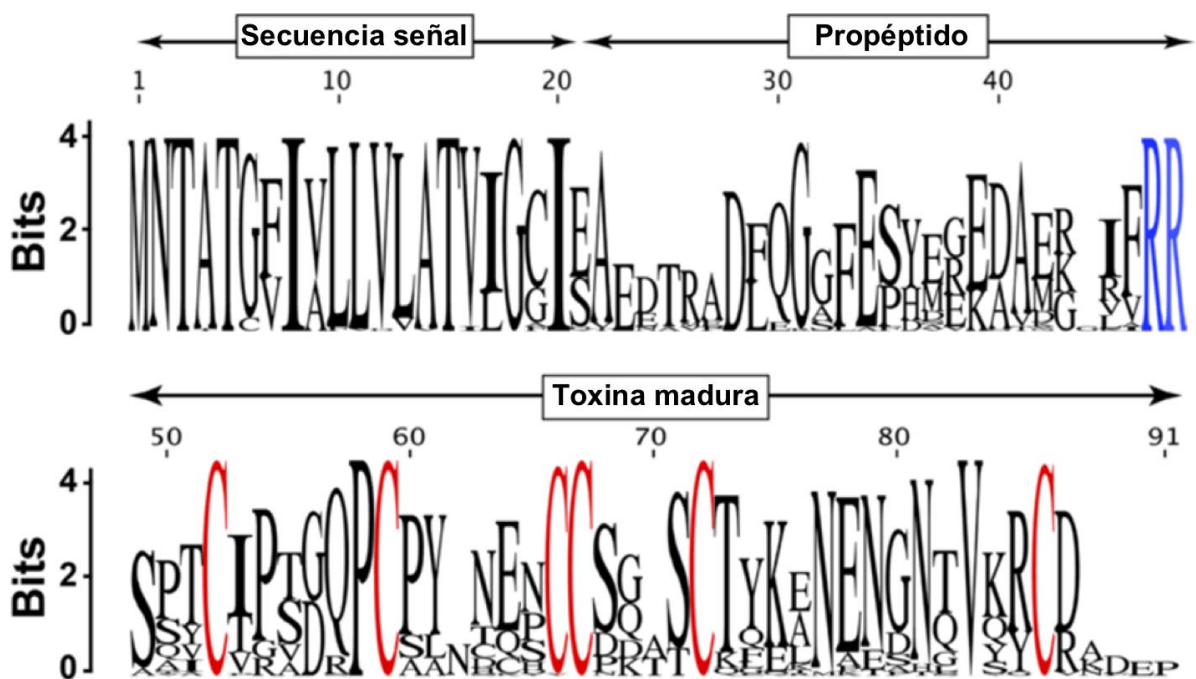


Figura 9. Arquitectura de las toxinas peptídicas purificadas de diversas especies de Hexatélidas. Las toxinas se componen por una secuencia señal, un propéptido y la toxina madura, (modificado de Pineda *et al.*, 2014a).

Además, esta hipótesis evolutiva explica la razón por la cual se producen péptidos que se adaptan a las diferencias estructurales de los blancos en común, inherentes

al genoma de las diversas especies de presas que incluye su dieta. En concreto, los venenos de tarántulas son una fuente de péptidos con potencial aplicación biotecnológica y, gracias al proceso coevolutivo de sus presas y depredadores, son considerados como una librería combinatoria de péptidos (Casewell *et al.*, 2013; Pineda *et al.*, 2014a; Allcock, 2015; Kerckamp *et al.*, 2015; Haney *et al.*, 2016).

2.4 Efectos principales de los venenos de tarántulas

La función primordial del veneno es producir parálisis y dolor. Estos efectos son causados por los péptidos que actúan sobre blancos fisiológicos clave, involucrados en dichos procesos. Generalmente, los canales iónicos, operados por voltaje, de sodio Na_v^+ , de potasio K_v^+ y de calcio Ca_v^{2+} , son los receptores más relevantes de las toxinas peptídicas debido a su función reguladora en la formación y propagación del potencial de acción, que comunica a las neuronas del sistema nervioso de manera altamente efectiva (Cunha, 2013; Cherki *et al.*, 2014).

Para llevar a cabo la contracción muscular, la placa neuromuscular juega un papel fundamental en la formación de los potenciales de acción que se propagan a través de la membrana de las neuronas presinápticas y la membrana sarcoplásmica. Al ser estimulados eléctricamente, los canales iónicos dependientes de voltaje de sodio en las neuronas presinápticas, cambian su estado conformacional de cerrado a abierto, permitiendo el flujo de iones sodio. De esta manera, una alta concentración de estos iones es transportada desde el espacio extracelular al espacio intracelular, cambiando el potencial electroquímico de la membrana hasta el estado conocido como despolarización. Dicha despolarización es proporcional al número de canales iónicos operados por voltaje de sodio estimulados y, al repolarizarse nuevamente la membrana plasmática, modifican su conformación de abierto a inactivo, impidiendo el flujo de iones. Simultáneamente, al producirse la despolarización de la membrana plasmática, los canales iónicos operados por voltaje de potasio modifican su conformación del estado cerrado a activo, permitiendo de esta manera la salida de iones potasio del espacio intracelular al espacio extracelular, con el propósito de reestablecer el potencial electroquímico hasta un estado conocido como repolarización. Durante este estado, los canales iónicos dependientes de voltaje de

sodio cambian su conformación de inactivo a reposo, y sólo en este último estado es que pueden ser estimulados nuevamente, cumpliendo con el ciclo que produce y propaga el potencial de acción. Una vez que se lleva a cabo la propagación del potencial sobre la membrana sarcoplásmica, los canales iónicos operados por voltaje de calcio estimulan el aumento de la concentración de este catión en el músculo, lo cual tiene como consecuencia la contracción muscular, que se mantiene o culmina según el grado de aumento o disminución de dicho ion. Por otro lado, la nocicepción involucra el transporte de impulsos eléctricos a lo largo y a través de neuronas predeterminadas en donde los componentes de la propagación del potencial de acción son semejantes a los expuestos anteriormente. En este proceso, la transmisión sináptica se produce entre neuronas del sistema nervioso aferente y eferente, haciendo relevo en el asta dorsal de la médula espinal. En contraste con el mecanismo comentado anteriormente, la propagación del potencial de acción estimula la actividad de canales iónicos operados por voltaje de calcio, localizados estratégicamente en las neuronas, lo cual permite la entrada de calcio desde el espacio extracelular hasta el espacio intracelular, donde dirige la fusión de membranas vesiculares con la membrana plasmática, a partir de proteínas que modifican su conformación al coordinar al ion calcio. La fusión de las vesículas con la membrana plasmática da como resultado la liberación de neurotransmisores, los cuales permitirán la propagación o inhibición del potencial de acción en las neuronas postsinápticas, dependiendo de si el neurotransmisor liberado es excitatorio o inhibitorio (Bohlen *et al.*, 2010; Tang *et al.*, 2010; Weiss *et al.*, 2011, Hill *et al.*, 2012, Flórez *et al.*, 2013).

Los mecanismos de acción de las toxinas peptídicas sobre los canales iónicos operados por voltaje, se ha estudiado, utilizando diversas técnicas, incluyendo electrofisiología y flurimetría, y se ha determinado que este tipo de toxinas actúa como bloqueadores de poro y modificadores de las propiedades eléctricas 'gating modifiers' (Kaczorowski *et al.*, 2008; Lau *et al.*, 2016). Los bloqueadores de poro actúan como antagonistas, inhibiendo el paso de los iones a través del poro del canal, mientras que los modificadores de las propiedades eléctricas actúan modificando las cinéticas de activación e inactivación de estos canales (Balaji *et al.*, 2000). De esta

manera logran inhibir o estimular la propagación del potencial de acción sobre la membrana pre y post sináptica respectivamente. La parálisis muscular producida por las toxinas peptídicas, es consecuencia de la inhibición de la propagación del potencial de acción en un proceso conocido como parálisis flácida, y en contraste puede ser provocada por una sobre estimulación del potencial de acción que induce al proceso que conoce como parálisis tetánica. Así mismo, los péptidos actúan sobre isoformas específicas de los canales de sodio, potasio y calcio, así como de otras dianas que se han caracterizado sobre las membranas presinápticas de neuronas nociceptoras: canales TRPV1a (Transient Receptor Potential Vanilloid 1a), canales ASIC1a (Acid Sensing Ion Channel 1a) [Figura 10 **A** y **B**] y receptores P2X (Purinergic receptor), mismos que son permeables tanto a iones de sodio y calcio, contribuyendo a la formación del potencial de acción en la transmisión sináptica de estas neuronas (Bohlen *et al.*, 2010; Grishin *et al.*, 2010; Saez *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2015).

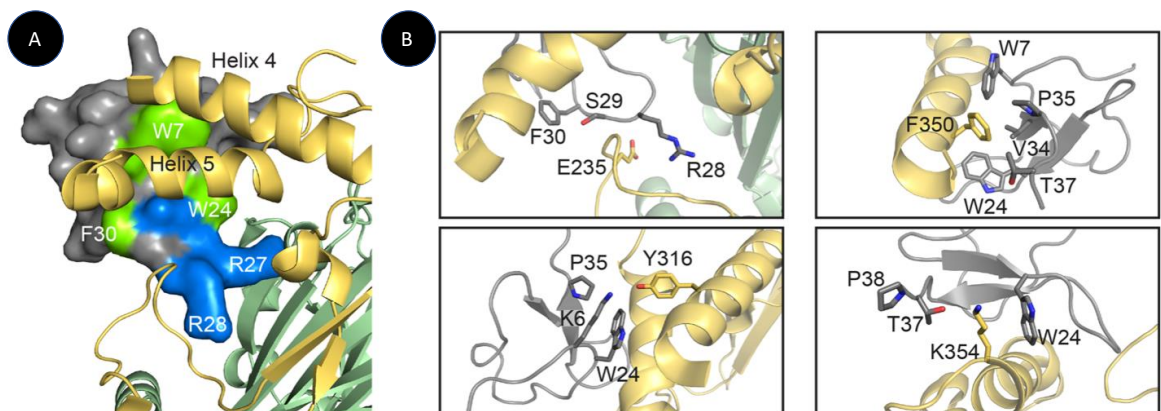


Figura 10. A) Representaciones tridimensionales de la superficie molecular de la toxina peptídica PcTx1 interactuando con el bolsillo ácido del receptor ASIC1a. **B)** Diferentes perspectivas de unión al ligando. Los aminoácidos señalados están involucrados en el espacio químico que produce la especificidad por el receptor, (modificado de Saez *et al.*, 2015).

Antes de la caracterización electrofisiológica de los péptidos contenidos en los venenos, no existía un consenso estricto con relación a la nomenclatura de las toxinas, las cuales eran denominadas en remembranza a la especie de la cual fue purificada, y en algunos casos en honor a sus descubridores. Sin embargo, el

profesor Glenn King publicó un artículo en 2008, proponiendo un nuevo sistema de clasificación, el cual incluye la descripción de los péptidos en virtud de su familia filogenética, su actividad biológica, su especificidad, su género, su especie y su homología con otros péptidos. Con respecto a los péptidos presentes en el veneno de tarántulas, estos son clasificados conforme a su función biológica como μ , β y δ , para las toxinas que modulan la actividad de canales iónicos de sodio operados por voltaje, κ para canales iónicos de potasio operados por voltaje, ω para canales iónicos de calcio operados por voltaje, π para los canales iónicos sensibles a ácido y U para aquellas que producen efectos biológicos sin un blanco definido. Con relación a la familia a la cual pertenecen, son denominados ‘theraphotoxins’ (Familia: Theraphosidae). Es importante mencionar, que algunos péptidos pueden actuar de manera promiscua sobre dianas biológicas diferentes. Por esta razón, se ha propuesto que la clasificación incluya a ambos descriptores de acción biológica (King *et al.*, 2008) [Figura 11]

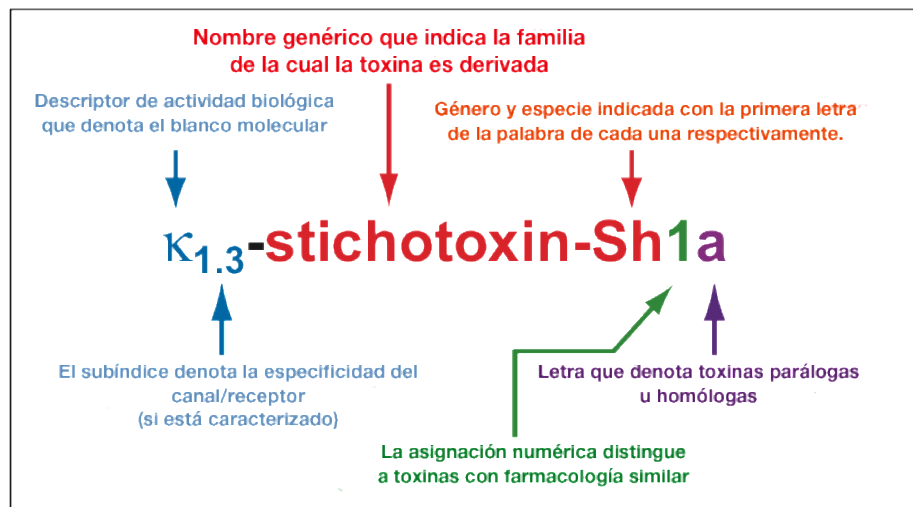


Figura 11. Esquema de la nomenclatura de toxinas peptídicas propuesta por Glenn King en 2008 (modificado de King *et al.*, 2008).

2.5 Métodos de extracción y almacenamiento de veneno de tarántulas

Gracias al tamaño de las tarántulas, la extracción de su veneno, proceso también conocido como ordeña o recolección, resulta ser más sencillo. Actualmente, los

métodos más comunes son los denominados mordedura espontánea y estimulación eléctrica (Celerier *et al.*, 1993; Balaji *et al.*, 2000; Sutti *et al.*, 2014) [Figura 12 **A** y **B**]. En la técnica de mordedura espontánea se requiere amedrentar al animal para que éste tome la posición de ataque y exponga sus quelíceros. Así, mediante un capilar se toma el volumen de veneno que es eyectado de los colmillos cada vez que el animal es atacado, con objetos en movimiento que confunden con sus presas. Sin embargo, la mordedura espontánea resulta el método más peligroso y menos efectivo, debido a que el proceso de recolección es complicado y no se obtiene el volumen total de secreción. Por el contrario, en la técnica de estimulación eléctrica el animal es previamente anestesiado e inmovilizado, lo cual permite obtener la mayor cantidad de veneno sin correr el riesgo de ser mordido por los especímenes. En esta técnica, una vez que los animales son inmovilizados, se estimula eléctricamente la zona parabasal de los quelíceros mediante un par de electrodos conectados a una fuente eléctrica que produce descargas con voltaje y frecuencia específicos sobre los músculos que rodean a la glándula, lo cual induce su contracción y liberación de las secreciones venenosas, mismas que son simultáneamente recolectadas (Rocha-e-Silva *et al.*, 2013).

Con el fin de preservar y almacenar los venenos, se recomienda su almacenamiento como liofilizado. Sin embargo, algunos laboratorios diluyen las secreciones en agua grado HPLC con una solución de 0.1 % de ácido trifluoroacético (v/v) o de glicerol, para posteriormente congelarse a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Ono *et al.*, 2011; Palagi *et al.*, 2013).



Figura 12. Métodos de extracción de veneno. **A)** Estimulación eléctrica y **B)** Mordida espontánea.

2.6 Aplicaciones prácticas de péptidos purificados del veneno de tarántulas

Un rasgo interesante de los venenos de tarántulas, es que exhiben su potencia toxicológica exclusivamente cuando sus componentes actúan en conjunto. Así mismo, cuando estos son separados por métodos cromatográficos y analizados individualmente, no producen los síntomas del envenenamiento en comparación con el veneno crudo. Debido a la alta especificidad y potencia de los componentes del veneno y a los mecanismos de acción involucrados en su actividad biológica, es posible desarrollar múltiples aplicaciones biotecnológicas (Chaim *et al.*, 2011). De manera adicional, los péptidos son los componentes más estudiados, en virtud de la dinámica de interacción sobre sus blancos biológicos. Dentro de la misma secreción, se pueden encontrar variantes discretas de péptidos que pueden exhibir un efecto contrario o semejante, mediante mecanismos alternos (Pineda *et al.*, 2014b). Por estas razones, la investigación de venenos de tarántulas se ha transformado de la elaboración de antivenenos y faboterápicos, en la búsqueda de péptidos como herramientas biotecnológicas útiles (Calvete *et al.*, 2009; Gonçalves-Machado *et al.*, 2016; Quinton *et al.*, 2016).

2.6.1 Aplicaciones de péptidos como herramientas farmacológicas

Las dianas biológicas de las toxinas peptídicas se encuentran distribuidas en los organismos de sus presas y depredadores en variedades que cuentan con un alto porcentaje de homología (Mourão *et al.*, 2013). Sin embargo, las mínimas diferencias en su estructura primaria las dotan de características diferenciales tanto estructurales como electrofisiológicas. De este modo, existen isoformas de cada una de estas dianas, dependiendo del fenotipo de cada célula excitable, las cuales se expresan de diferente manera (Gilchrist y Bosmans, 2012; Klint *et al.*, 2015; Zamponi *et al.*, 2015). Actualmente, se han caracterizado 9 isoformas de canales iónicos de sodio operados por voltaje, una gran variedad de canales iónicos de potasio operados por voltaje, producidos por 75 genes y, al menos, 5 subtipos con múltiples variedades de canales iónicos de calcio operados por voltaje (Deng *et al.*, 2014; Berecki *et al.*, 2016). De manera interesante, las características químicas y funcionales de los

péptidos purificados de veneno de tarántulas permiten discriminar específicamente a las variantes de sus dianas biológicas, de tal forma que son utilizados como herramientas farmacológicas en ensayos diseñados para dilucidar los mecanismos de acción de otros péptidos o moléculas (Cardoso *et al.*, 2015; Prashanth *et al.*, 2017).

Entre las toxinas que pueden ser utilizadas como herramientas farmacológicas, se encuentra la toxina π -theraphotoxin-Pc1a, purificada de la tarántula cabría de Trinidad *Psalmopoeus cambridgei*, la cual actúa directamente como bloqueador en el bolsillo ácido con su estructura consenso de β -hairpina, en los canales sensibles a ácidos ASIC1a. En la actualidad, esta toxina es la única molécula capaz de interactuar con este receptor con alta potencia y especificidad. La toxina π -theraphotoxin-Pc1a se caracteriza por poseer una estructura primaria con 40 aminoácidos que opera a partir de una concentración de ~ 1 nM, logrando discriminar con alta especificidad a otras isoformas a concentraciones de hasta 50 nM. Es importante mencionar, que gracias al estudio *in silico* de esta toxina, se han logrado dilucidar nuevos estados conformacionales del receptor (Saez *et al.*, 2015). Por otro lado, en el veneno de la misma tarántula se ha purificado un péptido denominado toxina de doble nudo DkTx: Double Knot Toxin, el cual estimula la conformación activa del canal TRPV1a, mediante la interacción con dos de las cuatro unidades formadoras de poro. A su vez, esta toxina podría utilizarse como herramienta farmacológica en la búsqueda de inhibidores de isoformas del mismo canal (Bohlen *et al.*, 2010). De igual modo, se han encontrado toxinas capaces de modular canales iónicos de sodio operados por voltaje como la toxina μ -theraphotoxin-Tp1a, purificada de la tarántula de terciopelo verde de Perú *Thrixopelma pruriens*, la cual es capaz de inhibir selectivamente la isoforma Na_v1.7, a partir de una concentración de 220 nM, utilizando la toxina nativa y a unidades de concentración μ M, empleando las toxinas recombinantes y sin modificaciones postraduccionales (Cardoso *et al.*, 2015). Por lo que se refiere al estudio de canales iónicos de potasio operados por voltaje, es importante mencionar que uno de los impedimentos de caracterizar nuevos receptores, es la escasa variedad de agonistas y antagonistas disponibles. Sorpresivamente, se han encontrado péptidos purificados de veneno de tarántulas

que logran interactuar con isoformas específicas, tal es el caso del péptido β -theraphotoxin-Cj1 α , purificado del veneno de la tarántula cervatillo de China *Chilobrachys guangxiensis*, cuya caracterización funcional se describió en un principio como regulador de canales iónicos de sodio operados por voltaje específicos a la variante Nav1.5 (Rong *et al.*, 2011). Sin embargo, estudios posteriores determinaron la existencia de una secuencia conservada entre esta variante y el canal iónico de potasio operado por voltaje isoforma Kv2.1, por lo cual se describió a esta toxina peptídica como promiscua con la capacidad de interactuar con ambas variantes a partir de concentraciones μ M semejantes (Tao *et al.*, 2016). Así mismo, es importante mencionar que no se han encontrado inhibidores de éstas u otras variantes de canales iónicos de sodio, que actúen con la especificidad que ofrecen los péptidos purificados del veneno de tarántulas. A su vez, la toxina ω -theraphotoxin-Hg1a, purificada de la tarántula roja de Camerún *Hysteroocrates gigas*, actúa bloqueando selectivamente a canales iónicos de calcio dependientes de voltaje del tipo R, a partir de concentraciones de 15 a 30 nM, sin tener actividad sobre otras isoformas (Newcomb *et al.*, 1998; Klint *et al.*, 2015).

2.6.2 Descubrimientos concomitantes a la aplicación biotecnológica de péptidos

El uso de toxinas peptídicas como herramientas de investigación ha permitido la determinación de nuevas características estructurales y funcionales de sus principales dianas biológicas, lo cual ha conducido al descubrimiento de su participación en nuevos procesos fisiológicos, así como a la búsqueda racional de agonistas y antagonistas (Pimentel *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2015). Esto ocurre en virtud de la interacción química que se produce cuando se une un ligando a su receptor, lo cual ha conducido a la determinación de nuevos estados conformacionales y a la identificación de características estructurales que hacen diferentes a las isoformas. Un descubrimiento interesante, es el de la toxina π -theraphotoxin-Pc1a, cristalizada con el receptor ASIC1a, la cual ha permitido, mediante técnicas *in silico*, dilucidar un nuevo estado conformacional del estado activo del receptor (Saez *et al.*, 2015). Además, es importante mencionar que los registros electrofisiológicos producidos al administrar la toxina en neuronas

nociceptoras, han ayudado a identificar el rol de este receptor en la transmisión sináptica del dolor (Duan *et al.*, 2007). Adicionalmente, la información proporcionada sobre el espacio químico aportado por la toxina, conduce al descubrimiento racional de nuevas moléculas con propiedades semejantes a fármacos, las cuales podrían proponerse para la investigación en el desarrollo terapéutico de fármacos analgésicos (Fernández–Ballester *et al.*, 2011). Por otro lado, se han encontrado péptidos con actividad cruzada entre distintas dianas, como la toxina β -theraphotoxin–Cj1 α , la cual actúa sobre estructuras conservadas donde convergen los canales iónicos, operados por voltaje, de potasio K_v2.1 y de sodio Na_v1.5. Así mismo, mediante mutagénesis sitio dirigida en la toxina, se han determinado los aminoácidos de la estructura primaria del receptor que hacen específica a cada una de las isoformas (Tao *et al.*, 2016). De este modo, modificar la estructura primaria de este péptido podría permitir diseñar toxinas que actúen específicamente sobre cada una de las isoformas caracterizadas de estas dianas. Por otro lado, dentro de las toxinas mencionadas en el apartado anterior, resalta el péptido de doble nudo inhibitorio de cistina DkTx que interactúa específicamente sobre el receptor TRPV1a (Bohlen *et al.*, 2010). Es importante mencionar, que gracias a esta toxina se logró determinar la importancia de los aminoácidos que tapizan la unidad formadora de poro en uno de sus estados conformacionales activos y que podrían ser clave para producir inhibidores de estos receptores que, junto a los ASICs, son dianas interesantes en la investigación terapéutica del dolor (Liao *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2014; Abdelhamid y Sluka, 2015).

2.7 Tarántula ornamental de la India, *Poecilotheria regalis* (Pocock, 1899).

La tarántula ornamental de la India *Poecilotheria regalis*, (Filo: Arthropoda, Clase: Arachnida, Orden: Araneae, Suborden: Mygalomorphae, Infraorden: Opisthothelae, Familia: Theraphosidae, Subfamilia: Poecilotheriinae, Género: *Poecilotheria*, Especie: *regalis*), también conocida como tarántula rey paracaidista o tarántula real paracaidista, es una tarántula arborícola endémica del sur de India que se distribuye en los estados de Andhra Pradesh, Tamil Nadu, Karnataka, Maharashtra y Kerala, en una superficie de 50,000 m² [Figura 13]. Fue descrita por Pocock en 1899, aunque

anteriormente estaba clasificada dentro de la subfamilia *Ornithoconinae* como *Ornithoconus gadgili*, la cual forma parte de su sinonimia (World Spider Catalog, 2017).

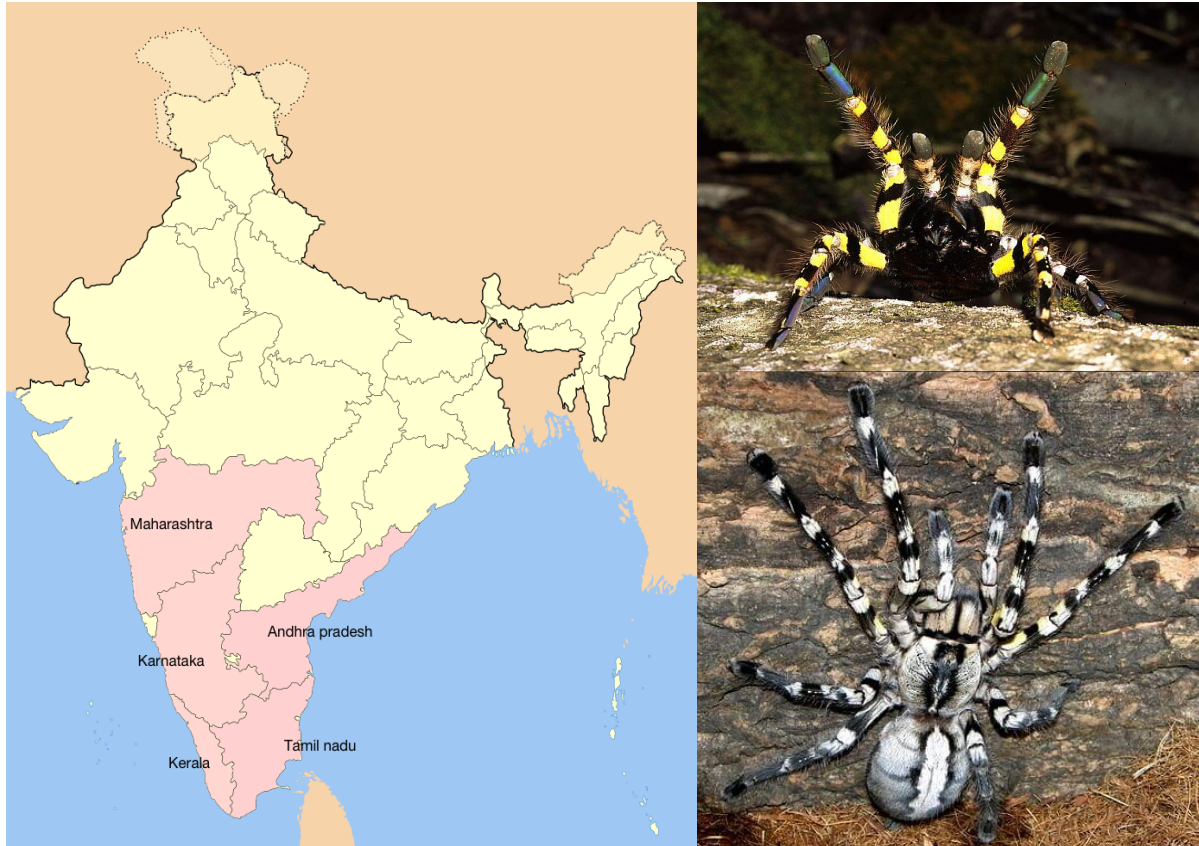


Figura 13. Distribución geográfica de la tarántula *P. regalis*. En la imagen se denota en color rosa los estados del sur de la India donde se distribuye; a la derecha un espécimen hembra en su hábitat natural.

Una característica interesante de esta especie, es que es ampliamente comercializada a nivel mundial entre los coleccionistas, a pesar de que se ha reportado como una tarántula que produce una mordedura con síntomas de envenenamiento que resaltan sobre otras tarántulas arborícolas (Fuchs *et al.*, 2014). Cabe señalar que la sintomatología del envenenamiento en el ser humano incluye dolor, eritema, inflamación, calambres musculares mantenidos y entumecimiento, desde la zona de la mordedura hasta el resto de la extremidad, por lo cual resalta el interés bioquímico de su veneno (Andreev-Andrievskiy *et al.*, 2017). Sin embargo, la información recabada sobre los componentes de sus secreciones venenosas se

limita a la identificación de enzimas semejantes a hialuronidasas, mientras que la información sobre la identidad de sus toxinas peptídicas permanece sin ser estudiada (Rodríguez-Rios *et al.*, 2017).

2.8 Técnicas empleadas en venómicas

La toxinología, mejor conocida como biología de toxinas o toxinas medicinales, es una disciplina científica que se enfoca en la caracterización química, funcional, dilucidación de mecanismos de acción biológicos, farmacología de péptidos y al estudio de los efectos toxicológicos producidos por productos purificados de plantas, microorganismos, animales venenosos o ponzoñosos. Así mismo, al conjunto de técnicas usadas en la biología de toxinas que estudia las secreciones venenosas, se conoce como venómicas, e incluyen técnicas destinadas a la separación de toxinas del veneno, así como algunas que aportan información sobre la estructura primaria y la función biológica de toxinas purificadas del veneno o de las secreciones venenosa (Zhang, 2015) [Figura 14].



Figura 14. Estrategias analíticas en el descubrimiento de toxinas, basadas en venómicas; las tecnologías empleadas en conjunto derivan en el descubrimiento de toxinas interesantes a partir de cantidades ínfimas de veneno, (modificado de King, 2015).

2.8.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida 'Tricine SDS-PAGE'

Con el objeto de obtener un perfil general de las toxinas peptídicas y proteínicas presentes en el veneno de tarántulas, se emplean técnicas que permiten visualizar específicamente a estos componentes. En toxinología, la electroforesis en gel de poliacrilamida con amortiguadores de tricina 'Tricine SDS-PAGE': 'Tricine sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel-electrophoresis', es una herramienta primordial para dicho análisis, ya que se pueden diferenciar fácilmente ambos componentes (péptidos y proteínas) con respecto a su peso molecular. En concreto, esta técnica lleva a cabo la separación de péptidos y proteínas, mediante un procesamiento previo del veneno, el cual consiste en desnaturalizar, cargar y teñir a los péptidos y proteínas. Así mismo, una vez procesado, el veneno es embebido en una matriz

tamizada de poliacrilamida que es sometida a un campo eléctrico, la cual provoca la migración de las toxinas cargadas hacia el ánodo. Finalmente, durante esta migración, las toxinas peptídicas y las proteínas quedan retenidas en una zona específica de la matriz que, comparándole con estándares de proteínas previamente caracterizadas, permite identificar su peso molecular aproximado (Kavoosi y Ardestani, 2012).

2.8.2 Cromatografía de líquidos de alta resolución en fase reversa 'RP-HPLC'

El objetivo principal, previo al análisis químico y funcional, es la separación de las toxinas analitos del veneno matriz. Para este propósito, se utilizan métodos estandarizados, diseñados a partir de las características fisicoquímicas de las toxinas blanco. En particular, la técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución en fase reversa 'RP-HPLC': 'Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography', es primordial para la separación de péptidos presentes en venenos, por lo cual es ampliamente utilizada en las venómicas. En síntesis, el proceso se lleva a cabo mediante la interacción de una fase móvil polar, en la cual está disuelta el veneno, con una fase estacionaria apolar que, al penetrar sobre esta a alta presión, provoca que los péptidos queden adsorbidos mediante interacciones hidrofóbicas y puedan ser separados lenta y simultáneamente por el gradiente (polar-apolar). Durante la elución, los péptidos son detectados como picos gracias al enlace peptídico que los compone y que también funge como cromóforo, mismo que absorbe energía a una longitud de onda de 210 nm. Un punto importante a considerar, es que debido a las variedades discretas de los péptidos presentes en el veneno, se produce un fenómeno conocido como coelución, por lo cual la purificación de péptidos conlleva al uso de fases estacionarias con distinta composición (Aguilar, 2017).

2.8.3 Espectrometría de masas 'MALDI-TOF'

Una vez que se lleva a cabo la separación mediante 'RP-HPLC', es importante identificar si los picos cromatográficos eluidos corresponden a péptidos purificados o

a una mezcla. Para realizar esta identificación, se emplean técnicas enfocadas en la determinación del peso molecular. Puntualmente, la técnica de ionización por desorción laser asistida por matriz, acoplada a un detector de tiempo de vuelo 'MALDI-TOF': 'Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight', es la más utilizada en toxicología y permite revelar perfiles tanto de las fracciones separadas del veneno, como del extracto venenoso. En resumen, la determinación se lleva a cabo cuando la muestra es cocrystalizada con una matriz e incidida por un haz de láser a cierta frecuencia que permite la ionización y desorción de él o los componentes. Posteriormente, estos se desplazan con ayuda de su carga a través de un tubo hermético hacia el detector de tiempo de vuelo. Así, el peso molecular es determinado en proporción directa a la relación masa-carga, la cual es proporcionada por el tiempo que tardan estos iones desde su ionización hasta alcanzar al detector. A su vez, los espectros que se obtienen durante el análisis se tratan de líneas proporcionales al número de péptidos ionizados y su intensidad se basa en el número de iones que rozan o colisionan con el detector (Hoffmann y Stroobant, 2007).

2.8.4 Cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a espectrometría de masas en *tándem* 'LC-ESI-Q-TOF-MS'

Para generar un perfil exhaustivo de las toxinas peptídicas presentes en el veneno de tarántulas, se determina parcialmente la estructura primaria de péptidos presentes, ya sea en una mezcla o individualmente. Con el fin de determinar parte de su secuencia primaria, se emplean técnicas que logran separar y acondicionar a estos componentes, con el fin de determinar parte de su secuencia primaria. Particularmente, la técnica de cromatografía de líquidos acoplada a un sistema de espectrometría de masas de ionización por electroespray con detectores de cuatropolos y tiempo de vuelo 'LC-ESI-Q-TOF-MS': 'Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Quadrupole-Time Of Flight-Mass Spectrometry', logra dichos objetivos y, con algunas modificaciones en cuanto al sistema de fragmentación y al principio de detección, es el sistema fundamental para secuenciar

parcialmente toxinas peptídicas y proteínicas en toxicología. En concreto, el principio de la técnica se basa en la reconstrucción de espectros de masas de múltiples fragmentos provenientes de un péptido con el fin de determinar parcialmente su estructura primaria. En primer término, los péptidos son previamente acondicionados en un medio químico o enzimático que permite producir múltiples fragmentos de manera altamente específica. Posteriormente, estos fragmentos son separados por cromatografía y ionizados en una interfase que los conduce a un gradiente de voltaje y temperatura que los carga y evapora durante su recorrido. Después, estos iones son dispersados en partículas cargadas hacia el primer detector que los deflecta con base en sus propiedades eléctricas con el fin de seleccionarlos y desviarlos hacia la cámara de fragmentación, donde partículas de gases inertes colisionan con los enlaces peptídicos, de manera que se forman productos de estos fragmentos. En seguida, estos productos son conducidos al segundo detector donde se obtienen los espectros de masas, los cuales al analizarse permiten caracterizar secciones de la secuencia primaria de un péptido en particular [Figura 14]. Además, herramientas como 'MASCOT' o 'SEQUEST' relacionan bases de datos con el objeto de identificar a partir de estas secuencias, péptidos o proteínas reportadas previamente (Steen y Mann, 2004).

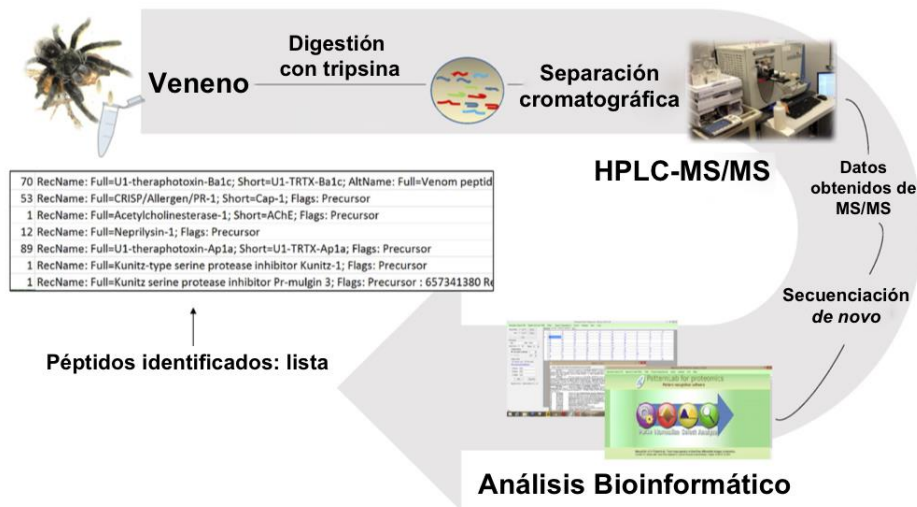


Figura 15. Diagrama de flujo empleado en la búsqueda de toxinas peptídicas con potencial biotecnológico del veneno de *G. inheringi* (tomado de Borges *et al.*, 2016).

2.8.5 Ensayos de toxicidad

Las toxinas están diseñadas para actuar primariamente sobre receptores de invertebrados. Sin embargo, es trascendental determinar si los efectos tóxicos son semejantes en modelos de animales vertebrados, considerando sus aplicaciones en las diversas áreas de la investigación. Por otro lado, comparar la letalidad de los extractos venenosos en modelos de invertebrados también resulta interesante, debido a las hipótesis evolutivas y a los descubrimientos recientes con respecto a sus transcriptomas. En general, los ensayos de toxicidad de veneno de tarántulas se basan en el peso de los animales de experimentación y en la cantidad de proteína del extracto venenoso que se administra para determinar su dosis letal media (Hu *et al.*, 2014).

Por otro lado, el uso de animales vivos permite hacer evaluaciones toxicológicas tomando en cuenta múltiples parámetros en condiciones fisiológicas que no se pueden realizar en ensayos *in vitro* o *ex vivo*. La rata es el animal de experimentación más empleado para estos ensayos, aunque se han empleado a otros animales como perros, conejos, gatos y puercos. Dependiendo del sistema de liberación y administración de las toxinas en cuestión, los investigadores pueden monitorear la presión arterial, el ritmo cardíaco y respiratorio, entre otros. Por ejemplo, la actividad del péptido natriurético aislado del veneno de la serpiente *Pseudocerastes persicus* fue determinado mediante el uso de animales íntegros (King, 2015).

3 JUSTIFICACIÓN

Las tarántulas son una familia de arañas que, con el fin de adaptarse a sus ecosistemas, administran tanto a sus presas como a sus depredadores, secreciones venenosas constituidas por un arsenal bioquímico, diseñado para actuar sinérgicamente, alterando procesos fisiológicos predeterminados evolutivamente. Sin embargo, a pesar de inducir efectos nocivos en conjunto, cuando los componentes son separados y analizados individualmente, pueden ser utilizados para el desarrollo de aplicaciones biotecnológicas útiles. Entre estos destacan las toxinas peptídicas, las cuales se presentan en múltiples variantes discretas que proveen al veneno de una biblioteca combinatoria de péptidos y lo convierten en una fuente potencial de compuestos bioactivos.

Por otro lado, debido a que la mordedura de las tarántulas no representa un peligro significativo para los humanos, muchas especies arborícolas se comercializan ampliamente en cautiverio como mascotas exóticas en todo el mundo. En especial, la tarántula *Poecilotheria regalis*, produce un potente veneno que utiliza como estrategia para adaptarse a su difícil ritmo de alimentación. Además, esta especie presenta la ventaja de que su gran tamaño facilita la extracción de veneno, de tal modo que es posible realizar extracciones consecutivas sin necesidad de sacrificar especímenes. Por lo tanto, en virtud de la necesidad de adaptarse a una dieta diferente, esta tarántula se considera bioquímicamente interesante y, aunque existen registros de actividad enzimática en su veneno, la identidad y la caracterización química de sus toxinas peptídicas permanecen sin ser estudiadas.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es la identidad de las principales toxinas peptídicas presentes en el veneno de la tarántula *Poecilotheria regalis*?

5. HIPOTESIS

El efecto biológico de las toxinas peptídicas presentes en el veneno de *P. regalis* puede ser inferido a través de su homología con péptidos purificados de otros animales venenosos previamente caracterizados química y funcionalmente.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo principal

Identificar las principales toxinas peptídicas presentes en el veneno de la tarántula arborícola *P. regalis*.

6.2 Objetivos específicos

1. Obtener las secreciones venenosas producidas por especímenes machos y hembras de la tarántula *P. regalis*, mediante la técnica de estimulación eléctrica.
2. Determinar la concentración de proteína en la secreción venenosa de la tarántula *P. regalis*, mediante la técnica colorimétrica de ácido bicinconínico 'BCA'.
3. Establecer las condiciones óptimas de separación de las toxinas peptídicas presentes en el veneno de machos y hembras de la especie *P. regalis*, mediante la técnica de cromatografía de líquidos 'RP-HPLC'.
4. Determinar la distribución de peso molecular de los componentes proteínicos y peptídicos del veneno de especímenes machos y hembras de la especie *P. regalis*, mediante las técnicas de electroforesis 'Tricine SDS-PAGE', cromatografía de líquidos 'RP-HPLC' y espectrometría de masas 'MALDI-TOF'.
5. Establecer las diferencias entre la concentración y composición de los componentes del veneno de especímenes machos y hembras de *P. regalis* mediante las técnicas de 'Tricine SDS-PAGE', 'RP-HPLC' y 'MALDI-TOF'.
6. Caracterizar parcialmente la secuencia primaria de las fracciones de toxinas peptídicas más representativas del veneno de especímenes hembras de la especie *P. regalis*, mediante la técnica acoplada de cromatografía de líquidos y espectrometría de masas en *tandem* 'RP-HPLC-ESI-MS/MS'.

7. Analizar las secuencias de aminoácidos obtenidas *de novo* mediante el uso conjunto de recursos bioinformáticos 'ExPASy' y bases de datos genómicas, transcriptómicas y proteómicas.
8. Determinar la dosis letal media del veneno de especímenes hembras de *P. regalis* en un modelo de vertebrado y un modelo de invertebrado, mediante ensayos de toxicidad, empleando un ajuste de dosis no lineal.
9. Determinar el daño en riñón y pulmón producido por la administración de las secreciones venenosas de especímenes hembras de tarántulas de la especie *P. regalis* en ratones, mediante cortes histológicos y tinciones diferenciales.

7. METODOLOGÍA

7.1 Obtención y mantenimiento de tarántulas de la especie *Poecilotheria regalis*

Las tarántulas de la especie *P. regalis* de ambos sexos fueron adquiridas en los criaderos oficiales: Tarántulas de México® (SEMARNAT-UMA-IN-0062-JAL), en la unidad de manejo para la conservación de la vida silvestre ARACHNIDA® (DGVS-PIMVS-CR-IN-0977-DV08), y en el arcnario de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro (CITES/DGVS-CR-IN-0619-QRO/00), mismos que cuentan con registros de especiación y determinación de género. Las tarántulas fueron mantenidas individualmente en jaulas altas de polimetilmetacrilato con fibra de coco molida como sustrato y un recipiente para agua, con el propósito de mimetizar su hábitat natural. Las tarántulas fueron alimentadas cada 15 días con grillos *Acheta doméstica*, además de agua purificada *ad libitum*.

7.2 Extracción de veneno

Con el fin de extraer el veneno, las tarántulas de la especie *P. regalis* fueron anestesiadas con una solución concentrada de isoflurano, para posteriormente colocarse en una superficie adecuada, inmovilizándolas con ligas de goma entrelazadas para la estimulación eléctrica y recolección de veneno. Las puntas de los colmillos se colocaron cuidadosamente alrededor de la boca de un tubo para microcentrifuga de 2 mL de capacidad previamente pesado, con la finalidad de evitar posible contaminación con saliva de la zona preoral. Después, con ayuda de dos electrodos humedecidos con solución amortiguadora de corrida, se aplicaron estímulos eléctricos de 15 V en los quelíceros durante 20 segundos en intervalos de 2 segundos, utilizando una fuente de poder para electroforesis (Bio-Rad 164-5050). Una vez obtenido el veneno, el tubo fue centrifugado e inmediatamente fue pesado y almacenado en un ultracongelador a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Por último, el peso del veneno líquido, obtenido en la extracción, fue calculado por la diferencia en masa. Es importante mencionar, que este procedimiento fue realizado mensualmente, adaptándose al lapso de tiempo necesario para la producción de estas secreciones por el animal.

7.3 Liofilización

Para llevar a cabo el proceso de deshidratación del veneno, se utilizó un equipo de liofilización 'FreeZone 4.5 L Benchtop' marca Labconco®. La muestra de veneno se congeló en un ultracongelador 'Irilab 800' marca Angelatoni® a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se liofilizó.

7.4 Cuantificación de proteína

El veneno fue disuelto en 0.4 mL de agua grado HPLC (J.T. Baker). El contenido de proteína del veneno de cada extracción se determinó mediante el método de ácido bicinconínico 'BCA', descrito por Smith (1985), utilizando albúmina sérica bovina (Bio-Rad) como estándar.

7.5 Electroforesis en gel de poliacrilamida 'Tricine-SDS-PAGE'

Con el propósito de analizar la complejidad del veneno de tarántulas hembras y machos de *P. regalis*, se empleó la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida, empleando la solución amortiguadora de tricina 'Tricine-SDS-PAGE', bajo los métodos convencionales previamente descritos en condiciones reductoras y no reductoras (Laemmli, 1970). Estos análisis se realizaron utilizando geles de poliacrilamida a diferentes concentraciones (12–18 %) con tricina como solución amortiguadora de corrida, los cuales fueron sometidos a una corriente de 120 V durante aproximadamente 2 h. Las bandas de proteína se visualizaron mediante la técnica de tinción de Coomassie. Se emplearon marcadores de peso molecular de amplio espectro (Bio-Rad, Cat # 161–0318).

7.6 Cromatografía de líquidos de alta resolución en fase reversa 'RP-HPLC'

El veneno, producto de la extracción de múltiples especímenes de tarántulas de la especie *P. regalis* previamente separadas según su sexo, fue sometido a un proceso de separación por HPLC en fase reversa. Se prepararon volúmenes de inyección de 20 μL a una concentración de 12.5 μg de proteína/ μL disueltos en agua grado HPLC (J.T. Baker). Tomando como modelo métodos de separación previamente establecidos para otros venenos de otras tarántulas (Cardoso *et al.*, 2015), el

fraccionamiento cromatográfico del veneno de *P. regalis*, se llevó a cabo utilizando una columna de fase reversa C18 (Waters® 250 mm x 4.6 mm, 5 µm; Symmetry, CA, USA). Para la composición de la fase móvil se utilizó un gradiente de fase A (Agua en 0.1 % ácidotrifluoroacético) y fase B (90 % acetonitrilo, 10 % agua en 0.09 % ácidotrifluoroacético), utilizando una pendiente proporcional a 0.5 % de solución B/min. El programa utilizado fue compuesto por un flujo isocrático de 3 minutos de solución A y un gradiente que alcanza el 45% de la fase B en 93 minutos con un flujo constante de 1 mL/min. Las fracciones eluidas fueron detectadas a una longitud de onda de 215 nm y recolectadas en tubos de polipropileno para microcentrifuga de 2 mL.

7.7 Espectrometría de masas 'MALDI-TOF-MS'

Tanto las fracciones recolectadas como las secreciones venenosas, fueron tratadas con filtros 'ZIP-TIP' C18 con el propósito de remover la mayor cantidad de sales, y posteriormente fueron analizadas utilizando MALDI-TOF-MS (Ultraflex, Bruker Daltonics, Bremen, Alemania). El proceso de ionización se llevó a cabo por irradiación con un láser de nitrógeno a 337 nm con un voltaje de aceleración de 20 kV. La matriz empleada fue de ácido sinapínico a una concentración de 10 mg/mL. Para analizar las fracciones obtenidas por 'RP-HPLC', 1 µL fue diluido en un mismo volumen de matriz. Los datos fueron obtenidos utilizando el software 'Bruker Daltonics Flexcontrol' (Bremen, Alemania). Todos los análisis fueron realizados en modo reflector.

7.8 Secuenciación parcial 'RP-HPLC-ESI-MS/MS'

Las fracciones de péptidos 6, 8 y 23 separadas por 'RP-HPLC' del veneno de *P. regalis*, fueron sometidas a un proceso de digestión con tripsina, reducción con ditioneitol (DTT) y alquilación con iodoacetamida. Los péptidos resultantes del tratamiento fueron inyectados en un sistema LC-MS constituido por un cromatógrafo de líquidos de micro-flujo 'Accela' (Thermo-Fischer Co. San Jose, CA) con 'splitter' (1/20) acoplado a un espectrómetro de masas 'LTQ-Orbitrap Velos' (Thermo-Fischer Co., San Jose, CA) con sistema de ionización tipo nano-electrospray (ESI). Para el

sistema de cromatografía de líquidos se utilizó un sistema gradiente de 10-100 % de solvente B (acetonitrilo/ácido acético 0.1 %) en 120 minutos sobre una columna capilar 'PicoFrit Proteopep 2 C18 75 µm ID × 50 mm' (New Objective Inc., Woburn, MA). El flujo del sistema LC fue de 400 nanolitros/minuto. Para la fragmentación de los péptidos se utilizaron los métodos de CID (Collision-Induced Dissociation) y HCD (High Energy Collision Dissociation). La ejecución y captura de los datos de fragmentación fueron realizados de forma dependiente del escaneo total de iones siguiendo las cargas predeterminadas con un ancho de aislamiento de 3.0 (m/z), energía de colisión normalizada de 35 unidades arbitrarias, activación Q de 0.250, tiempo de activación de 40 ms y tiempo máximo de inyección de 10 ms por micro-escaneo. Los espectros de líneas obtenidos fueron sometidos a la base de datos 'MASCOT' y las secuencias fueron alineadas en bases de datos especializadas para animales del orden *Araneae* 'ARACHNOSERVER' (Herzig *et al.*, 2011).

7.9 Ensayos de toxicidad

Con la finalidad de obtener parámetros farmacológicos más completos que ayuden a estimar el grado de toxicidad del veneno de *P. regalis* en comparación con otros venenos, se evaluó su toxicidad en ratones y en larvas de mosca *Drosophila melanogaster*. Para realizar los ensayos toxicológicos se preparó una mezcla de varias extracciones de veneno de *P. regalis*, a fin de contar con cantidades suficientes de proteína. Se evaluó la toxicidad en larvas de mosca (*Drosophila melanogaster*) de 2.34 mg y en ratones (*Mus musculus*) de 12 g, siguiendo el método previamente reportado por Herzig *et al* (2008). Para esto, se inyectó el veneno, disuelto en 30 µL de solución salina para insectos (pH 7.2; NaCl 200 mM, KCl 3.1 mM, 2 mM NaHCO₃, 4 mM MgCl₂, 5.4 mM CaCl₂, 0.1 mM Na₂HPO₄) a diferentes concentraciones (0.002, 0.02, 0.2 y 2 µg de proteína) en el segmento abdominal A6 con un capilar pulido milimétrico y un equipo de inyección de nanolitros. Se realizaron 100 inyecciones para cada concentración de veneno y se contó el número de muertes en cada concentración después de 5 días de la administración. Así mismo, se determinó también la toxicidad del veneno de *P. regalis* en ratones machos CD1 de 12 g de peso mediante inyección intraperitoneal a diferentes dosis de proteína (0.2,

1.3, 1.33, 2.0, 6.3 y 20 μg de proteína/g de peso corporal). Cada dosis de proteína se disolvió en 0.1 ml de solución salina fisiológica esterilizada (NaCl al 0.9 %). Las muertes que ocurrieron durante las primeras 24 horas después de la administración del extracto fueron registradas para calcular la dosis letal media (DL_{50}) mediante un ajuste no lineal. Los ratones sobrevivientes, incluyendo a los controles a los que se les administró solamente la solución salina, se observaron por un periodo de 24 horas antes de sacrificarlos por dislocación cervical. Tanto a los animales que murieron por la administración del veneno, como a los que se sacrificaron por dislocación cervical a las 24 horas de la administración, se les extrajeron inmediatamente los pulmones y los riñones. Estos órganos, una vez extraídos, se fijaron en una solución de formol al 10 % durante 2 a 3 días a 4 °C. Las muestras de los diferentes tejidos se deshidrataron, utilizando concentraciones graduales de alcohol etílico en agua (70, 80, 90, 96 %), para después embeberlas en parafina. Se realizaron cortes de 5 a 6 μm mediante un micrótomo manual, los cuales fueron teñidos mediante la técnica de hematoxilina-eosina para ser examinadas con un microscopio de luz.

8. RESULTADOS

8.1 Extracción del veneno

El veneno de tarántulas de la especie *P. regalis* es una secreción amarilla densa de la cual se obtuvo un volumen aproximado de 100 μL (8.7 ± 2.7 mg de líquido/espécimen). Tomando en consideración que el 90 % del veneno está compuesto por péptidos y proteínas, se determinó la concentración de proteína del veneno, la cual fue de 5.9 ± 0.7 % de peso de veneno.

8.2 Distribución de los componentes del veneno de *P. regalis* de acuerdo a su peso molecular

Con el fin de explorar la complejidad de los componentes del veneno de tarántulas hembras y machos de la especie *P. regalis*, las secreciones venenosas obtenidas fueron analizadas tomando como base el peso molecular. De este modo, el análisis de 'Tricine-SDS-PAGE' reveló 5 bandas con diferentes pesos moleculares [Figura 16A], de las cuales las bandas 2 y 3 se expresan en mayor proporción en el veneno de tarántulas machos [Figura 16B]. Además, ambos venenos presentaron una banda concentrada y homogénea, cuyo peso molecular se encuentra entre 6 y 13 kDa, la cual corresponde a toxinas peptídicas. Debido a la limitante de la electroforesis para visualizar componentes peptídicos, y con el propósito de obtener mayor información sobre los péptidos, se realizó el análisis mediante 'MALDI-TOF', el cual mostró 34 líneas de espectros en un rango de 3.8 a 8.0 kDa que se expresan de manera muy similar entre ambos sexos, pero que muestran diferencias en la intensidad relativa [Figura 17].

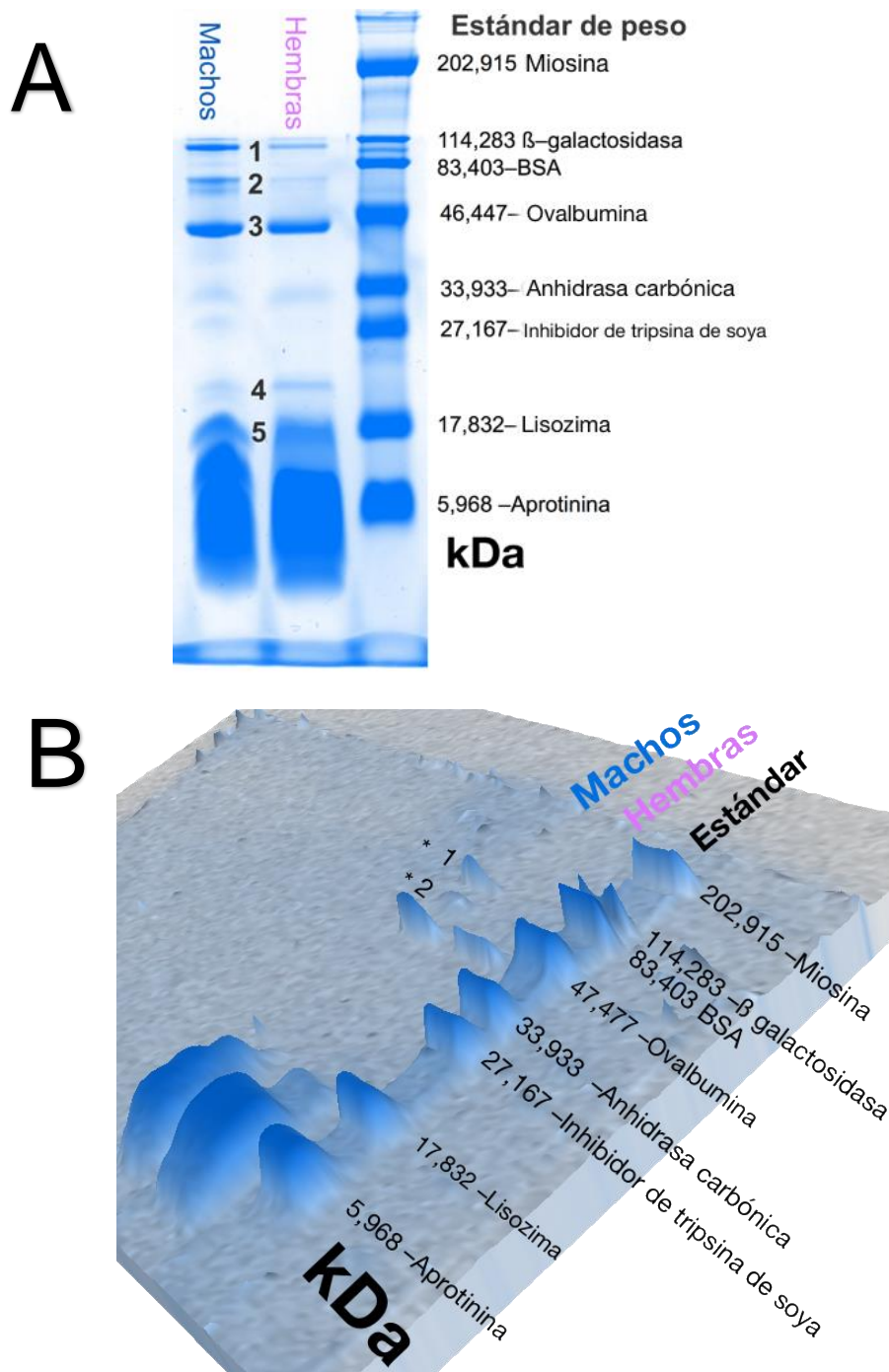


Figura 16. Exploración de las toxinas presentes en el veneno de tarántulas hembras y machos de la especie *P. regalis*, mediante electroforesis 'Tricine SDS-PAGE'. **A)** Se muestran 5 bandas bien definidas de diversos pesos moleculares cercanos a **1** (114,283 kDa), **2** (83,403 kDa), **3** hialuronidasas (42 kDa), **4 y 5** (17,832 kDa). **B)** Representación tridimensional que denota las diferencias en la expresión de las toxinas proteínicas 1 y 2 con base en el sexo. Los carriles fueron cargados con 50 ug de proteína.

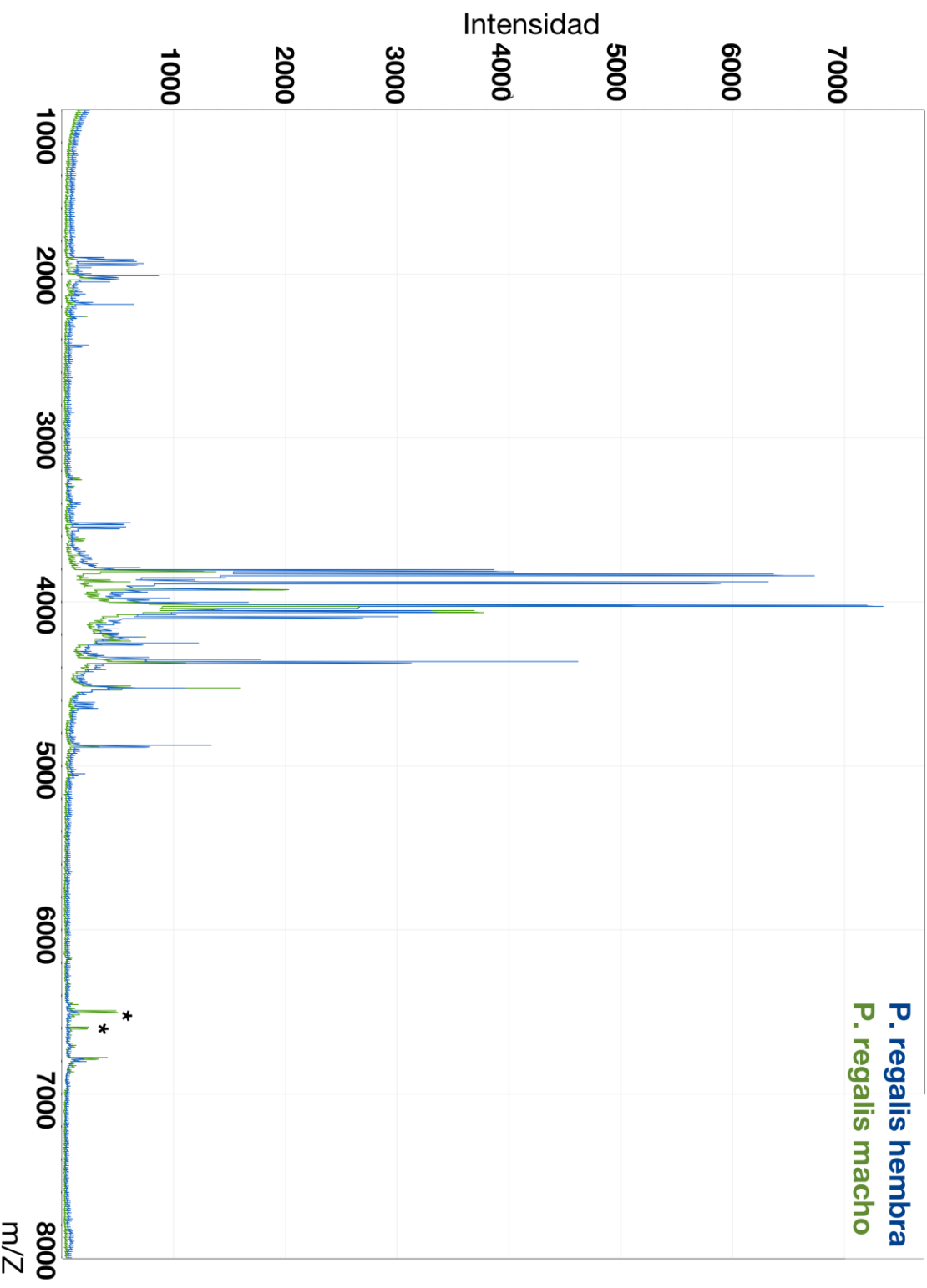


Figura 17. Exploración del peso molecular de las toxinas peptídicas presentes en el veneno de tarántulas de ambos sexos de la especie *P. regalis*. * Muestra las diferencias en la composición de toxinas peptídicas.

8.3 Distribución de las toxinas peptídicas presentes en el veneno de *P. regalis* de acuerdo a su peso molecular

Los péptidos representan los componentes más atractivos de los venenos de tarántulas en virtud de sus aplicaciones biotecnológicas (King, 2015). Por lo tanto, para conocer con más detalle algunas características de los péptidos presentes en el veneno de *P. regalis* de ambos sexos, la separación cromatográfica mediante 'RP-HPLC' del veneno presentó 23 fracciones, que fueron eluidas de la fase estacionaria con tiempos de retención de 10–20, 40–55 y 65–90 minutos, correspondientes a porcentajes de acetonitrilo cercanos a 0–10, 30–45 y 55–80 %, respectivamente [Figura 18]. Simultáneamente, las fracciones fueron colectadas individualmente desde el cromatógrafo con el fin de determinar el peso molecular de las toxinas peptídicas presentes en cada una. De manera general, los péptidos neurotóxicos presentes en el veneno de tarántulas presentan pesos moleculares en un rango de 2–8 kDa (Kuhn–Nentwig *et al.*, 2011). Así mismo, las fracciones colectadas mostraron el fenómeno de coelución de péptidos con pesos moleculares cercanos a aquellos mostrados en el perfil de espectrometría de masas del extracto venenoso. Se presentaron 12.5 líneas de espectros por fracción con un promedio de peso molecular de 3.402 kDa [Figura 19]. Además, en total se determinaron 225 líneas de espectros que corresponden al número de péptidos presentes en el extracto venenoso que contrastaron levemente entre venenos de tarántulas hembras y machos. Por otra parte, las fracciones de péptidos eluidos a diferentes concentraciones de acetonitrilo se ajustan al peso molecular promedio [Figura 20].

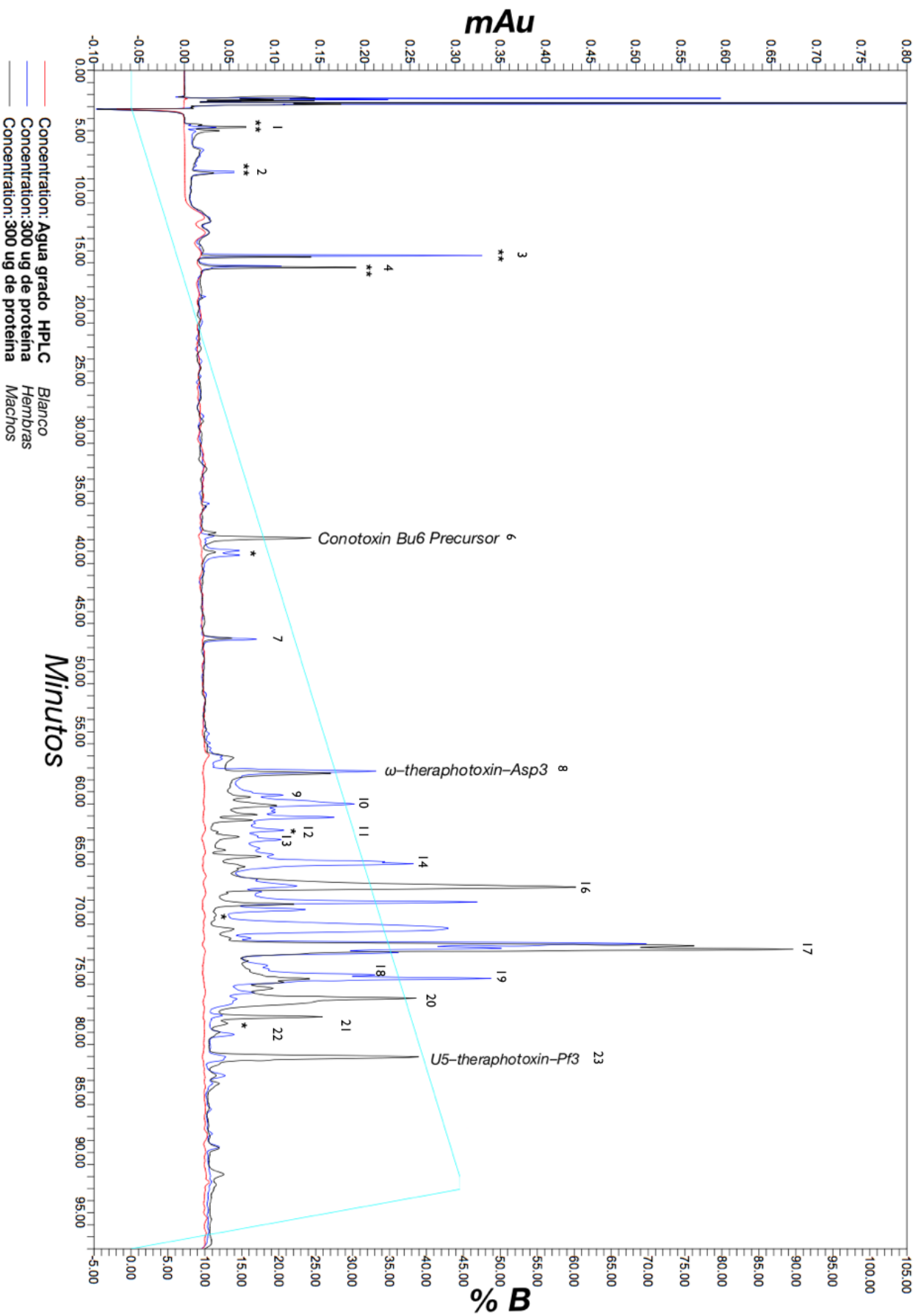


Figura 18. Perfil cromatográfico del veneno de tarántulas de ambos sexos de la especie *P. regalis*. En las fracciones 6, 8 y 23 se especifica la homología con algunas toxinas peptídicas. * Diferencias en relación de la composición de toxinas peptídicas entre ambos sexos. ** Las fracciones 1, 2, 3 y 4 no mostraron espectros de líneas de masas.

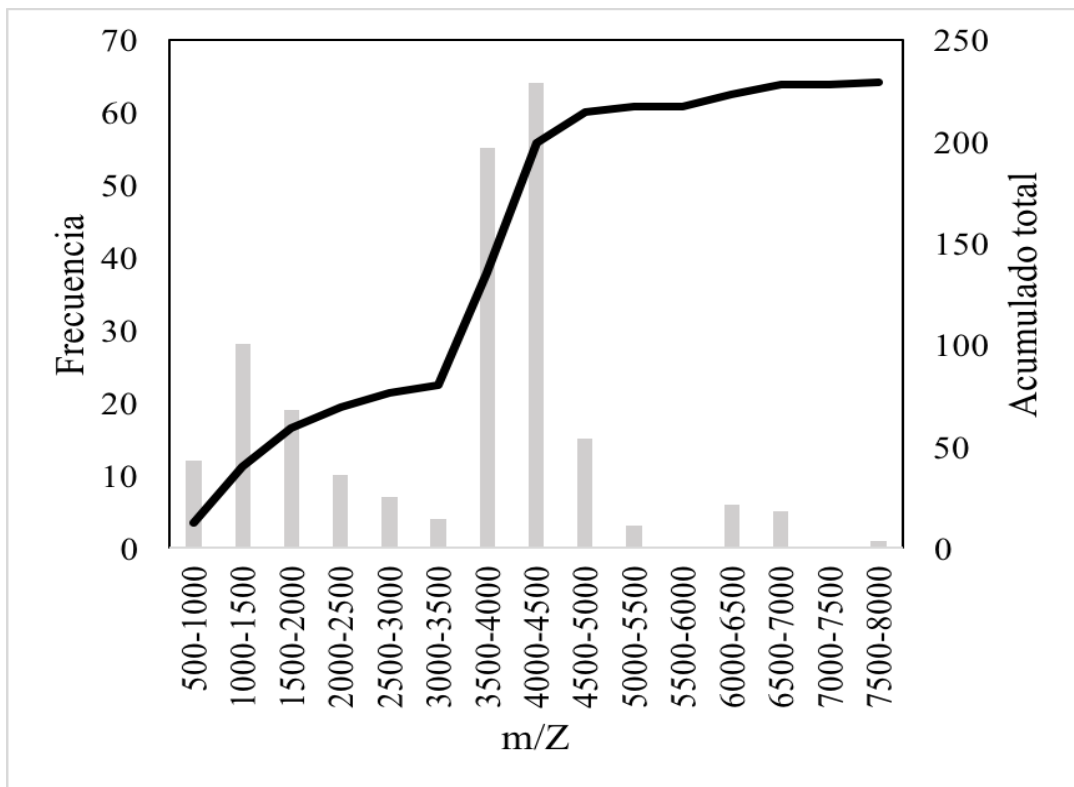


Figura 19. Histograma de abundancia de toxinas peptídicas con base en su peso molecular. La curva muestra el acumulado de péptidos por cada fracción.

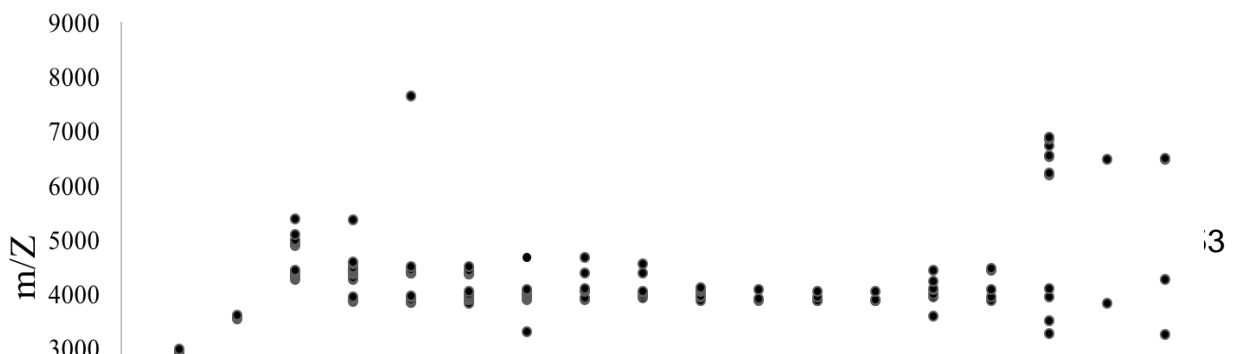


Figura 20. Distribución de las toxinas peptídicas de acuerdo a su peso molecular presentes en las fracciones separadas del veneno de *P. regalis*. Las fracciones contienen péptidos con pesos moleculares semejantes, mientras que las fracciones 10, 21, 22 y 23 presentan péptidos mayores a 6 kDa.

8.4 Identificación de péptidos presentes en las fracciones representativas

Conocer parcialmente la secuencia primaria de péptidos separados en conjunto o individualmente, permite adjudicar posibles funciones biológicas a través del porcentaje de homología con otras toxinas previamente descritas. En consonancia con esta premisa, se obtuvieron patrones de fragmentación de las fracciones 6, 8 y 23, las cuales corresponden a etiquetas de péptidos conformados por 9–14 aminoácidos que poseen homología con múltiples toxinas con blancos biológicos desconocidos, y algunas involucradas con la inhibición de canales iónicos de calcio dependientes de voltaje, mismas que poseen actividad insecticida [Tabla 1].

8.5 Ensayos de toxicidad

La evaluación de la toxicidad del veneno de *P. regalis* en larvas de la mosca *Drosophila melanogaster* mostró una DL_{50} de 0.01685 ± 0.008 μg de proteína/g de peso corporal, mientras que en los ratones fue de 10.76 ± 2.038 μg de proteína/g de peso corporal [Figura 21 **A** y **B**]

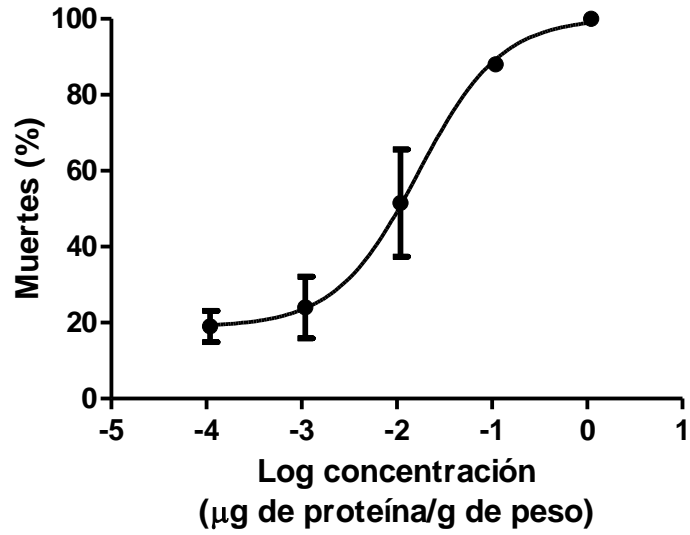
Al inyectar el veneno de *P. regalis* a la dosis de 6.3 μg de proteína/g se observó que los ratones presentaron movimientos más rápidos con respecto a los controles, seguido de saltos y respiración forzada. Uno de ellos presentó convulsiones y muerte

a los 20 minutos después de haberle administrado el veneno, los otros ratones se recuperaron en el transcurso de una hora. A la dosis de 20 μg de proteína/g, todos los ratones presentaron saltos, convulsiones y muerte en menos de 4 minutos después de haberles administrado el veneno. El análisis histológico de los tejidos de los ratones inyectados indicó que ninguno de los ratones administrados con el veneno presentó daños visibles con respecto a los controles [Figura 22].

Número de identificación NCBI	Nombre de toxina homóloga	Especie	SECUENCIA	Función biológica
FRACCIÓN 6				
P0C4965.1	Precursor Conotoxin Bu6	<i>Conus bullatus</i>	MKLCVIVAVLLLTACQLNAADSRDTPQKHRALRSTTKLSMSKDKSCVDPGDSCLFSRIPCCGTCSSRSKSCVG	Precursor
ARB49997.1	U1-Theraphotoxin-P12	<i>Poecilotheria formosa</i>	CLPAGSACSGPLQKIPCCGTCSSRKKCT	Desconocida
ARB50036.1	U1-Theraphotoxin-P13	<i>Poecilotheria formosa</i>	RQLPAGSACSGPIQKIPCCGTCSSRKKCT	Desconocida
FRACCIÓN 8				
P0C104.1	ω -Theraphotoxin-Asp3	<i>Aphonopelma</i> sp.	CLGENVPCKDKDRPNCCSKYECLEPTGYGRCVASYYSYKKTLL	Insecticida
B1P1H6.1	U26-theraphotoxin-Cgt1a	<i>Chilobrachys quangxiensis</i>	MNNTIPIIIIIISLLITVYVAVALEDGNKKEIQIAESEFEASNEMLQLAHLEADRAETEEDRNRSRQKRCWG ANVPCEDENSPCCSPLKCEKTFGYGWWYGSFPCVRSRGG	Desconocida
B1P1H7.1	U26-theraphotoxin-Cgt1b	<i>Chilobrachys quangxiensis</i>	MNNTIPIIIIIISLLITVYVAVALEDGNKKEEMODIAESEFEASNEMLQLAHLEADRAETEED RNSRQKRCWGANVPCEDENSPCCPLKCEKTFGYGWWYGSFPCVRSRGG	Desconocida
ARB49986.1	U7-theraphotoxin-P11	<i>Poecilotheria formosa</i>	CWGANVPCENEKSPCCORGLSCEKTFGYGWWYGSFPCVRRK	Desconocida
B3F1V1.1	ω -Theraphotoxin-Bsm2a	<i>Brachypehina smithi</i>	MNNTQVIIFAVVLLVTVTGQADEDSAEITSLLRKLEAEAAAMFGQYLEESKNSREKRCIG ESVPCDDDDPRCCREYELKPTGYGWWYASYYCYRKKSG	Inhibidor de canales iónicos dependientes de voltaje de calcio
W4VRU8.1	U16-barytoxin-T11b	<i>Tritame loki</i>	MKTIIVFLSLLVLATKFGDAKEGVNKKQKKEVTQNEFRREYLNEMAAMSLVQGLEAIERALFENEAGRNS RQKRCNGENVPCCPNHSTCCSGLSCEETFGYGWWYASPYCVKPSKG	Desconocida
ADF28491.1	Putative mature peptide toxin-like ClGES	<i>Pelnobius muticus</i>	MNSVRIIFLWLVLTATGQADEREYKDETLEKTLSEAENYLRDADGNPKDVIDLLGTDWIEESRNSRP KRCIGESVPCGENGELGCCPLKPTGYGWWYKDVWCYRKS	Semejantes a precursor de toxina Bst1 y HwTx-XV1a4
FRACCIÓN 23				
ARB49978.1	U5-theraphotoxin-P13	<i>Poecilotheria formosa</i>	ACSKQPGGSCDKNDCCGCATVVCASVYVGGKEKHKSSKTSNDNGILNVGGGILVSNNGASVC	Desconocida

Tabla 1. Identificación de las toxinas peptídicas presentes en las fracciones 6, 8 y 23 separadas del veneno de *P. regalis*.

A



B

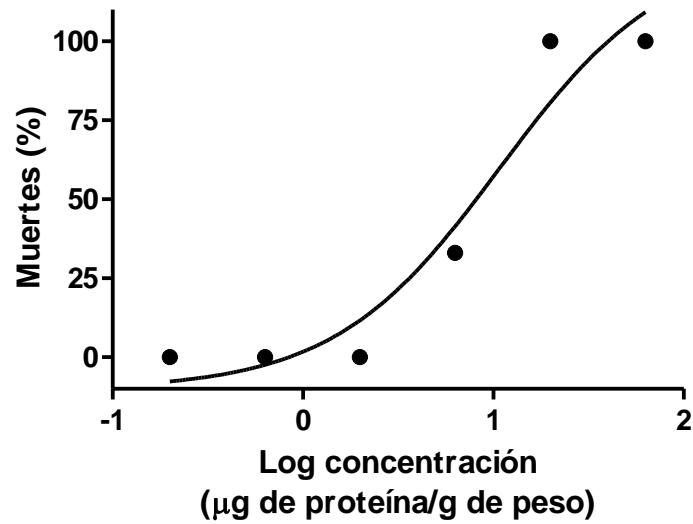


Figura 21. Curvas dosis-respuesta que muestran la toxicidad del veneno de *P. regalis* en larvas de *D. melanogaster* (A) y en ratones (B).

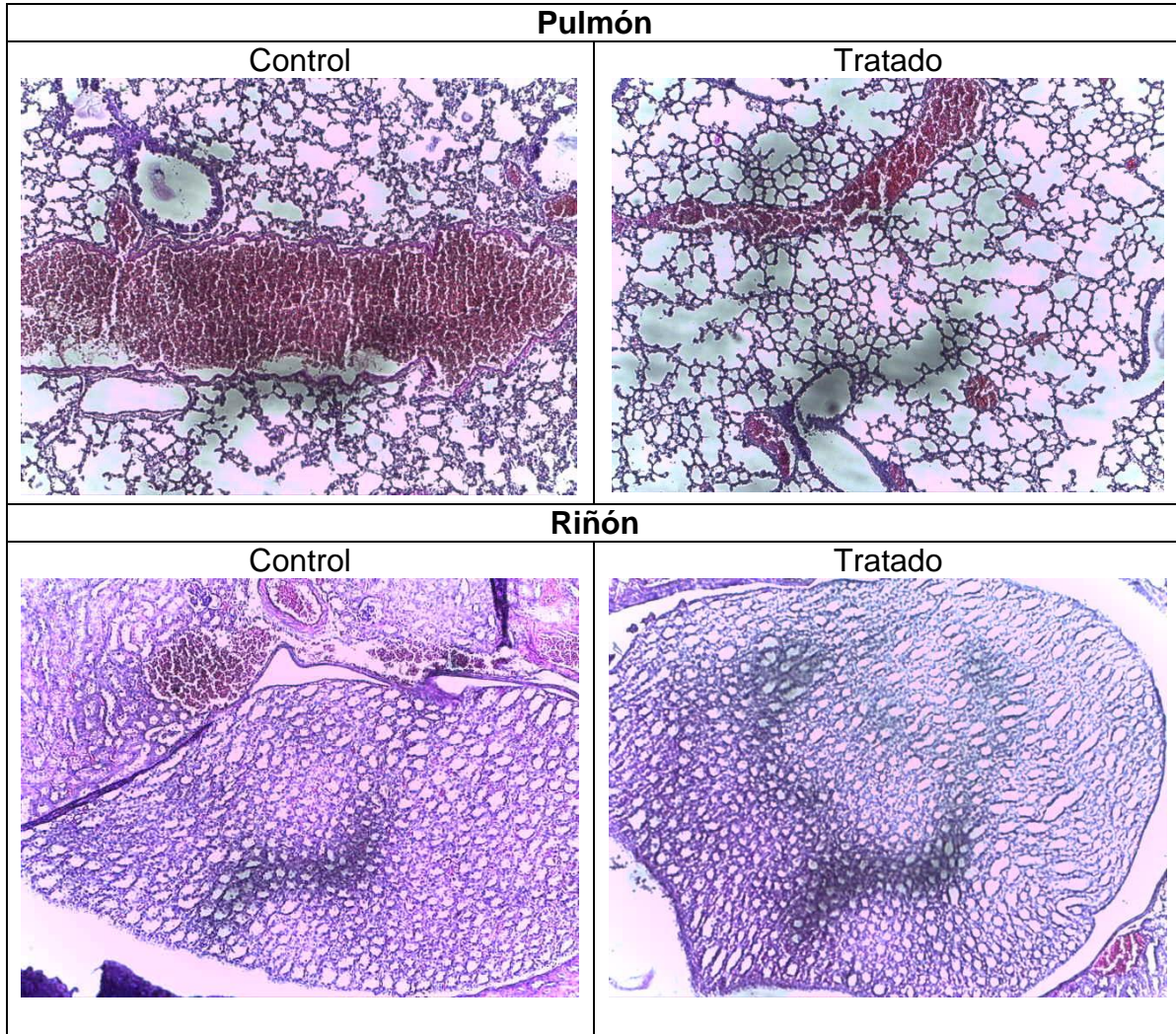


Figura 22. Fotografías representativas de microscopía de luz que muestran el análisis histológico de los ratones a los que se les administró el veneno de *P. regalis* a una dosis de 6.3 μg de proteína por g de peso corporal por vía intraperitoneal. Cortes teñidos con hematoxilina-eosina, magnificación x100.

9. DISCUSIÓN

El veneno de tarántulas está compuesto por una mezcla heterogénea de compuestos bioactivos cuya acción sinérgica sobre múltiples dianas biológicas produce el desequilibrio de procesos fisiológicos clave que permiten al animal subyugar a sus presas y defenderse de sus depredadores (Rash y Hodgson, 2002). Además, estos compuestos presentan estructuras químicas variadas, los cuales se encuentran en diferentes concentraciones en virtud de factores como el sexo, distribución, edad, entre otras. Para conseguir estas alteraciones fisiológicas, los componentes enzimáticos presentes en el veneno cumplen un rol trascendental al distribuir el resto de los componentes desde la zona de la mordedura, hacia el sitio de acción toxicológico (Bordon *et al.*, 2012, 2015). En general, se han identificado en venenos de arañas enzimas como glicosidasas, nucleasas, proteasas y lipasas, así como múltiples proteínas involucradas en el metabolismo intracelular, mismas que en conjunto poseen pesos moleculares en un rango de 10–100 kDa (Hu *et al.*, 2014; Borges *et al.*, 2016). En particular, el veneno de *P. regalis* contiene una variedad de proteínas con pesos moleculares que abarcan un rango de 15 a 110 kDa coincidentes con aquellos de las enzimas mencionadas. Sin embargo, debido a los escasos registros de actividad y a la improductiva presencia de factores metabólicos en el veneno, se ha especulado que estos componentes son producto de la contaminación inherente tanto al tipo de secreción de las glándulas venenosas, como al proceso de extracción de veneno (Vassilevski *et al.*, 2009; Grishin *et al.*, 2010; Andreev-Andrievskiy *et al.*, 2017). Así mismo, se encontró una mayor expresión de proteínas cercanas a 114 y 83 kDa en los venenos de los especímenes machos de *P. regalis*. Hasta el momento, la identidad y función de estas proteínas son desconocidas, y no existe evidencia sobre el efecto sinérgico o toxicológico en el veneno de esta u otras tarántulas. Sin embargo, nuestro equipo de trabajo comprobó que estas proteínas sobreexpresadas están altamente conservadas en el veneno de otras especies de tarántulas macho (evidencia no mostrada). Por otro lado, las enzimas con actividad semejante a hialuronidasa están altamente conservadas y su actividad ha sido determinada plenamente en las secreciones venenosas de tarántulas y otros

animales (Sutti *et al.*, 2014). Específicamente, el veneno de tarántulas hembras y machos de *P. regalis* presenta una banda intensa aproximadamente de 40 kDa que concuerda con enzimas con actividad de hialuronidasa, misma que nuestro grupo de trabajo ha comprobado que produce mayor actividad con respecto al veneno de otras tarántulas, tanto del mismo género taxonómico, como a otras con hábitos excavadores (Rodríguez-Ríos *et al.*, 2017). Por otra parte, se han purificado proteínas responsables de los efectos toxicológicos por envenenamiento de ciertas arañas, como las latrotoxinas (>100 kDa) y necrotoxinas (30–35 kDa) presentes en el veneno de arañas del género *Latrodectus* y *Loxosceles*, respectivamente (Chaves-Moreira *et al.*, 2017; Ryan *et al.*, 2017), las cuales concuerdan con el peso molecular de toxinas proteínicas presentes en el veneno de múltiples tarántulas y que actualmente no cuentan con evidencia química o funcional. Es importante mencionar, que las manifestaciones clínicas ocasionadas por envenenamiento de *P. regalis*, a pesar de reportar síntomas más vigorosos con respecto al de otras tarántulas, no son semejantes a aquellos producidos por el latrodectismo o loxoscelismo.

Por otro lado, con el propósito de adaptarse a su medio ambiente, los venenos de tarántulas contienen neurotoxinas encargadas de interrumpir los procesos fisiológicos involucrados con la contracción muscular y la producción de dolor. Para esto, los péptidos actúan modificando las cinéticas de activación e inactivación en diferentes estados conformacionales de canales iónicos de sodio, potasio y calcio, operados por voltaje, lo cual inhibe la formación del potencial de acción en neuronas presinápticas y postsinápticas (King, 2015). Así mismo, se han reportado pesos moleculares de ‘ β -theraphotoxins’ (3929–4331 Da), ‘ δ -theraphotoxins’ (3681–5298 Da), ‘ μ -theraphotoxins’ (3612–8612 Da), ‘ κ -theraphotoxins’ (3280–6172 Da) y ‘ ω -theraphotoxins’ (2938–8752 Da) (Kuhn-Nentwig *et al.*, 2011). En general, el veneno de tarántulas machos y hembras de la especie *P. regalis* contiene péptidos cuya distribución de peso molecular se encuentra en un rango de 1000–2000 Da y 3500–4500 Da presentes en la mayoría de las fracciones eluídas, además de 9 péptidos entre 6500–8000 Da. De igual modo, se han determinado funcionalmente péptidos de 8000 Da capaces de enaltecer la actividad de neurotoxinas de mayor peso

molecular, como los péptidos adaptadores de latrotoxinas, así como otras que poseen un doble nudo inhibitorio de cistina y que modulan canales TRPV1a (Vassilevski *et al.*, 2009; Bohlen *et al.*, 2010). Hasta el momento, las evidencias toxicológicas entre el veneno de tarántulas del género *Poecilotheria*, no han mostrado un efecto sinérgico entre proteínas y neurotoxinas. Por lo tanto, las toxinas cercanas a 8000 Da podrían estar compuestas por dobles nudos inhibitorios de cistina que deben ser analizadas puntualmente debido a su interés farmacológico. Por otro lado, dado que uno de los factores de variabilidad primordiales en la expresión de toxinas es el sexo, durante la búsqueda de péptidos con potencial biotecnológico es indispensable comparar los perfiles de composición del veneno de especímenes hembras y machos (Escoubas *et al.*, 2002; Herzig y Hodgson, 2009; Palagi *et al.*, 2013; Albalat y Cañestro, 2016). Por ejemplo, el veneno de arañas de la especie *Atrax robustus* presenta la toxina peptídica δ -HXTX-1a que actúa selectivamente sobre canales iónicos operados por voltaje de sodio. Esta toxina ha sido ampliamente estudiada con el propósito de utilizarse como bioinsecticida y únicamente se expresa en machos maduros (Wilson, 2015). De manera puntual, el veneno de tarántulas macho de *P. regalis* presenta variaciones en la composición y concentración de péptidos con respecto al veneno de hembras, lo cual amplía las posibilidades de encontrar toxinas con potencial biotecnológico en el veneno de esta tarántula.

Por otra parte, múltiples toxinas peptídicas con potencial biotecnológico han sido identificadas del veneno de tarántulas y arañas mediante el porcentaje de homología de las toxinas secuenciadas y almacenadas en bases de datos. Tal es el caso de las toxinas peptídicas del veneno de la tarántula *Grammostola iheringi*, la cual mediante el uso de técnicas multidimensionales se logró adjudicar diferentes funciones a los péptidos presentes en su veneno (Borges *et al.*, 2016). Así mismo, las toxinas peptídicas presentes en las fracciones 6, 8 y 23 separadas del veneno de *P. regalis* en este estudio, exhiben un alto porcentaje de homología con toxinas involucradas en la inhibición de canales iónicos de calcio operados por voltaje, como la toxina ω -theraphotoxin-Asp3a de 4850 Da purificada del veneno de la tarántula *Aphonopelma*

sp, misma que bloquea canales de calcio operados por voltaje de invertebrados de manera inespecífica. Curiosamente, esta toxina cuenta con una patente desde 1994 y se ha utilizado en la investigación para el desarrollo bioinsecticidas, debido a su parecido estructural con la toxina peptídica ω -theraphotoxin-Bs2a de 4922 Da, de la tarántula de Rodillas Rojas *Brachypelma smithi*. Esta toxina posee homología con la fracción 8 del veneno de *P. regalis*, y actúa específicamente sobre canales de calcio de invertebrados. Por otro lado, algunos péptidos presentes en todas las fracciones analizadas mostraron homología con toxinas peptídicas, las cuales no han sido relacionadas con un efecto o blanco biológico hasta el momento. Tal es el caso de las toxinas U26-theraphotoxin-Cg1a y 1b de 4609 y 4619 Da respectivamente, purificadas del veneno de la tarántula pardo clara de China *Chilobrachys guangxiensis*. Sin embargo, cabe mencionar que las toxinas con blanco desconocido presentan pesos cercanos y un alto grado de homología con β , δ , μ , κ y ω theraphotoxinas que deben ser analizadas detalladamente (Herzig *et al.*, 2011). Por otra parte, se encontró homología con toxinas peptídicas de otros animales venenosos, como el precursor de la conotoxina Bu6 de *Conus bullatus* y el péptido putativo maduro semejante a toxina CIGES. La alta homología entre precursores de toxinas peptídicas es común, debido a que provienen de genes ancestrales comunes, que han evolucionado mediante duplicación y divergencia, lo cual los hace ser semejantes (Pineda *et al.*, 2014a; Kerckamp *et al.*, 2015). Así mismo, se encontró un 100 % de homología con fragmentos de péptidos U1-theraphotoxin-Pf2, Pf3 y U5-theraphotoxin-Pf3, obtenidos mediante enfoques transcriptómicos de la glándula venenosa de la tarántula *Poecilotheria formosa*, por lo que podría tratarse de péptidos parálogos presentes en el veneno de *P. regalis*.

Considerando la necesidad de adaptarse a las diferencias estructurales de los blancos biológicos en las múltiples especies de presas, se ha propuesto que las toxinas peptídicas se presentan en las secreciones venenosas de tarántulas en variantes discretas (Pineda *et al.*, 2014b). De igual manera, se han identificado mediante métodos transcriptómicos, péptidos neurotóxicos parálogos y ortólogos en las glándulas de veneno extraídas de distintas especies de arañas de la familia

Hexatelidae. El veneno de *P. regalis* produce una letalidad en ratones equivalente a la mitad de la concentración producida por el veneno de la ampliamente estudiada tarántula asiática *Selenocosmia Jiafu* (Hu *et al.*, 2014). Además, nuestro equipo de trabajo determinó que la letalidad del veneno en grillos de la especie *Acheta domestica* es menor con respecto al veneno de otras tarántulas africanas y americanas (García-Arredondo *et al.*, 2015), y finalmente en este trabajo determinamos que la letalidad del veneno de *P. regalis* es mayor en larvas de la mosca *Drosophila melanogaster* que en el resto de las especies analizadas. Es importante mencionar, que la letalidad del veneno de múltiples arañas ha sido analizada en diversas especies incluyendo a la mosca *D. melanogaster* y que actúa de manera específica a la especie estudiada.

Acorde con esta evidencia, algunas neurotoxinas con actividad insecticida se han purificado del veneno de tarántulas con pesos moleculares de 1–8 kDa, de las cuales algunas actúan específicamente sobre canales iónicos de calcio operados por voltaje de invertebrados, y que concuerdan con los pesos aproximados a las toxinas identificadas en este estudio (Hardy *et al.*, 2013; Smith *et al.*, 2013; Herzig y King, 2015).

10. CONCLUSIÓN

En este trabajo se determinó la complejidad de la composición del veneno de tarántulas de ambos sexos de la especie *P. regalis*, con lo que se lograron establecer diferencias importantes, ya que el veneno de los machos presenta toxinas proteínicas en mayor concentración que el veneno de las hembras, mismas que podrían proponerse como marcadores para la determinación de sexo en esta especie.

Los análisis de secuenciación de fragmentos de las toxinas peptídicas sugirieron la presencia de toxinas insecticidas con mecanismos de acción que involucran a los canales iónicos de calcio dependientes de voltaje específicos para invertebrados, así como péptidos parálogos de la especie cercana del mismo género taxonómico *Poecilotheria formosa*. Además, se identificaron péptidos precursores de toxinas peptídicas de otras especies venenosas que sugiere que los péptidos producidos por esta tarántula provienen de genes ancestrales.

Finalmente, se determinó que el veneno de *P. regalis* es tóxico en ratones a concentraciones más bajas que otras tarántulas asiáticas, provocando un efecto letal principalmente neurotóxico.

Este estudio presenta datos metodológicos importantes para el desarrollo de futuras estrategias de investigación que permitirán la obtención de toxinas con efectos farmacológicos, útiles en el desarrollo de fármacos. Actualmente se está trabajando en la obtención de información sobre los efectos farmacológicos de este veneno en diferentes modelos biológicos y en la determinación de los mecanismos de acción involucrados. Los análisis químicos obtenidos en este estudio serán de gran utilidad para la purificación de los compuestos responsables de los efectos observados hasta el momento.

11. BIBLIOGRAFÍA

Abdelhamid, R.E., Sluka, K.A., 2015. ASICs Mediate Pain and Inflammation in

- Musculoskeletal Diseases. Physiology 30, 449–459.
doi:10.1152/physiol.00030.2015
- Ahmed, N., Pinkham, M., Warrell, D.A., 2009. Symptom in search of a toxin: Muscle spasms following bites by Old World tarantula spiders (*Lampropelma nigerrimum*, *Pterinochilus murinus*, *Poecilotheria regalis*) with review. *Qjm* 102, 851–857. doi:10.1093/qjmed/hcp128
- Albalat, R., Cañestro, C., 2016. Evolution by gene loss. *Nat. Rev. Genet.* 17, 379–391. doi:10.1038/nrg.2016.39
- Allcock, A.L., 2015. Evolution of Venomous Animals and Their Toxins 1–16. doi:10.1007/978-94-007-6727-0
- Andreev-Andrievskiy, A., Popova, A., Lagereva, E., Osipov, D., Berkut, A., Grishin, E., Vassilevski, A., 2017. Pharmacological analysis of *Poecilotheria* spider venoms in mice provides clues for human treatment. *Toxicon* 138, 59–67. doi:10.1016/j.toxicon.2017.08.013
- Balaji, R.A., Sasaki, T., Gopalakrishnakone, P., Sato, K., Kini, R.M., Bay, B.H., 2000. Purification, structure determination and synthesis of covalitoxin-II, a short insect-specific neurotoxic peptide from the venom of the *Coremiocnemis validus* (Singapore tarantula). *FEBS Lett.* 474, 208–212. doi:10.1016/S0014-5793(00)01593-3
- Berecki, G., Motin, L., Adams, D.J., 2016. Voltage-Gated R-Type Calcium Channel Inhibition via Human m-, d-, and k-opioid Receptors Is Voltage-Independently Mediated by Gbg Protein Subunits. *Mol. Pharmacol.* 89, 187–196. doi:10.1124/mol.115.101154
- Bohlen, C.J., Priel, A., Zhou, S., King, D., Siemens, J., Julius, D., 2010. A bivalent tarantula toxin activates the capsaicin receptor, TRPV1, by targeting the outer pore domain. *Cell* 141, 834–845. doi:10.1016/j.cell.2010.03.052
- Bond, J.E., Hendrixson, B.E., Hamilton, C.A., Hedin, M., 2012. A reconsideration of the classification of the Spider infraorder mygalomorphae (Arachnida: Araneae) based on three nuclear genes and morphology. *PLoS One* 7. doi:10.1371/journal.pone.0038753
- Bordon, K.C.F., Perino, M.G., Giglio, J.R., Arantes, E.C., 2012. Isolation, enzymatic characterization and antiedematogenic activity of the first reported rattlesnake hyaluronidase from *Crotalus durissus terrificus* venom. *Biochimie* 94, 2740–2748. doi:10.1016/j.biochi.2012.08.014
- Bordon, K.C.F., Wiezel, G.A., Amorim, F.G., Arantes, E.C., 2015. Arthropod venom Hyaluronidases: biochemical properties and potential applications in medicine and biotechnology. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 21, 43. doi:10.1186/s40409-015-0042-7
- Borges, M.H., Figueiredo, S.G., Leprevost, F. V., De Lima, M.E., Cordeiro, M. do N., Diniz, M.R.V., Moresco, J., Carvalho, P.C., Yates, J.R., 2016. Venomous extract protein profile of Brazilian tarantula *Grammostola iheringi*: Searching for potential biotechnological applications. *J. Proteomics* 136, 35–47. doi:10.1016/j.jprot.2016.01.013
- Calvete, J.J., Sanz, L., Angulo, Y., Lomonte, B., Gutiérrez, J.M., 2009. Venoms, venomics, antivenomics. *FEBS Lett.* 583, 1736–1743. doi:10.1016/j.febslet.2009.03.029

- Cardoso, F.C., Dekan, Z., Rosengren, K.J., Erickson, A., Vetter, I., Deus, J.R., Herzig, V., Alewood, P.F., King, G.F., Lewis, R.J., 2015. Identification and Characterization of ProTx-III [m-TRTX-Tp1a], a New Voltage-Gated Sodium Channel Inhibitor from Venom of the Tarantula *Thrixopelma pruriens*. *Mol. Pharmacol. Mol Pharmacol* 88, 291–303. doi:10.1124/mol.115.098178
- Casewell, N.R., Wüster, W., Vonk, F.J., Harrison, R.A., Fry, B.G., 2013. Complex cocktails: The evolutionary novelty of venoms. *Trends Ecol. Evol.* 28, 219–229. doi:10.1016/j.tree.2012.10.020
- Celerier, M.L., Paris, C., Lange, C., 1993. Venom of an aggressive African Theraphosidae (*Scodra griseipes*): milking the venom, a study of its toxicity and its characterization. *Toxicon* 31, 577–590. doi:10.1016/0041-0101(93)90113-W
- Chaim, O.M., Trevisan-Silva, D., Chaves-Moreira, D., Wille, A.C.M., Ferrer, V.P., Matsubara, F.H., Mangili, O.C., da Silveira, R.B., Gremski, L.H., Gremski, W., Senff-Ribeiro, A., Veiga, S.S., 2011. Brown spider (*Loxosceles* genus) venom toxins: Tools for biological purposes. *Toxins (Basel)*. 3, 309–344. doi:10.3390/toxins3030309
- Chaves-Moreira, D., Senff-Ribeiro, A., Wille, A.C.M., Gremski, L.H., Chaim, O.M., Veiga, S.S., 2017. Highlights in the knowledge of brown spider toxins. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 23, 6. doi:10.1186/s40409-017-0097-8
- Chen, J., Zhang, Y., Rong, M., Zhao, L., Jiang, L., Zhang, D., Wang, M., Xiao, Y., Liang, S., 2009. Peptides Expression and characterization of jingzhaotoxin-34 , a novel neurotoxin from the venom of the tarantula *Chilobrachys jingzhao* 30, 1042–1048. doi:10.1016/j.peptides.2009.02.018
- Cheng, T.C., Long, R.W., Wu, Y.Q., Guo, Y.B., Liu, D.L., Peng, L., Li, D.Q., Yang, D.W., Xu, X., Liu, F.X., Xia, Q.Y., 2016. Identification and characterization of toxins in the venom gland of the Chinese bird spider, *Haplopelma hainanum*, by transcriptomic analysis. *Insect Sci.* 23, 487–499. doi:10.1111/1744-7917.12305
- Cherki, R.S., Kolb, E., Langut, Y., Tsveyer, L., Bajayo, N., Meir, A., 2014. Two tarantula venom peptides as potent and differential NaV channels blockers. *Toxicon* 77, 58–67. doi:10.1016/j.toxicon.2013.10.029
- Clement, H., Barraza, G., Herrera, E., Villegas, E., Corzo, G., 2015. Spider Venoms 1–13. doi:10.1007/978-94-007-6646-4
- 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* 60, 1223–1227. doi:10.1016/j.toxicon.2012.08.018
- Cunha, R.B., 2013. Peptidomic Analysis of Animal Venoms 3–22.
- Dauly, C., Escoubas, P., King, G.F., Nicholson, G.M., s/f. Characterization of Spider Venom Peptides by High-Resolution LC-MS / MS Analysis.
- Deng, M., Luo, X., Xiao, Y., Sun, Z., Jiang, L., Liu, Z., Zeng, X., Chen, H., Tang, J., Zeng, W., Liang, S., 2014. Huwentoxin-XVI, an analgesic, highly reversible mammalian N-type calcium channel antagonist from Chinese tarantula *Ornithoctonus huwena*. *Neuropharmacology* 79, 657–667. doi:10.1016/j.neuropharm.2014.01.017
- Domingues, T.M., Perez, K.R., Miranda, A., Riske, K.A., 2015. Comparative study of the mechanism of action of the antimicrobial peptide gomesin and its linear

- analogue: The role of the β -hairpin structure. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1848, 2414–2421. doi:10.1016/j.bbamem.2015.07.012
- Duan, B., Wu, L.-J., Yu, Y.-Q., Ding, Y., Jing, L., Xu, L., Chen, J., Xu, T.-L., 2007. Upregulation of Acid-Sensing Ion Channel ASIC1a in Spinal Dorsal Horn Neurons Contributes to Inflammatory Pain Hypersensitivity. *J. Neurosci.* 27, 11139–11148. doi:10.1523/JNEUROSCI.3364-07.2007
- Dugon, M.M., 2015. Evolution of Venomous Animals and Their Toxins 1–15. doi:10.1007/978-94-007-6727-0
- Emery, E.C., Luiz, A.P., Wood, J.N., 2016. Nav 1.7 and other voltage-gated sodium channels as drug targets for pain relief. *Expert Opin. Ther. Targets* 20, 975–983. doi:10.1517/14728222.2016.1162295
- Escoubas, P., Corzo, G., Whiteley, B.J., C el erier, M.-L., Nakajima, T., 2002. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and high-performance liquid chromatography study of quantitative and qualitative variation in tarantula spider venoms. *Rapid Commun. Mass Spectrom. Spectrom. RCM* 16, 403–413. doi:10.1002/rcm.595
- Escoubas, P., Rash, L., 2004. Tarantulas: Eight-legged pharmacists and combinatorial chemists. *Toxicon* 43, 555–574. doi:10.1016/j.toxicon.2004.02.007
- Eskander, M.A., Ruparel, S., Green, D.P., Chen, P.B., Por, E.D., Jeske, N.A., Gao, X., Flores, E.R., Hargreaves, K.M., 2015. Persistent Nociception Triggered by Nerve Growth Factor (NGF) Is Mediated by TRPV1 and Oxidative Mechanisms. *J. Neurosci.* 35, 8593–8603. doi:10.1523/JNEUROSCI.3993-14.2015
- 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). *Toxicon* 76, 301–309. doi:10.1016/j.toxicon.2013.10.014
- Estrada, G., Corzo, G., 2007. Spider venoms : a rich source of acylpolyamines and peptides as new leads for CNS drugs. doi:10.1039/b603083c
- Fernández-Ballester, G., Fernández-Carvajal, A., González-Ros, J.M., Ferrer-Montiel, A., 2011. Ionic channels as targets for drug design: A review on computational methods. *Pharmaceutics* 3, 932–953. doi:10.3390/pharmaceutics3040932
- Fernández-Montraveta, C., Moya-Laraño, J., 2007. Sex-specific plasticity of growth and maturation size in a spider: Implications for sexual size dimorphism. *J. Evol. Biol.* 20, 1689–1699. doi:10.1111/j.1420-9101.2007.01399.x
- Franceschini, A., Adinolfi, E., 2014. P2X receptors: New players in cancer pain. *World J. Biol. Chem.* 5, 429–436. doi:10.4331/wjbc.v5.i4.429
- Fry, B., 2005. From genome to “venome”: molecular origin and evolution of the snake venom proteome inferred from phylogenetic analysis of toxin sequences and related body proteins. *Genome Res.* 15, 403–420. doi:10.1101/gr.3228405
- Fuchs, J., Von Dechend, M., Mordasini, R., Ceschi, A., Nentwig, W., 2014. A verified spider bite and a review of the literature confirm Indian ornamental tree spiders (*Poecilotheria* species) as underestimated theraphosids of medical importance. *Toxicon* 77, 73–77. doi:10.1016/j.toxicon.2013.10.032
- García-Arredondo, A., Rodríguez-Rios, L., Díaz-Peña, L.F., Vega- ngeles, R., 2015.

- Pharmacological characterization of venoms from three theraphosid spiders: *Poecilotheria regalis*, *Ceratogyrus darlingi* and *Brachypelma epicureanum*. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 21, 15. doi:10.1186/s40409-015-0017-8
- Gawryszewski, F.M., Calero-Torralbo, M.A., Gillespie, R.G., Rodríguez-Gironés, M.A., Herberstein, M.E., 2017. Correlated evolution between coloration and ambush site in predators with visual prey lures. *Evolution (N. Y.)*. 71, 2010–2021. doi:10.1111/evo.13271
- Gilchrist, J., bosmans, F., 2012. Animal toxins can alter the function of Nav1.8 and Nav1.9. *Toxins (Basel)*. 4, 620–632. doi:10.3390/toxins4080620
- Gonçalves-Machado, L., Pla, D., Sanz, L., Jorge, R.J.B., Leitão-De-Araújo, M., Alves, M.L.M., Alvares, D.J., De Miranda, J., Nowatzki, J., de Moraes-Zani, K., Fernandes, W., Tanaka-Azevedo, A.M., Fernández, J., Zingali, R.B., Gutiérrez, J.M., Corrêa-Netto, C., Calvete, J.J., 2016. Combined venomomics, venom gland transcriptomics, bioactivities, and antivenomics of two *Bothrops jararaca* populations from geographic isolated regions within the Brazilian Atlantic rainforest. *J. Proteomics* 135, 73–89. doi:10.1016/j.jprot.2015.04.029
- Grishin, E. V., Savchenko, G.A., Vassilevski, A.A., Korolkova, Y. V., Boychuk, Y.A., Viatchenko-Karpinski, V.Y., Nadezhdin, K.D., Arseniev, A.S., Pluzhnikov, K.A., Kulyk, V.B., Voitenko, N. V., Krishtal, O.O., 2010. Novel peptide from spider venom inhibits P2X3 receptors and inflammatory pain. *Ann. Neurol.* 67, 680–683. doi:10.1002/ana.21949
- Guette, C., Legros, C., Tournois, G., Goyffon, M., Ce, M., 2006. Peptide profiling by matrix-assisted laser desorption / ionisation time-of-flight mass spectrometry of the *Lasiadora parahybana tarantula* venom gland 47, 640–649. doi:10.1016/j.toxicon.2006.01.017
- Gui, J., Liu, B., Cao, G., Lipchik, A.M., Perez, M., Dekan, Z., Mobli, M., Daly, N.L., Alewood, P.F., Parker, L.L., King, G.F., Zhou, Y., Jordt, S.E., Nitabach, M.N., 2014. A tarantula-venom peptide antagonizes the TRPA1 nociceptor ion channel by binding to the S1-S4 gating domain. *Curr. Biol.* 24, 473–483. doi:10.1016/j.cub.2014.01.013
- Gunasekara, P., Handunnetti, S.M., Premawansa, S., Witharana, E.W.R.A., Dasanayake, W.M.D.K., Ratnayake, I.P., Seneviratne, S.L., Dias, R.K.S., Premakumara, G.A.S., de Silva, R., 2017. IgE cross-reactivity of phospholipase A2 and hyaluronidase of *Apis dorsata* (Giant Asian Honeybee) and *Apis mellifera* (Western Honeybee) venom: Possible use of *A. mellifera* venom for diagnosis of patients allergic to *A. dorsata* venom. *Toxicon* 137, 27–35. doi:10.1016/j.toxicon.2017.07.015
- Haney, R.A., Clarke, T.H., Gadgil, R., Fitzpatrick, R., Hayashi, C.Y., Ayoub, N.A., Garb, J.E., 2016. Effects of Gene Duplication, Positive Selection, and Shifts in Gene Expression on the Evolution of the Venom Gland Transcriptome in Widow Spiders. *Genome Biol. Evol.* 8, 228–242. doi:10.1093/gbe/evv253
- Hardy, M.C., Daly, N.L., Mobli, M., Morales, R.A. V., King, G.F., 2013. Isolation of an Orally Active Insecticidal Toxin from the Venom of an Australian Tarantula. *PLoS One* 8, e73136. doi:10.1371/journal.pone.0073136
- Harvey, A.L., 2014. Toxins and drug discovery. *Toxicon* 92, 193–200. doi:10.1016/j.toxicon.2014.10.020

- Herzig, Volker and Hodgson, Wayne C. 2008. Neurotoxic and insecticidal properties of venom from the Australian theraphosid spider *Selenotholus foelschei*. *Neurotoxicology*, 29 3: 471-475. doi:10.1016/j.neuro.2008.03.002
- Herzig, V., Hodgson, W.C., 2009. Toxicon Intersexual variations in the pharmacological properties of *Coremiocnemis tropix* (Araneae , Theraphosidae) spider venom. *Toxicon* 53, 196–205. doi:10.1016/j.toxicon.2008.11.002
- Herzig, V., King, G.F., 2015. The cystine knot is responsible for the exceptional stability of the insecticidal spider toxin ω -Hexatoxin-Hv1a. *Toxins (Basel)*. 7, 4366–4380. doi:10.3390/toxins7104366
- Hu, Z., Zhou, X., Chen, J., Tang, C., Xiao, Z., Ying, D., Liu, Z., Liang, S., 2014. The venom of the spider *Selenocosmia jiafu* contains various neurotoxins acting on voltage-gated ion channels in rat dorsal root ganglion neurons. *Toxins (Basel)*. 6, 988–1001. doi:10.3390/toxins6030988
- Isbister, G.K., Seymour, J.E., Gray, M.R., Raven, R.J., 2003. Bites by spiders of the family Theraphosidae in humans and canines. *Toxicon* 41, 519–524. doi:10.1016/S0041-0101(02)00395-1
- Kaczorowski, G.J., McManus, O.B., Priest, B.T., Garcia, M.L., 2008. Ion Channels as Drug Targets: The Next GPCRs. *J. Gen. Physiol.* 131, 399–405. doi:10.1085/jgp.200709946
- Kerckamp, H.M.I., Casewell, N.R., Vonk, F.J., Reid, A., Group, E., 2015. Evolution of Venomous Animals and Their Toxins 1–11. doi:10.1007/978-94-007-6727-0
- Kikuchi, K., Sugiura, M., Kimura, T., 2015. High proteolytic resistance of spider-derived inhibitor cystine knots. *Int. J. Pept.* 2015. doi:10.1155/2015/537508
- King, G.F., 2011. Venoms as a platform for human drugs: translating toxins into therapeutics. *Expert Opin. Biol. Ther.* 11, 1469–1484. doi:10.1517/14712598.2011.621940
- King, G.F., Gentz, M.C., Escoubas, P., Nicholson, G.M., 2008. A rational nomenclature for naming peptide toxins from spiders and other venomous animals. *Toxicon* 52, 264–276. doi:10.1016/j.toxicon.2008.05.020
- Klint, J.K., Chin, Y.K.-Y., Mobli, M., 2015. Rational Engineering Defines a Molecular Switch That Is Essential for Activity of Spider-Venom Peptides against the Analgesics Target NaV1.7. *Mol. Pharmacol.* 88, 1002–1010. doi:10.1124/mol.115.100784
- Kozlov, S.A., Vassilevski, A.A., Feofanov, A. V., Surovoy, A.Y., Karpunin, D. V., Grishin, E. V., 2006. Latarcins, antimicrobial and cytolytic peptides from the venom of the spider *Lachesana tarabaei* (Zodariidae) that exemplify biomolecular diversity. *J. Biol. Chem.* 281, 20983–20992. doi:10.1074/jbc.M602168200
- Kreil, G., 1995. Hyaluronidases — a group of neglected enzymes. *Protein Sci.* 4, 1666–1669. doi:10.1002/pro.5560040902
- Kuhn-Nentwig, L., Stöcklin, R., Nentwig, W., 2011. Venom composition and strategies in spiders. is everything possible?, *Advances in Insect Physiology*. doi:10.1016/B978-0-12-387668-3.00001-5
- Lau, C.H.Y., King, G.F., Mobli, M., 2016. Molecular basis of the interaction between gating modifier spider toxins and the voltage sensor of voltage-gated ion channels. *Sci. Rep.* 6, 34333. doi:10.1038/srep34333

- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227,5259:680–685
- Li, T., Yang, Y., Canessa, C.M., 2014. A Method for activation of endogenous acid-sensing ion channel 1a (ASIC1A) in the nervous system with high spatial and temporal precision. *J. Biol. Chem.* 289, 15441–15448. doi:10.1074/jbc.M114.550012
- Liao, M., Cao, E., Julius, D., Cheng, Y., 2013. Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy. *Nature* 504, 107–112. doi:10.1038/nature12822
- Liao, Z., Cao, J., Li, S., Yan, X., Hu, W., He, Q., Chen, J., Tang, J., Xie, J., Liang, S., 2007. Proteomic and peptidomic analysis of the venom from Chinese tarantula *Chilobrachys jingzhao*. *Proteomics* 7, 1892–1907. doi:10.1002/pmic.200600785
- Liu, S., Cheng, X.-Y., Wang, F., Liu, C.-F., 2015. Acid-sensing ion channels: potential therapeutic targets for neurologic diseases. *Transl. Neurodegener.* 4, 10. doi:10.1186/s40035-015-0031-3
- Lucas, S.M., 2015. The history of venomous spider identification, venom extraction methods and antivenom production: a long journey at the Butantan Institute, São Paulo, Brazil. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 21, 21. doi:10.1186/s40409-015-0020-0
- Matavel, A., Estrada, G., Marco, F. De, 2015. Spider Venoms 1–14. doi:10.1007/978-94-007-6646-4
- McGivern, J.G., 2007. Ziconotide: A review of its pharmacology and use in the treatment of pain. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 3, 69–85. doi:10.2147/ndt.2007.3.1.69
- Middleton, R.E., Warren, V.A., Kraus, R.L., Hwang, J.C., Liu, C.J., Dai, G., Brochu, R.M., Kohler, M.G., Gao, Y.D., Garsky, V.M., Bogusky, M.J., Mehl, J.T., Cohen, C.J., Smith, M.M., 2002. Two tarantula peptides inhibit activation of multiple sodium channels. *Biochemistry* 41, 14734–14747. doi:10.1021/bi026546a
- Min, J.W., Liu, W.H., He, X.H., Peng, B.W., 2013. Different types of toxins targeting TRPV1 in pain. *Toxicon* 71, 66–75. doi:10.1016/j.toxicon.2013.05.016
- Morales-González, D., Flores-Martínez, E., Zamora-Bustillos, R., Rivera-Reyes, R., Michel-Morfón, J.E., Landa-Jaime, V., Falcón, A., Aguilar, M.B., 2015. Diversity of A-conotoxins of three worm-hunting cone snails (*Conus brunneus*, *Conus nux*, and *Conus princeps*) from the Mexican Pacific coast. *Peptides* 68, 25–32. doi:10.1016/j.peptides.2015.02.002
- Mourão, C.B.F., Heghinian, M.D., Barbosa, E.A., Marí, F., Bloch, C., Restano-Cassulini, R., Possani, L.D., Schwartz, E.F., 2013. Characterization of a novel peptide toxin from *Acanthoscurria paulensis* spider venom: A distinct cysteine assignment to the HWTX-II family. *Biochemistry* 52, 2440–2452. doi:10.1021/bi4000035
- Mourão, C.B.F., Oliveira, F.N., E Carvalho, A.C., Arenas, C.J., Duque, H.M., Gonçalves, J.C., Macêdo, J.K.A., Galante, P., Schwartz, C.A., Mortari, M.R., Almeida Santos, M. de F.M., Schwartz, E.F., 2013. Venomic and pharmacological activity of *Acanthoscurria paulensis* (Theraphosidae) spider venom. *Toxicon* 61, 129–138. doi:10.1016/j.toxicon.2012.11.008
- Nanayakkara, R.P., Ganehiarachchi, G.A.S.M., Vishvanath, N., Kusuminda, T.G.T.,

2015. Discovery of the Critically Endangered Tarantula Species of the Genus *Poecilotheria* (Araneae: Theraphosidae), *Poecilotheria hanumavilasumica*, from Sri Lanka. *J. Asia-Pacific Biodivers.* 8, 1–6. doi:10.1016/j.japb.2015.01.002
- Nentwig, W., 2013. Spider ecophysiology. *Spider Ecophysiol.* 1–529. doi:10.1007/978-3-642-33989-9
- Newcomb, R., Szoke, B., Palma, A., Wang, G., Chen, X.H., Hopkins, W., Cong, R., Miller, J., Urge, L., Tarczy-Hornoch, K., Loo, J.A., Dooley, D.J., Nadasdi, L., Tsien, R.W., Lemos, J., Miljanich, G., 1998. Selective peptide antagonist of the class E calcium channel from the venom of the tarantula *Hysteroecrates gigas*. *Biochemistry* 37, 15353–15362. doi:10.1021/bi981255g
- Olivera, B.M., Hillyard, D.R., Marsh, M., Yoshikami, D., 1995. Combinatorial peptide libraries in drug design: lessons from venomous cone snails. *Trends Biotechnol.* 13, 422–426. doi:10.1016/S0167-7799(00)88996-9
- Ono, S., Kimura, T., Kubo, T., 2011. Characterization of voltage-dependent calcium channel blocking peptides from the venom of the tarantula *Grammostola rosea*. *Toxicon* 58, 265–276. doi:10.1016/j.toxicon.2011.06.006
- Osteen, J.D., Herzig, V., Gilchrist, J., Emrick, J.J., Zhang, C., Wang, X., Castro, J., Garcia-Caraballo, S., Grundy, L., Rychkov, G.Y., Weyer, A.D., Dekan, Z., Undheim, E.A.B., Alewood, P., Stucky, C.L., Brierley, S.M., Basbaum, A.I., Bosmans, F., King, G.F., Julius, D., 2016. Selective spider toxins reveal a role for the Nav1.1 channel in mechanical pain. *Nature* 534, 494–499. doi:10.1038/nature17976
- Palagi, A., Koh, J.M.S., Leblanc, M., Wilson, D., Dutertre, S., King, G.F., Nicholson, G.M., Escoubas, P., 2013. Unravelling the complex venom landscapes of lethal Australian funnel-web spiders (Hexathelidae: Atracinae) using LC-MALDI-TOF mass spectrometry. *J. Proteomics* 80, 292–310. doi:10.1016/j.jprot.2013.01.002
- Park, J.H., Carlin, K.P., Wu, G., Ilyin, V.I., Musza, L.L., Blake, P.R., Kyle, D.J., 2014. Studies examining the relationship between the chemical structure of Protoxin II and its activity on Voltage Gated Sodium Channels. *J. Med. Chem.* 57, 6623–6631. doi:10.1021/jm500687u
- Pérez-Miles, F., Perafán, C., Santamaría, L., 2015. Tarantulas (Araneae: Theraphosidae) use different adhesive pads complementarily during climbing on smooth surfaces: experimental approach in eight arboreal and burrower species. *Biol. Open* 1–6. doi:10.1242/bio.013144
- Petersen, S.D., Mason, T., Akber, S., West, R., White, B., Wilson, P., 2007. Species identification of tarantulas using exuviae for international wildlife law enforcement. *Conserv. Genet.* 8, 497–502. doi:10.1007/s10592-006-9173-2
- Pimentel, C., Choi, S.-J., Chagot, B., Glette, C., Camadro, J.-M., Darbon, H., 2006. Solution structure of PcFK1, a spider peptide active against *Plasmodium falciparum*. *Protein Sci.* 15, 628–34. doi:10.1110/ps.051860606
- Pineda, S.S., Sollod, B.L., Wilson, D., Darling, A., Sunagar, K., Undheim, E.A.B., Kely, L., Antunes, A., Fry, B.G., King, G.F., 2014a. Diversification of a single ancestral gene into a successful toxin superfamily in highly venomous Australian funnel-web spiders. *BMC Genomics* 15, 177. doi:10.1186/1471-2164-15-177
- Pineda, S.S., Undheim, E.A., Rupasinghe, D.B., Ikononopoulou, M.P., King, G.F., 2014b. Spider venomics: implications for drug discovery. *Futur. Med. Chem* 6,

- 1699–1714. doi:10.4155/FMC.14.103
- Pouraghaei, M., Vahdati, S.S., Mashhadi, I., Mahmoudieh, T., 2015. Periumbilical Pain with Radiation to Both Legs Following Tarantula Bite ; a Case Report 3, 120–121.
- Prashanth, J.R., Hasaballah, N., Vetter, I., 2017. Pharmacological screening technologies for venom peptide discovery. *Neuropharmacology*. doi:10.1016/j.neuropharm.2017.03.038
- Quinton, L., Escoubas, P., Quinton, L., Nicholson, G.M., 2016. Venomics : Unravelling the complexity of animal venoms with mass spectrometry SPECIAL FEATURE : Venomics : unravelling the complexity of animal venoms with mass spectrometry. doi:10.1002/jms.1389
- Rash, L.D., Hodgson, W.C., 2001. Pharmacology and biochemistry of spider venoms. *Toxicon* 40, 225–254. doi:10.1016/S0041-0101(01)00199-4
- Rocha-e-Silva, T.A.A., Rostelato-Ferreira, S., Leite, G.B., da Silva, P.I., Hyslop, S., Rodrigues-Simioni, L., 2013. VdTX-1, a reversible nicotinic receptor antagonist isolated from venom of the spider *Vitalius dubius* (Theraphosidae). *Toxicon* 70, 135–141. doi:10.1016/j.toxicon.2013.04.020
- 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. doi:10.1016/j.toxicon.2017.07.001
- Rong, M., Chen, J., Tao, H., Wu, Y., Jiang, P., Lu, M., Su, H., Chi, Y., Cai, T., Zhao, L., Zeng, X., Xiao, Y., Liang, S., 2011. Molecular basis of the tarantula toxin jingzhaotoxin-III (β -TRTX-Cj1 α) interacting with voltage sensors in sodium channel subtype Nav1.5. *FASEB J.* 25, 3177–3185. doi:10.1096/fj.10-178848
- Ryan, N., Buckley, N., Graudins, A., 2017. Treatments for Latrodectism—A Systematic Review on Their Clinical Effectiveness. *Toxins (Basel)*. 9, 148. doi:10.3390/toxins9040148
- Saez, N.J., Deplazes, E., Cristofori-Armstrong, B., Chassagnon, I.R., Lin, X., Mobli, M., Mark, A.E., Rash, L.D., King, G.F., 2015. Molecular dynamics and functional studies define a hot spot of crystal contacts essential for PcTx1 inhibition of acid-sensing ion channel 1a. *Br. J. Pharmacol.* 172, 4985–4995. doi:10.1111/bph.13267
- Saez, N.J., Mobli, M., Bieri, M., Chassagnon, I.R., Malde, A.K., Gamsjaeger, R., Mark, A.E., Gooley, P.R., Rash, L.D., King, G.F., 2011. A Dynamic Pharmacophore Drives the Interaction between Psalmotoxin-1 and the Putative Drug Target Acid-Sensing Ion Channel 1a. *Mol. Pharmacol.* 80, 796–808. doi:10.1124/mol.111.072207
- Saez, N.J., Senff, S., Jensen, J.E., Er, S.Y., Herzig, V., Rash, L.D., King, G.F., 2010. Spider-venom peptides as therapeutics. *Toxins (Basel)*. 2, 2851–2871. doi:10.3390/toxins2122851
- Siemens, J., Zhou, S., Piskowski, R., Nikai, T., Lumpkin, E.A., Basbaum, A.I., King, D., Julius, D., 2006. Spider toxins activate the capsaicin receptor to produce inflammatory pain. *Nature* 444, 208–212. doi:10.1038/nature05285
- Skinner, W.S., Dennis, P.A., Lui, A., Carney, R.L., Quistad, G.B., 1990. Chemical

- characterization of acylpolyamine toxins from venom of a trap-door spider and two tarantulas. *Toxicon* 28, 541–546. doi:10.1016/0041-0101(90)90298-L
- Smith P.K., Krohn R. I., Hermanson G. T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J., Klen D.C. 1985 Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Anal Biochem* 150, 76–85
- Smith, J.J., Herzig, V., King, G.F., Alewood, P.F., 2013. The insecticidal potential of venom peptides. *Cell. Mol. Life Sci.* 70, 3665–3693. doi:10.1007/s00018-013-1315-3
- Sollod, B.L., Wilson, D., Zhaxybayeva, O., Gogarten, J.P., Drinkwater, R., King, G.F., 2005. Were arachnids the first to use combinatorial peptide libraries? *Peptides* 26, 131–139. doi:10.1016/j.peptides.2004.07.016
- Steen, H., Mann, M., 2004. The abc's (and xyz's) of peptide sequencing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 699–711. doi:10.1038/nrm1468
- Sutti, R., Tamascia, M.L., Hyslop, S., Rocha-E-Silva, T.A.A., 2014. Purification and characterization of a hyaluronidase from venom of the spider *Vitalius dubius* (Araneae, Theraphosidae). *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis* 20, 2. doi:10.1186/1678-9199-20-2
- Tang, X., Zhang, Y., Hu, W., Xu, D., Tao, H., Yang, X., Li, Y., Jiang, L., Liang, S., 2010. Molecular diversification of peptide toxins from the tarantula *Haplopelma hainanum* (*Ornithoctonus hainana*) venom based on transcriptomic, peptidomic, and genomic analyses. *J. Proteome Res.* 9, 2550–2564. doi:10.1021/pr1000016
- Tao, H., Chen, J.J., Xiao, Y.C., Wu, Y.Y., Su, H.B., Li, D., Wang, H.Y., Deng, M.C., Wang, M.C., Liu, Z.H., Liang, S.P., 2013. Analysis of the interaction of tarantula toxin jingzhaotoxin-III (β -TRTX-Cj1 α) with the voltage sensor of Kv2.1 Uncovers the molecular basis for cross-activities on Kv2.1 and Nav1.5 channels. *Biochemistry* 52, 7439–7448. doi:10.1021/bi4006418
- Tao, H., Chen, X., Deng, M., Xiao, Y., Wu, Y., Liu, Z., Zhou, S., He, Y., Liang, S., 2016. Interaction site for the inhibition of tarantula Jingzhaotoxin-XI on voltage-gated potassium channel Kv2.1. *Toxicon* 124, 8–14. doi:10.1016/j.toxicon.2016.10.019
- Tedore, T., Weinberg, R., Witkin, L., Giambone, G.P., Faggiani, S.L., Fleischut, P.M., 2015. Acute Pain Management/Regional Anesthesia. *Anesthesiol. Clin.* 33, 739–751. doi:10.1016/j.anclin.2015.07.005
- Therapeutics, H., 2011. Venoms to Drugs 4, *Toxicon*. doi:10.1016/j.toxicon.2011.01.009
- Touchard, A., Koh, J.M.S., Aili, S.R., Dejean, A., Nicholson, G.M., Orivel, J., Escoubas, P., 2015. The complexity and structural diversity of ant venom peptidomes is revealed by mass spectrometry profiling. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 29, 385–396. doi:10.1002/rcm.7116
- Utkin, Y.N., 2015. *World Journal of Biological Chemistry* © 2015 6, 28–34. doi:10.4331/wjbc.v6.i2.28
- Vassilevski, a a, Kozlov, S. a, Grishin, E. V, 2009. Molecular Diversity of Spider Venom. *Biochem.* 74, 1505–1534. doi:10.1134/S0006297909130069
- Wahby, A.F., Mahdy, E.S.M.E., EL-mezayen, H.A., Salama, W.H., Ebrahim, N.M., Abdel-Aty, A.M., Fahmy, A.S., 2012. Role of hyaluronidase inhibitors in the neutralization of toxicity of Egyptian horned viper *Cerastes cerastes* venom. *J.*

- Genet. Eng. Biotechnol. 10, 213–219. doi:10.1016/j.jgeb.2012.10.001
- Weiss, J., Pyrski, M., Jacobi, E., Bufe, B., Willnecker, V., Schick, B., Zizzari, P., Gossage, S.J., Greer, C.A., Leinders-Zufall, T., Woods, C.G., Wood, J.N., Zufall, F., 2011. Loss-of-function mutations in sodium channel Nav1.7 cause anosmia. Nature 472, 186–190. doi:10.1038/nature09975
- Wilson, D.T.R., 2015. Spider Venoms 1–20. doi:10.1007/978-94-007-6646-4
- World Spider Catalog (2017). World Spider Catalog. Natural History Museum Bern, online at <http://wsc.nmbe.ch>, version 18.5, accessed on {23/10/17}. doi: 10.24436/2
- Zamponi, G.W., Striessnig, J., Koschak, A., Dolphin, A.C., 2015. The Physiology, Pathology, and Pharmacology of Voltage-Gated Calcium Channels and Their Future Therapeutic Potential. Pharmacol. Rev. 67, 821–870. doi:10.1124/pr.114.009654
- Zhang, S., Gao, B., Zhu, S., 2015. Evolution of Venomous Animals and Their Toxins. doi:10.1007/978-94-007-6727-0
- Zhang, Y., 2015. Why do we study animal toxins? Dongwuxue. Yanjiu. 36, 183–222. doi:10.13918/j.issn.2095

12.ANEXO

Espectros de líneas de masas de las fracciones separadas mediante 'RP-HPLC' del veneno de tarántulas hembras de la especie *P. regalis*.

'Peptide mass fingerprint' de las toxinas peptídicas presentes en el veneno de *P. regalis*'

CONTENIDO

PÁGINA

Figura A1. Espectro de líneas de los péptidos presentes en la fracción 6	77
Figura A2. Espectro de líneas de los péptidos presentes en la fracción 7	78
Figura A3. Espectro de líneas de los péptidos presentes en la fracción 8	79
Figura A4. Espectro de líneas de los péptidos presentes en la fracción 9	80
Figura A5. Espectro de líneas de los péptidos presentes en la fracción 10	81
Figura A6. Espectro de líneas de los péptidos presentes en la fracción 11	82
Figura A7. Espectro de líneas de los péptidos presentes en la fracción 12	83
Figura A8. Espectro de líneas de los péptidos presentes en la fracción 13	84
Figura A9. Espectro de líneas de los péptidos presentes en la fracción 14	85
Figura A10. Espectro de líneas de los péptidos presentes en la fracción 15	86
Figura A11. Espectro de líneas de los péptidos presentes en la fracción 16	87
Figura A12. Espectro de líneas de los péptidos presentes en la fracción 17	88
Figura A13. Espectro de líneas de los péptidos presentes en la fracción 18	89
Figura A14. Espectro de líneas de los péptidos presentes en la fracción 19	90
Figura A15. Espectro de líneas de los péptidos presentes en la fracción 20	91
Figura A16. Espectro de líneas de los péptidos presentes en la fracción 21	92
Figura A17. Espectro de líneas de los péptidos presentes en la fracción 22	93
Figura A18. Espectro de líneas de los péptidos presentes en la fracción 23	94

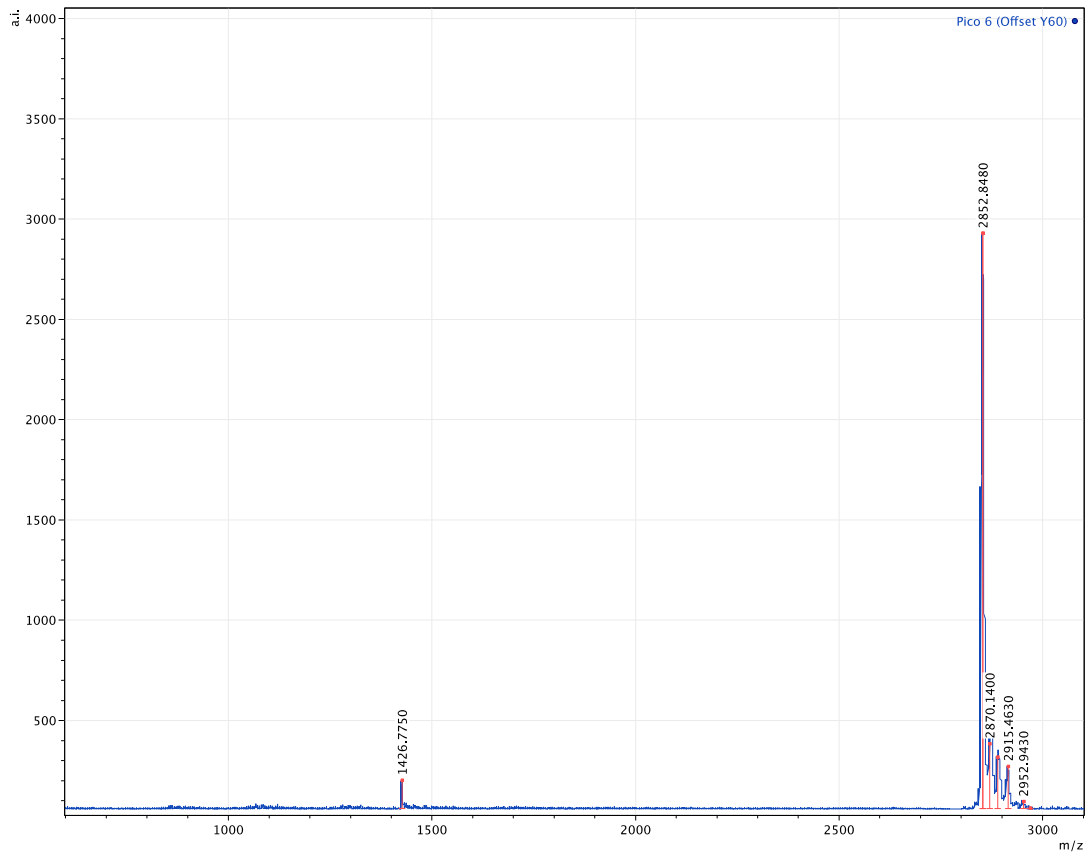


Figura A1. Espectro de líneas de los péptidos presentes en la fracción 6 separada mediante 'RP-HPLC' del veneno de tarántulas hembras de *P. regalis*.

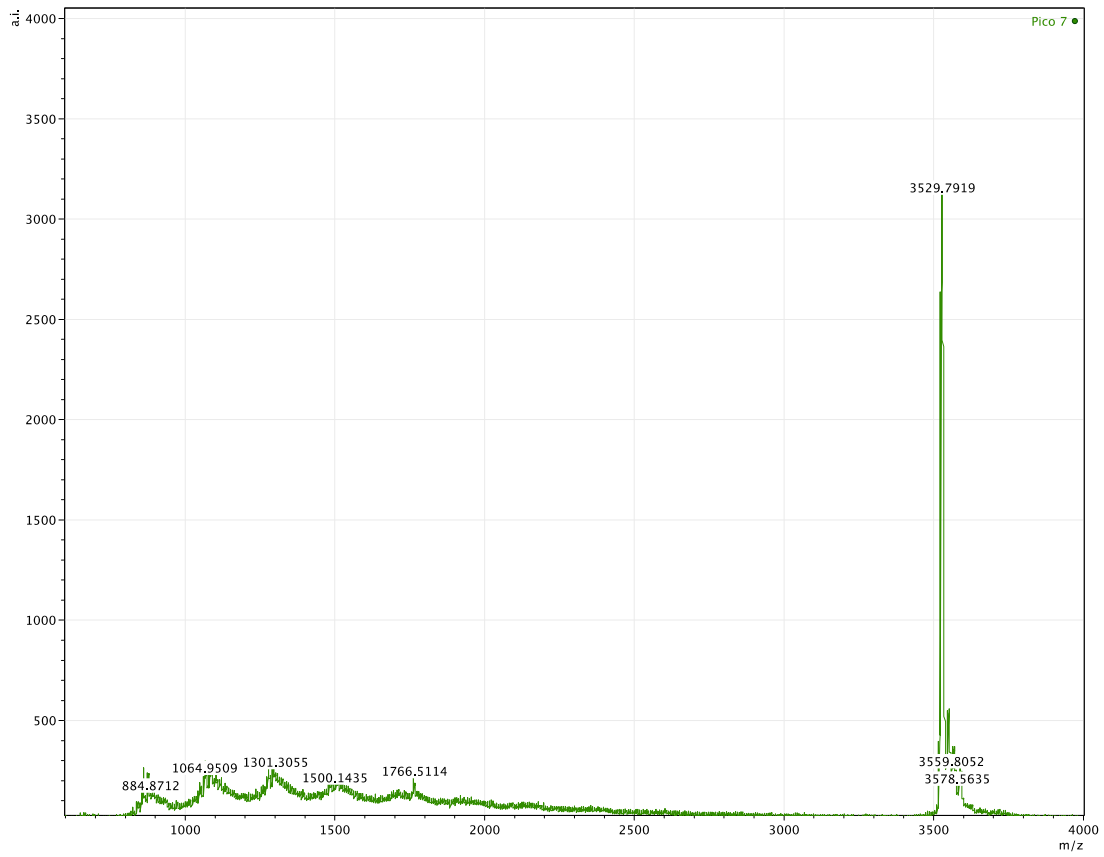


Figura A2. Espectro de líneas de los péptidos presentes en la fracción 7 separada mediante 'RP-HPLC' del veneno de tarántulas hembras de *P. regalis*.

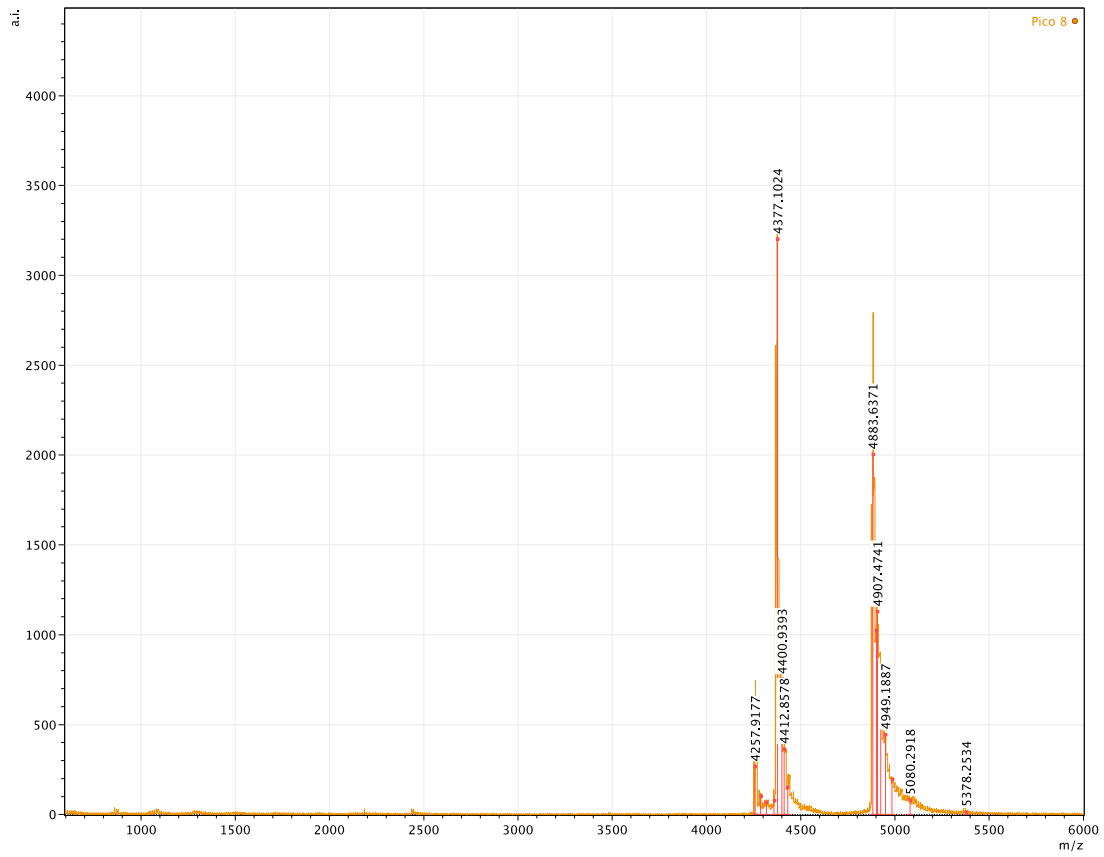


Figura A3. Espectro de líneas de los péptidos presentes en la fracción 8 separada mediante 'RP-HPLC' del veneno de tarántulas hembras de *P. regalis*.

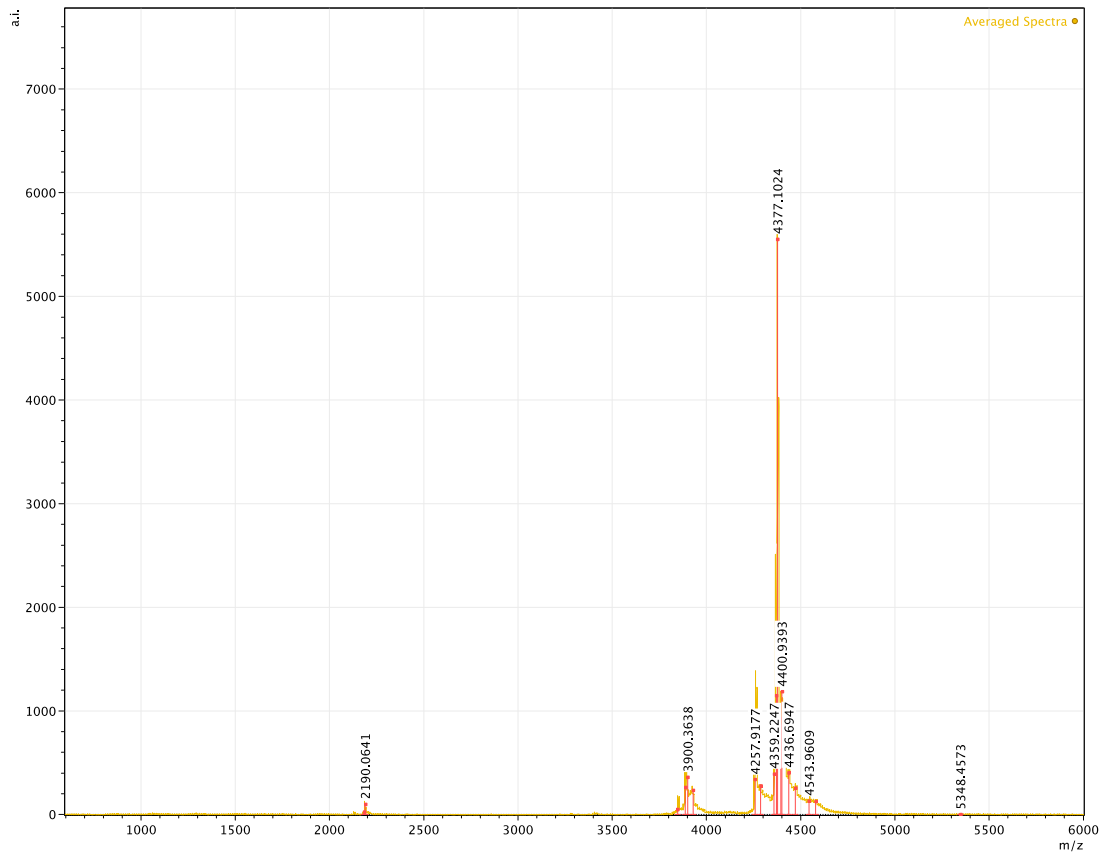


Figura A4. Espectro de líneas de los péptidos presentes en la fracción 9 separada mediante 'RP-HPLC' del veneno de tarántulas hembras de *P. regalis*.

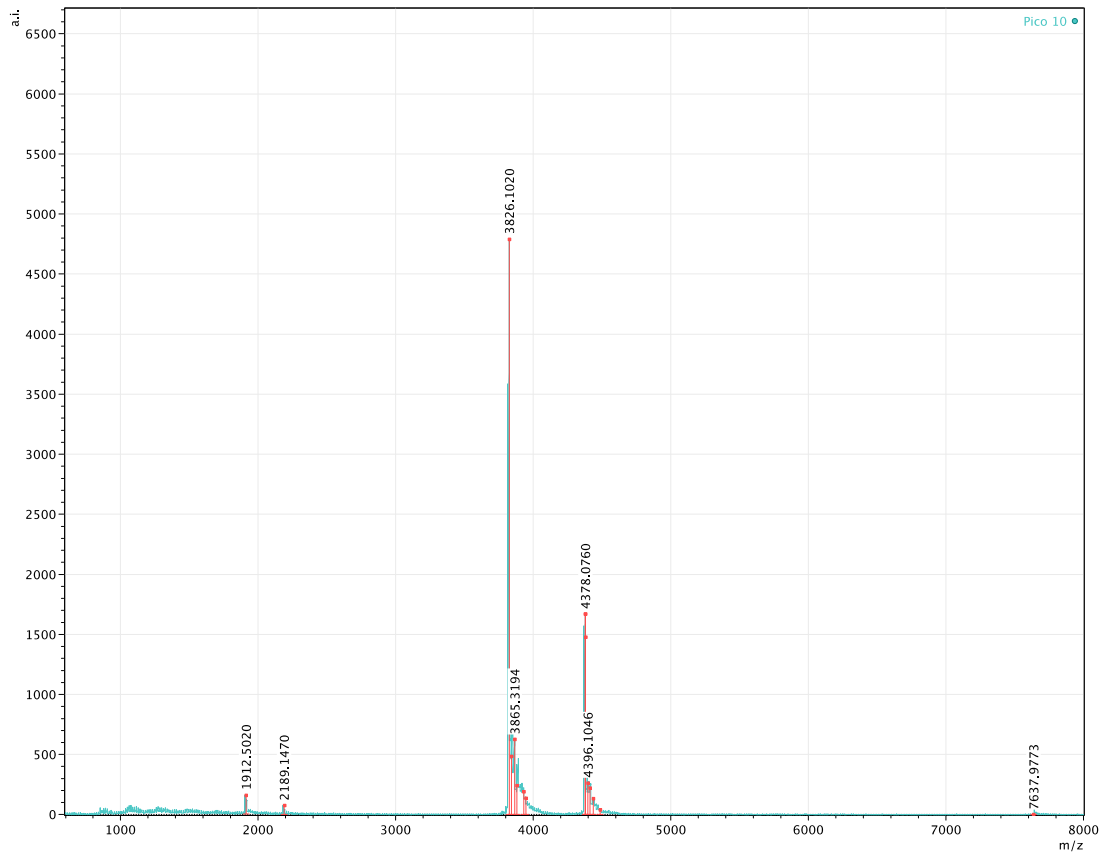


Figura A5. Espectro de líneas de los péptidos presentes en la fracción 10 separada mediante 'RP-HPLC' del veneno de tarántulas hembras de *P. regalis*.

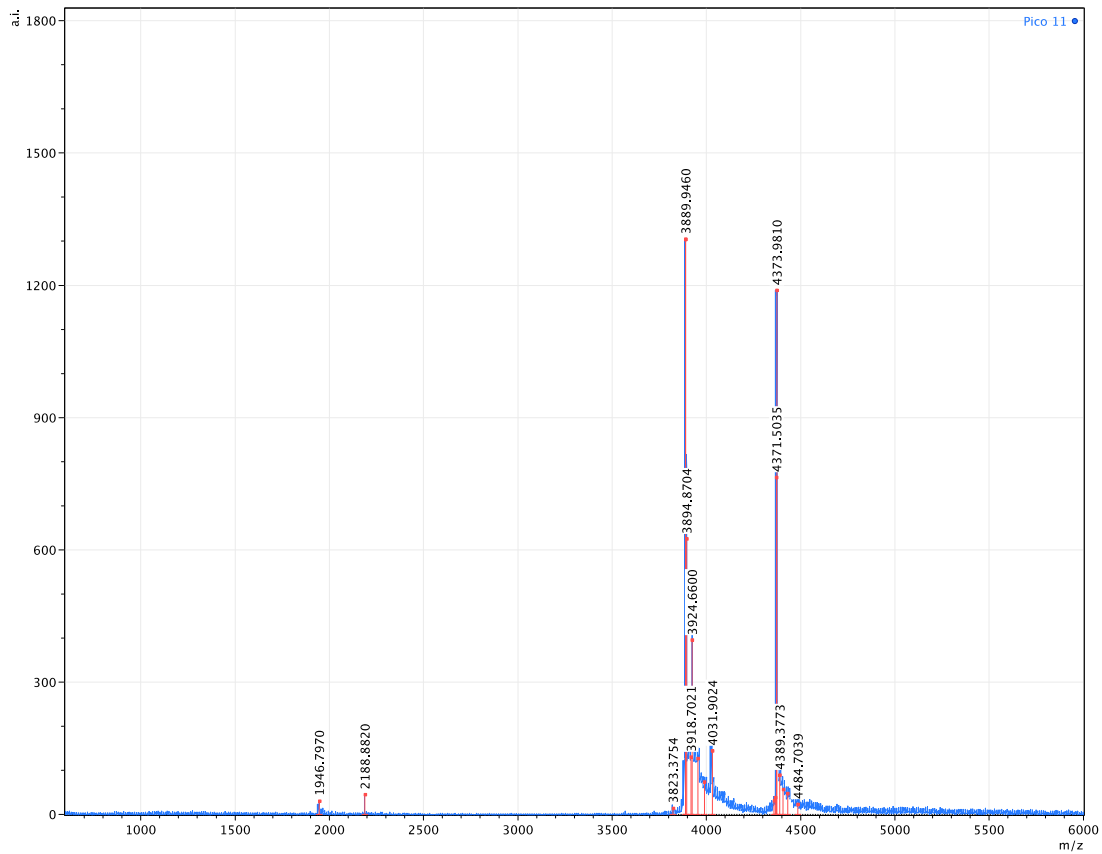


Figura A6. Espectro de líneas de los péptidos presentes en la fracción 11 separada mediante 'RP-HPLC' del veneno de tarántulas hembras de *P. regalis*.

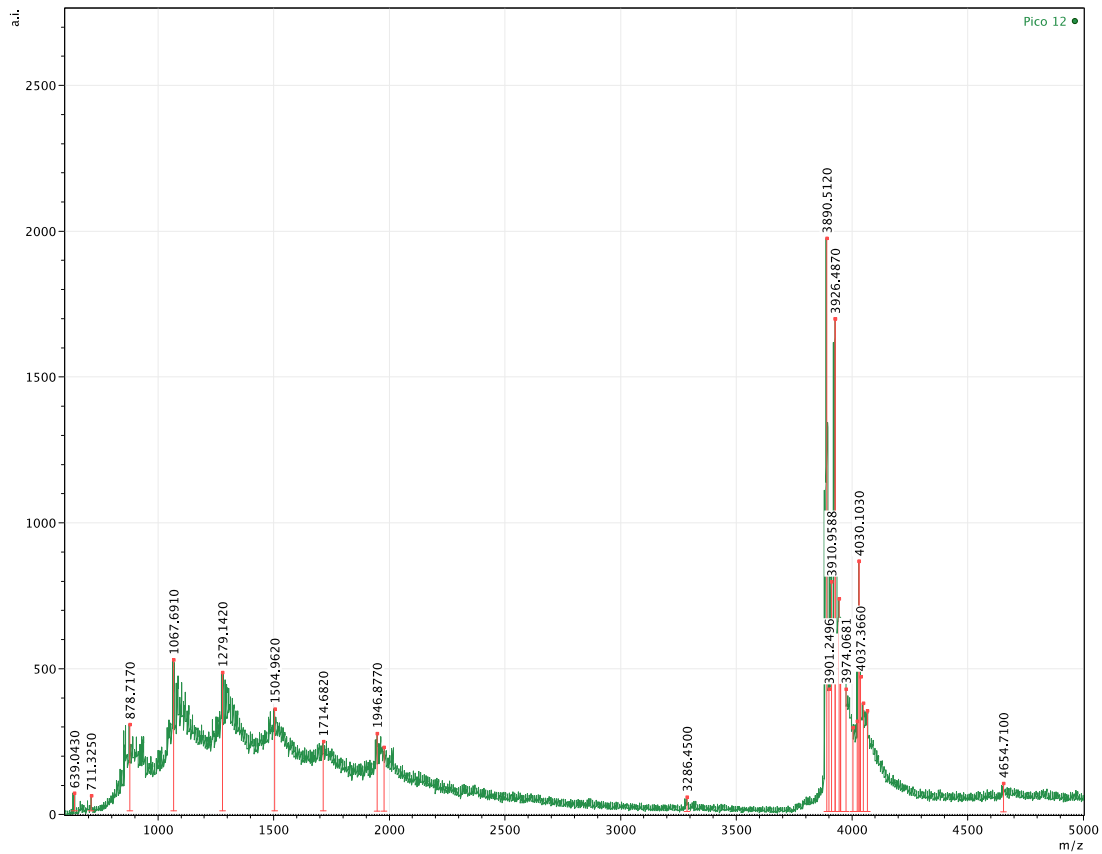


Figura A7. Espectro de líneas de los péptidos presentes en la fracción 12 separada mediante 'RP-HPLC' del veneno de tarántulas hembras de *P. regalis*.

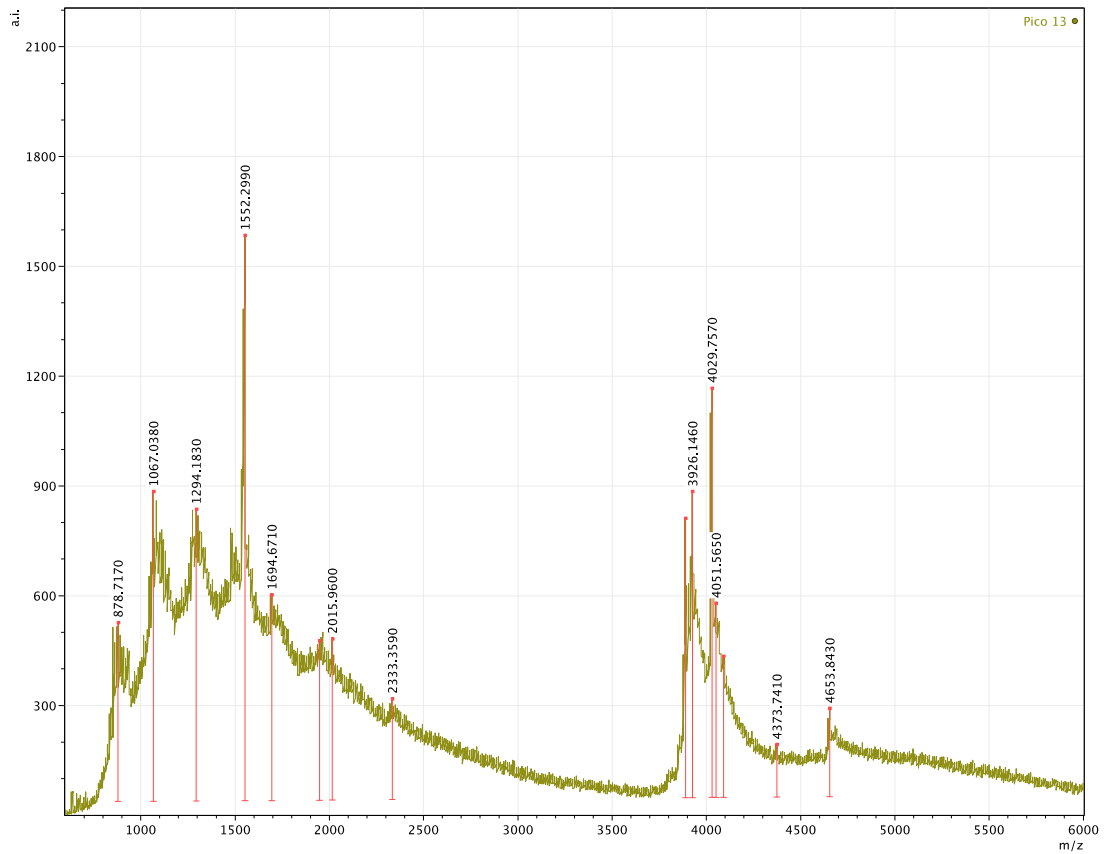


Figura A8. Espectro de líneas de los péptidos presentes en la fracción 13 separada mediante 'RP-HPLC' del veneno de tarántulas hembras de *P. regalis*.

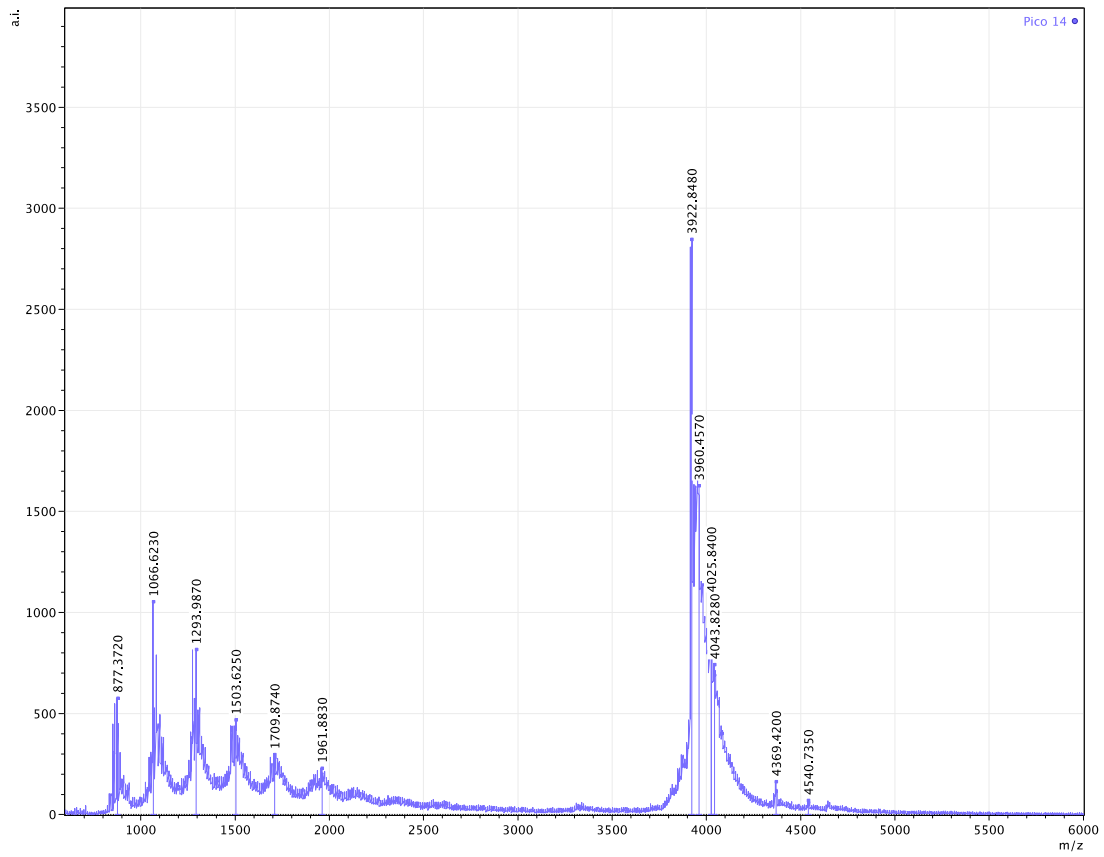


Figura A9. Espectro de líneas de los péptidos presentes en la fracción 14 separada mediante 'RP-HPLC' del veneno de tarántulas hembras de *P. regalis*.

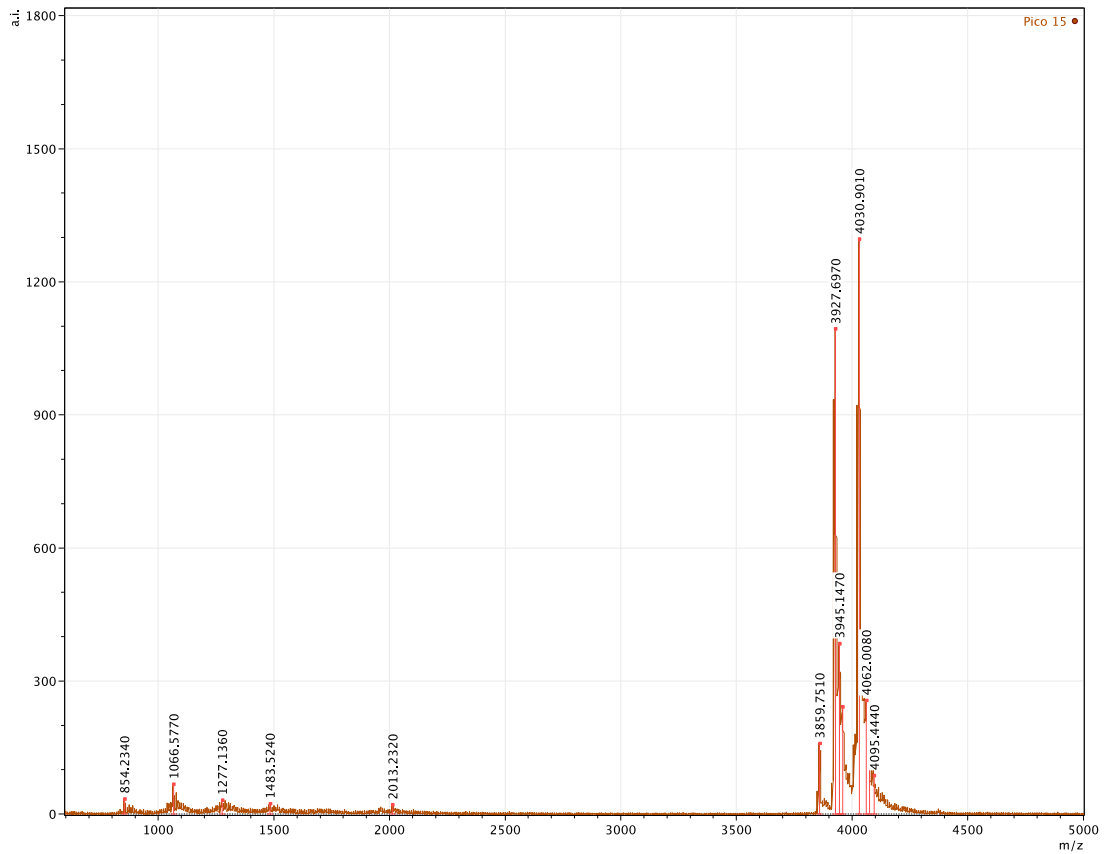


Figura A10. Espectro de líneas de los péptidos presentes en la fracción 15 separada mediante 'RP-HPLC' del veneno de tarántulas hembras de *P. regalis*.

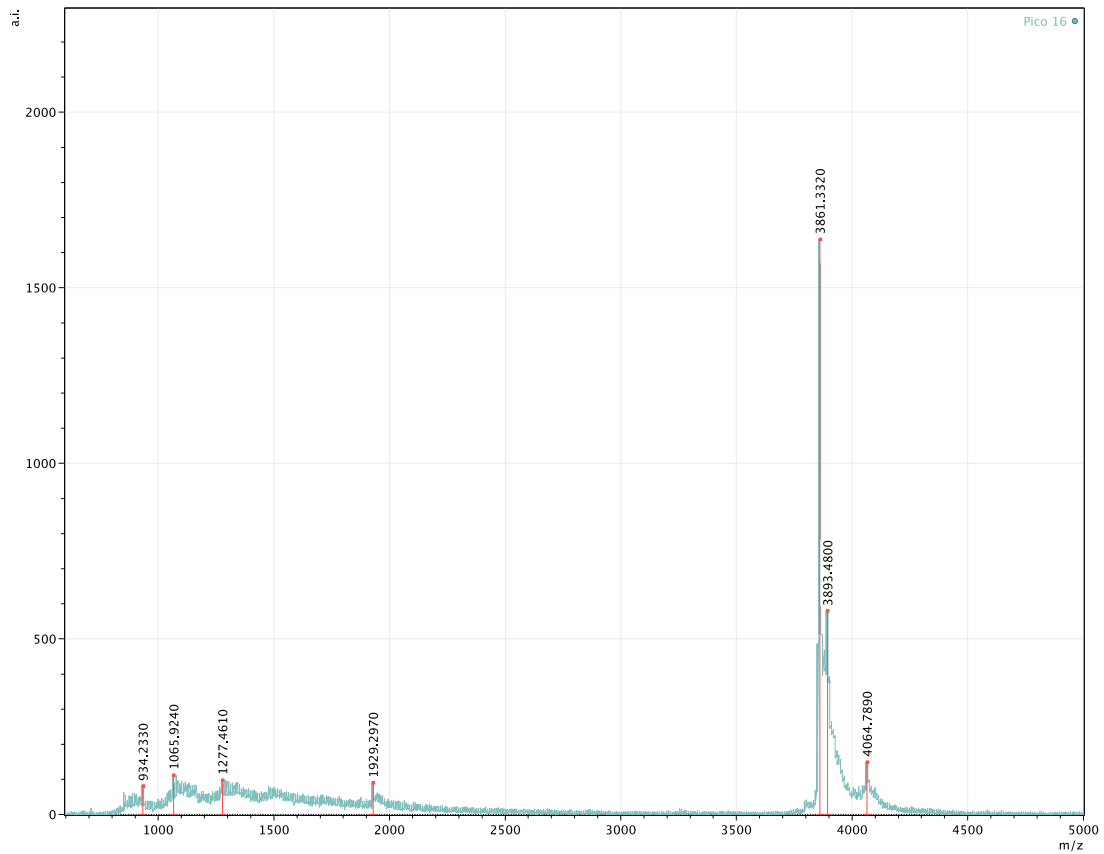


Figura A11. Espectro de líneas de los péptidos presentes en la fracción 16 separada mediante 'RP-HPLC' del veneno de tarántulas hembras de *P. regalis*.

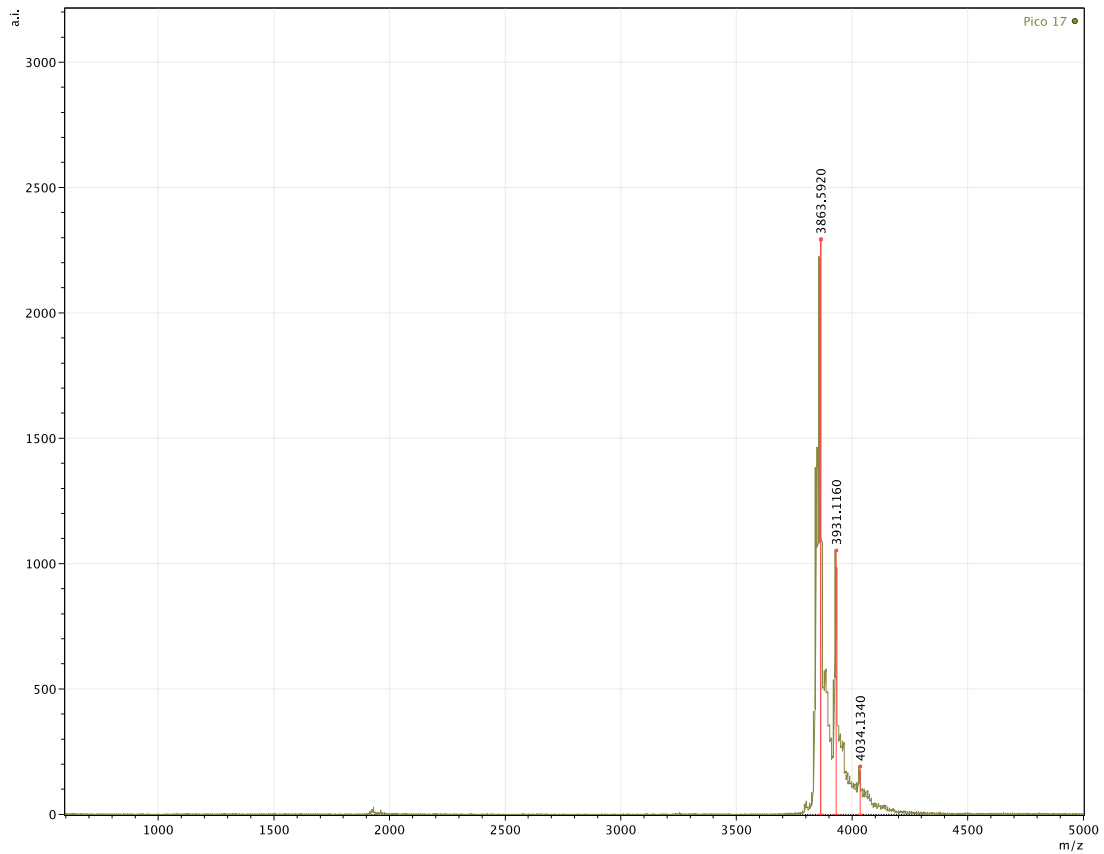


Figura A12. Espectro de líneas de los péptidos presentes en la fracción 17 separada mediante 'RP-HPLC' del veneno de tarántulas hembras de *P. regalis*.

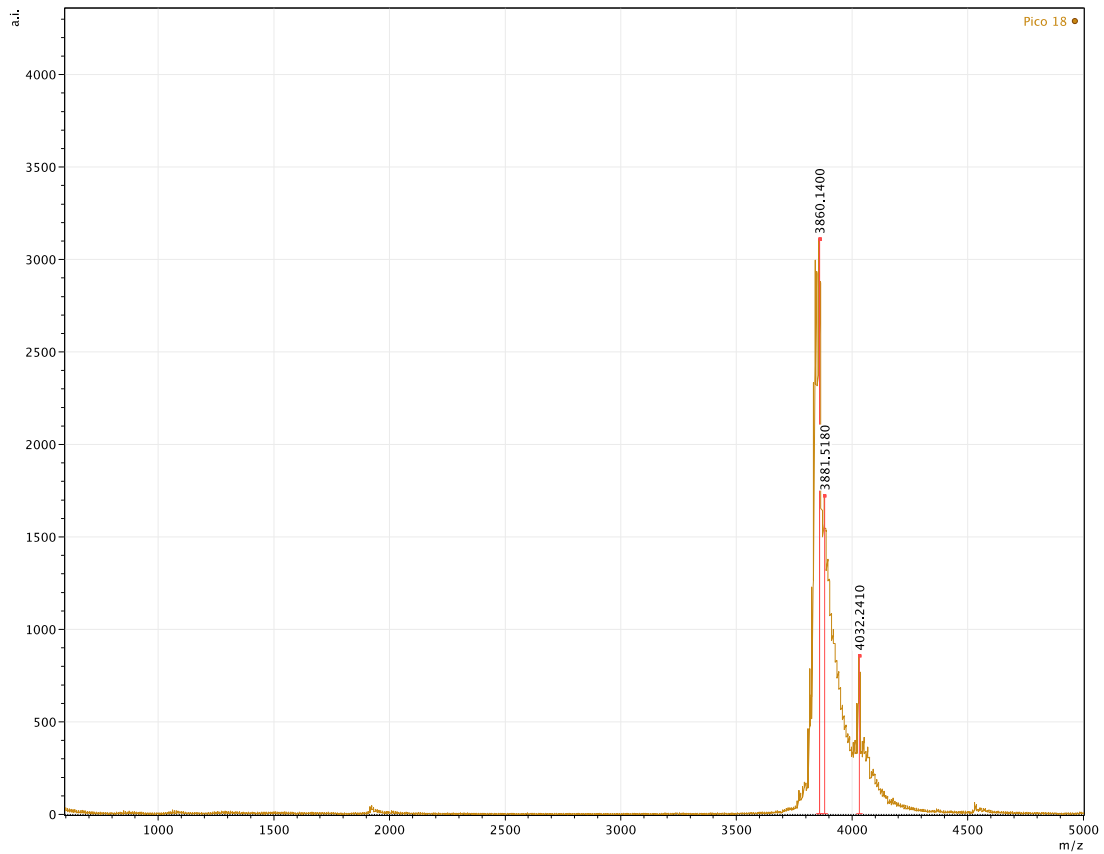


Figura A13. Espectro de líneas de los péptidos presentes en la fracción 18 separada mediante 'RP-HPLC' del veneno de tarántulas hembras de *P. regalis*.

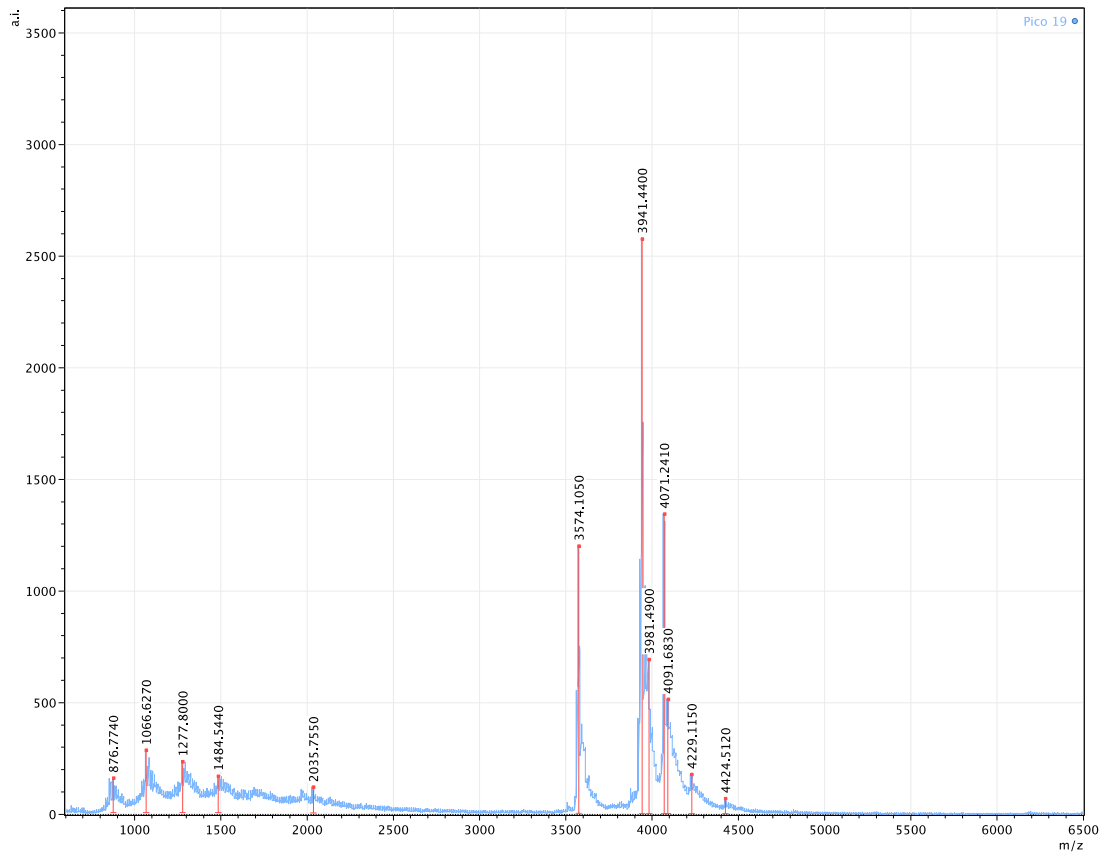


Figura A14. Espectro de líneas de los péptidos presentes en la fracción 19 separada mediante 'RP-HPLC' del veneno de tarántulas hembras de *P. regalis*.

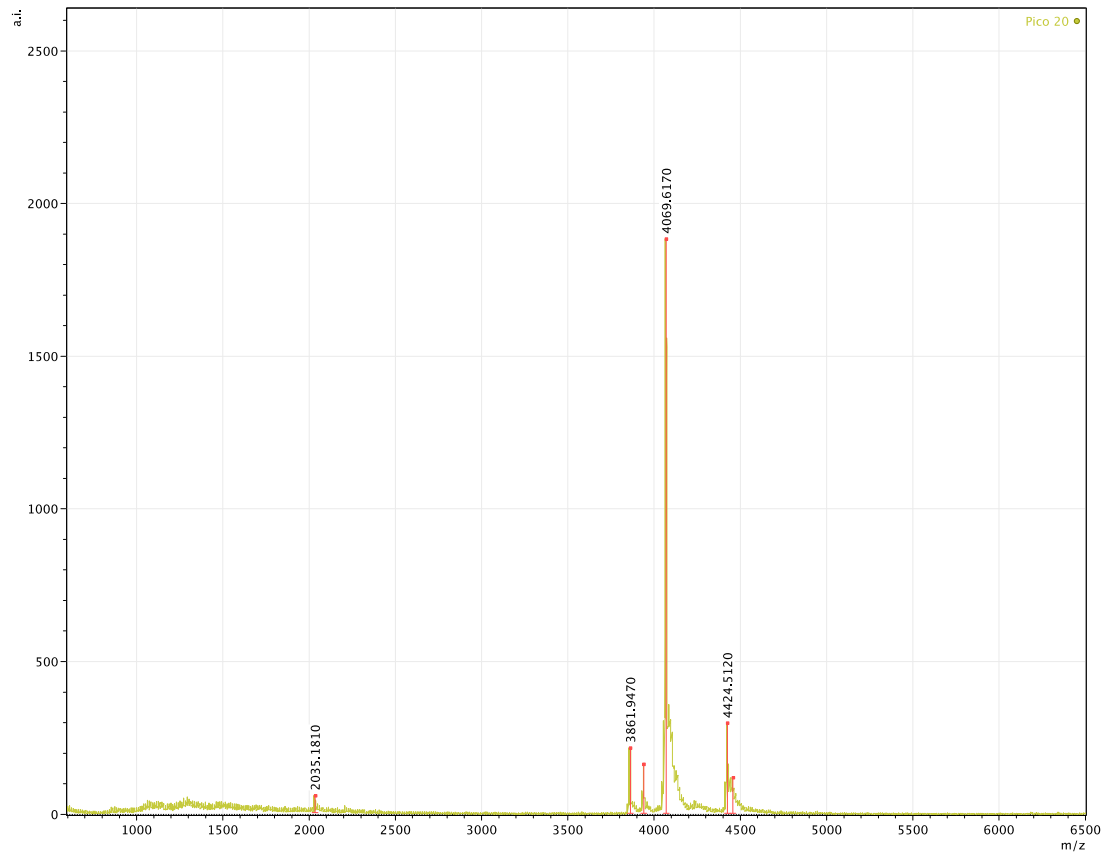


Figura A15. Espectro de líneas de los péptidos presentes en la fracción 20 separada mediante 'RP-HPLC' del veneno de tarántulas hembras de *P. regalis*.

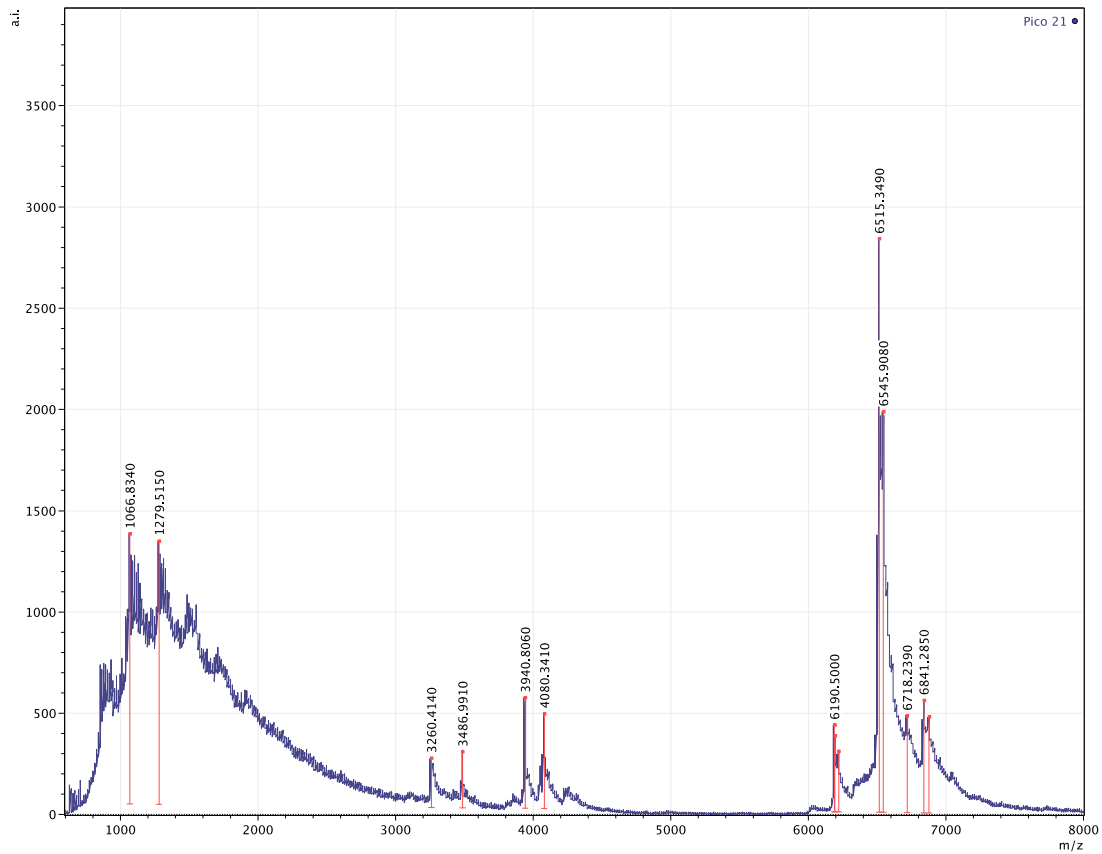


Figura A16. Espectro de líneas de los péptidos presentes en la fracción 21 separada mediante 'RP-HPLC' del veneno de tarántulas hembras de *P. regalis*.

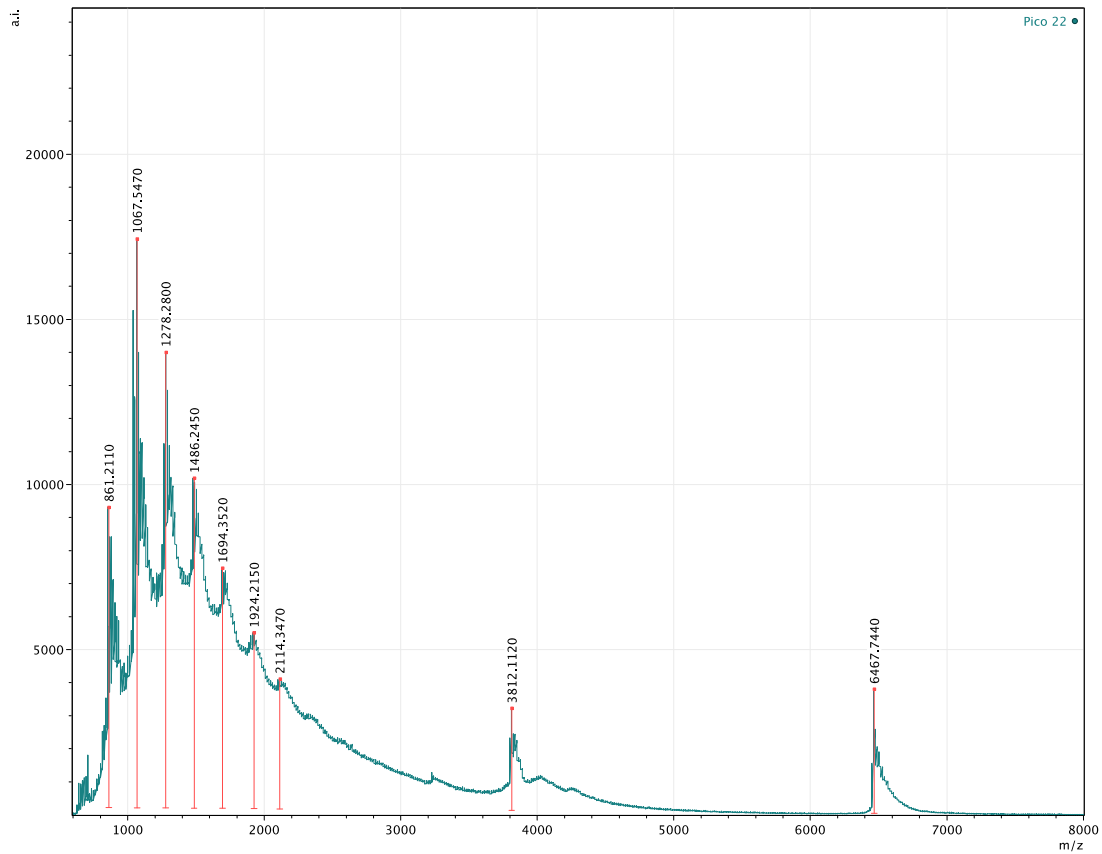


Figura A17. Espectro de líneas de los péptidos presentes en la fracción 22 separada mediante 'RP-HPLC' del veneno de tarántulas hembras de *P. regalis*.

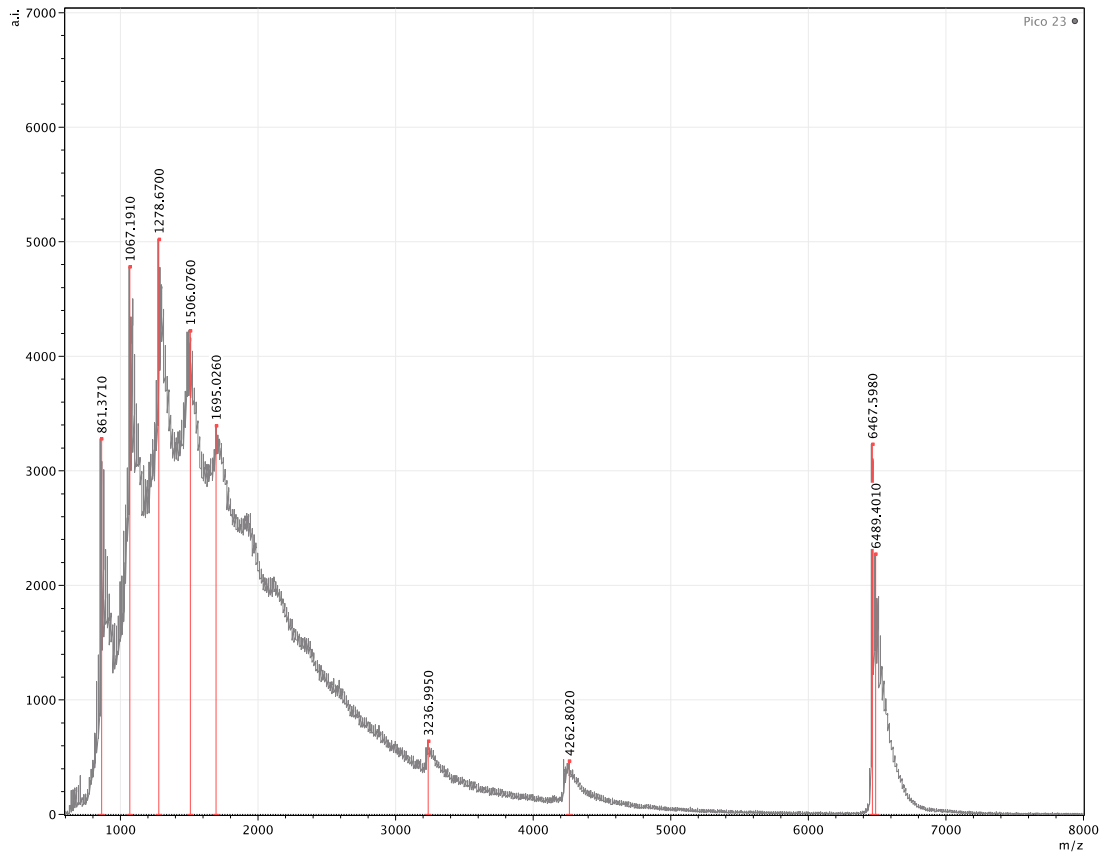


Figura A18. Espectro de líneas de los péptidos presentes en la fracción 23 separada mediante 'RP-HPLC' del veneno de tarántulas hembras de *P. regalis*.