



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA SEDA DE LA
TARÁNTULA *Cotztetlana* spp. Y DETERMINACIÓN DE SU
EFECTO ANTIMICROBIANO”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

JUAN PABLO MARTÍNEZ FLORES

DIRIGIDA POR

Dr. JUAN JOEL MOSQUEDA GUALITO

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2023



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales
de Información



CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA SEDA DE LA
TARÁNTULA *Cotztetlana* spp. Y DETERMINACIÓN
DE SU EFECTO ANTIMICROBIANO

por

Juan Pablo Martínez Flores

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

Clave RI: FQLIN-248133



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA SEDA DE LA
TARÁNTULA *Cotztetlana* spp. Y DETERMINACIÓN DE
SU EFECTO ANTIMICROBIANO”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

JUAN PABLO MARTÍNEZ FLORES

DIRIGIDA POR

DR. JUAN JOEL MOSQUEDA GUALITO

SINODALES

DR. JUAN JOEL MOSQUEDA GUALITO

DIRECTOR

DRA. EVELYN ZAMUDIO PÉREZ

SINODAL

DRA. MONSERRAT ESCAMILLA GARCIA

SINODAL

M. EN C. LUIS FERNANDO DIAZ PEÑA

SINODAL

Three horizontal lines with handwritten signatures in blue ink above them, corresponding to the sinodal members listed on the left.

AGRADECIMIENTOS

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

A mi hermano que siempre estuvo ahí demostrando confianza en apoyarme en todo lo que pudiese necesitar.

A Gracia Alejandra por estar siempre a mi lado y motivarme para seguir creciendo, y por depositar toda su confianza en mí y demostrarme que todo puede ser posible.

A mis amigos, Juan Jesús, Uriel, Alex, David por estar ahí cada momento en el que su apoyo fue incondicional y valioso.

A mis amigas Abi, Cami, Vale, Sofi y Jaz que forman parte de mi vida y son una gran motivación para salir adelante.

A todos los compañeros con los que coincidí alrededor de toda la carrera.

Al Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito por confiar en mí desde el primer momento en que decidió apoyarme en mis proyectos y mi visión.

A Edwin Esaú por apoyarme en cada experimento realizado y compartirme sus conocimientos y amor por la ciencia.

Al biólogo y amigo Luis Cuellar que sin duda estuvo presente en todo el recorrido de este proyecto al ayudarme con su manejo y al compartir amplios conocimientos acerca de los arácnidos.

A Luis Fernando Diaz quien fue parte fundamental para desarrollar este proyecto y me apoyó con todos sus recursos para poder creer en la ciencia y compartirme todos los consejos para seguir desarrollándome como investigador.

A todo el equipo del laboratorio de Inmunología, Diego, Andrés, Iván, Ronaldo, Mayra por enseñarme, guiarme y ser grandes compañeros en todo el transcurso de este proyecto, sin duda sin su ayuda esto no hubiese sido posible.

A la Dra. Evelyn Zamudio que me apoyó y confió desde la distancia observando los inicios de este proyecto.

Al Dr. Jorge Noel Gracida que fue mi tutor y profesor a lo largo de la licenciatura y me demostró que no hay que tener miedo para aprender.

A la Dra. Monserrat Escamilla que fue una gran profesora que demostraba tener pasión por la enseñanza y amor a su profesión.

Al Aracnario de la facultad de Ciencias Naturales que me permitió trabajar en sus instalaciones y pude aprender más sobre el tema con arácnidos.

Contenido	Página
ÍNDICE DE CUADROS.....	V
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VI
RESUMEN.....	VII
1. ANTECEDENTES.....	1
1.1 Resistencia bacteriana y nuevas alternativas para combatirla	1
1.2 Sistema inmune de artrópodos	2
1.3 Moléculas antimicrobianas y su presencia en la naturaleza	3
1.4 La seda y sus propiedades	5
1.5 La hilatura en arañas y la glándula ampulácea mayor.....	7
2. OBJETIVOS	10
2.1 General	10
2.1 Específicos.....	10
3. METODOLOGÍA.....	11
3.1 Recolección de especímenes	11
3.1.1 Extracción de seda.....	12
3.2 Solubilización de las fibras de seda y separación de sus compuestos proteínicos mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	12
3.3 Purificación por medio de diafiltración	13
3.4 Cuantificación de proteína (método de Bradford)	14
3.5 Identificación de los compuestos proteínicos de la seda	15
3.6 Prueba de sensibilidad antimicrobiana por microdilución.....	15
3.6.1 Análisis estadístico.....	16
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17
4.1 Extracción de seda y solubilización de las fibras de seda.....	17
4.2 Solubilización de las fibras de seda y separación de sus compuestos proteínicos mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	17
4.3 Análisis de espectrometría de masas MALDI-TOF y LC-MS/MS	20

4.4	Purificación y cromatografía de líquidos de alta resolución en fase reversa 'RP-HPLC'	22
4.5	Cuantificación de proteína (Método de Bradford).....	23
4.6	Análisis antimicrobiano por microdilución	24
5.	CONCLUSIONES	29
6.	BIBLIOGRAFÍA.....	30

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Tipos de AMP clasificados por su estructura según Téllez y col., 2010.....	4
Cuadro 2. Protocolo para la cuantificación de proteínas por el método de Bradford en microplaca.....	14
Cuadro 3. Tabla con los valores de inhibición bacteriana. Con un $T\alpha= 0.14$ obtenido del método de Tukey ningún valor tuvo diferencia significativa mayor al $T\alpha$, además del pocillo 3 el cual es el blanco utilizado.....	25

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

Figura 1. Esquema de gradientes de pH por los que pasa la pasta de hilado a través de la glándula Ampulácea mayor según Whittall y col., 2020.	8
Figura 2. Estrategia experimental.	11
Figura 3. Extracción de seda de tarántula usando dos capilares como carrete y servomotor programado con Arduino.	12
Figura 4. Perfil de electroforesis de las soluciones de seda obtenidas con HFIP y LiBr. Se observan bandas que corresponden a las proteínas extraídas de las fibras de seda, las cuales fueron tratadas con diferentes solventes (LiBr y HFIP).	18
Figura 5. Separación de las proteínas de bajo peso molecular presentes en la solución de seda mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de la solución de seda (C y D). La banda correspondiente a proteínas con masas moleculares cercanas a 17 kDa fueron cortadas para su posterior análisis. Así mismo, se aprecia como control las bandas correspondientes a las proteínas presentes en el veneno de tarántula (A y B).	19
Figura 6. Espectro de masas de los componentes presentes en la seda. La deconvolución de los iones presentes en este espectro indica que los iones no tienen relación entre sí. Por lo tanto, cada ion corresponde a una molécula distinta.	20
Figura 7. Visualización de 14 proteínas identificadas a partir de la secuenciación de las proteínas presentes en la banda obtenida mediante electroforesis de la figura 5. El análisis se realizó con el 99% de confianza.	21
Figura 8. Secuencias de las proteínas identificadas de toxinas por el programa Scaffold 5 y la coincidencia de los péptidos analizados.	22
Figura 9. Curva estándar de para la determinación de la concentración final de la muestra obtenida de seda de tarántula.	23
Figura 10. Esquema de la cuantificación por método de Bradford. Pocillo A1 y A2 se coloca la muestra M de seda purificada obteniendo una concentración de 0.5 mg/mL de proteína total.	24
Figura 11. Esquema de representación para los resultados obtenidos del análisis antimicrobiano por microdilución. Color más tenue (Ej. Carril A1) representa un poco o nulo crecimiento de bacterias. Color más opaco (Ej. Carril A3) representa la turbidez generada por el crecimiento de bacterias.	25

RESUMEN

Todos los seres vivos cuentan con alguna defensa contra microorganismos patógenos y las enfermedades, y los artrópodos no son la excepción. Anteriormente se han reportado péptidos o moléculas antimicrobianas que artrópodos como abejas, escorpiones e incluso arañas, usan como mecanismo de defensa lo cual les protege de los patógenos presentes en sus hábitats. Estas moléculas antimicrobianas pueden ser encontradas en diversos tejidos, por ejemplo, en la hemolinfa o en el veneno de algunas especies. La razón del estudio de estas moléculas se debe al interés de producir nuevos medicamentos capaces de combatir la resistencia bacteriana a los antibióticos, que ha ido aumentando gradualmente en los últimos años y que se ha convertido en un problema de salud global. Las arañas y tarántulas usan su seda para construir telas y sacos para ovipositar, así como para recubrir las presas que cazan y las madrigueras que habitan en una variedad de entornos: bajo tierra, en los bosques e incluso bajo el agua. Por esta razón se infiere que la seda de estos animales tiene aplicaciones como herramienta inmunológica. En este trabajo se identificaron las moléculas antibacterianas presentes en la seda de la tarántula *Cotztetlana* spp., una especie nativa del estado de Querétaro. La seda fue solubilizada en hexafluoroisopropanol (HFIP) y bajo un tratamiento con clorhidrato de guanidina (GndHCl). Posteriormente los componentes fueron separados por medio de diafiltración y cuantificados por el método de Bradford. A pesar de que el análisis antimicrobiano se vio interferido por la presencia de sales, se identificaron por medio de SDS-PAGE y LC-MS/MS dos péptidos en la seda: Beta/delta/mu-theraphotoxin-Pv1 y U30-Sparatoxin-Hju1a_1, las cuales de manera individual podrían presentar efecto antimicrobiano. Este estudio promueve realizar nuevas pruebas evaluando los péptidos identificados, dado que en anteriores investigaciones se han identificado toxinas con acción antimicrobiana presentes en venenos de arañas y escorpiones.

Palabras clave: péptidos, resistencia bacteriana, toxina, seda de tarántula

1. ANTECEDENTES

1.1 Resistencia bacteriana y nuevas alternativas para combatirla

La resistencia antimicrobiana es definida como la capacidad de un microorganismo para resistir los efectos de los antibióticos; ésta puede ser una característica propia de la bacteria o puede ser una capacidad adquirida durante el proceso infeccioso. En la última década se ha observado un gran incremento sobre la resistencia antimicrobiana, ésta tiene una vinculación directa con el abuso y el mal uso de agentes terapéuticos (Lazovski J. y col., 2017). Se estima que 50% de todos los antimicrobianos llegan a ser innecesarios en los tratamientos farmacológicos o se usan de manera inadecuada. Los casos más difundidos de resistencia antimicrobiana y los más graves en términos de morbilidad y mortalidad, son casos de resistencia bacteriana. Ésta es generada por diversos mecanismos genéticos, bioquímicos y fisiológicos que pueden ser responsables de dar la resistencia antimicrobiana, sin embargo, el que genera mayor preocupación por su asociación a resistencia extrema es la producción de enzimas betalactamasas, que son capaces de inhibir el efecto de una amplia gama de antibióticos (Lazovski J. y col., 2017).

La necesidad de este estudio surge a partir del impacto que tiene actualmente la resistencia bacteriana a los fármacos, pues la Organización Mundial de la Salud (OMS) advierte que para el año 2050 en el mundo habrá más muertes relacionadas con superbacterias resistentes que por enfermedades como el cáncer. Una de las recomendaciones que ha sugerido la OMS ha sido mejorar las iniciativas para favorecer la investigación para el desarrollo de nuevos fármacos y la optimización de los existentes. Sin duda es de vital importancia centrarse en encontrar nuevas alternativas, siendo necesario implementar nuevos mecanismos de tratamiento utilizando como modelo sustancias de la naturaleza que sean capaces de actuar directamente en el control de los patógenos. Para este efecto, los péptidos antimicrobianos o AMP (Antimicrobial peptides) son una alternativa

potencial, debido a que se han caracterizado en muchas especies: hongos, plantas, insectos, arácnidos y humanos (Olascoaga-Del A., K. y col., 2018).

1.2 Sistema inmune de artrópodos

Las respuestas inmunitarias inducidas por los artrópodos se han clasificado en tres tipos interconectados. La primera respuesta está conformada por barreras estructurales como la cutícula del exoesqueleto, la cual es extremadamente rígida y protege del daño mecánico al artrópodo, situación que sería propicia para la entrada de patógenos. La segunda respuesta, conocida como respuesta inmune innata o respuesta celular, se activa cuando el patógeno logra atravesar la primera línea de defensa como las barreras estructurales. Esta respuesta está mediada por los hemocitos (granulocitos, esferulocitos, oenocitos, adipohemocitos, coagulocitos, plasmaticos), células inmunes especializadas ubicadas en la hemolinfa las cuales reconocen, controlan y se encargan de eliminar patógenos por medio de diferentes procesos como la fagocitosis, engullendo y digiriendo al patógeno; la melanización, que inicia una cascada que finaliza con la producción de melanina junto con otras proteínas que forman una vaina capaz de aislar y eliminar al patógeno gracias a compuestos tóxicos que produce; la producción de AMP, atacando la membrana celular del patógeno; entre otros procesos como la coagulación y producción de enzimas capaces de degradar al patógeno. La tercera respuesta, la sensibilización del sistema inmune se basa en que, tras un primer contacto, tienen lugar cambios en los parámetros que forman parte de los procesos de la respuesta innata del artrópodo. Esto causa que su sistema inmune se encuentre en un estado de alerta o prevención para un contacto, ya sea con el mismo agente o con otro, a esto se le llama inmunidad innata entrenada (Rodríguez, L., y col. 2022)

Los vertebrados cuentan con un sistema inmune adaptativo compuesto tanto de elementos humorales y celulares, que les protege de los potenciales agentes patógenos. Así como otros invertebrados, los artrópodos carecen de este sistema inmune adaptativo, ya que no son capaces de producir anticuerpos específicos y, aun así, pertenecen al grupo más exitoso en términos de sobrevivencia y dominio

de hábitats. Los artrópodos están preparados para lidiar eficazmente con una gran diversidad de agentes infecciosos, esto se debe a sus mecanismos de defensa, donde los péptidos antimicrobianos tienen un papel decisivo. En los artrópodos, los péptidos antimicrobianos son producidos en el cuerpo graso (equivalente al hígado en vertebrados) y en los hemocitos (Montaño, K. y col., 2002).

1.3 Moléculas antimicrobianas y su presencia en la naturaleza

Las moléculas antimicrobianas forman parte de los efectores más importantes de la respuesta inmune innata. En particular, los AMP presentan menos de 200 residuos en su estructura primaria y son producidos por distintos tipos de células, pueden expresarse de forma constitutiva o inducible dependiendo del organismo y del tejido en el que estén presentes al momento de una infección, y tienen un amplio espectro antimicrobiano además de múltiples mecanismos de acción. Los AMP pueden clasificarse de acuerdo con su estructura secundaria y su composición, ya sean lineales; de hélice alfa; caracterizados por el enriquecimiento de uno o dos residuos; aquellos que contienen puentes disulfuro y algunos que son fragmentos de otras proteínas más grandes que cuentan con actividad antimicrobiana (Téllez y col., 2010).

El mecanismo de acción inducido por los péptidos antimicrobianos consiste de manera general en dañar la membrana celular del patógeno. Dicho mecanismo comienza con la interacción química del AMP con el microorganismo mediante fuerzas electrostáticas producidas su residuo amino positivo y la carga negativa de la membrana celular del patógeno. Casi todos los AMP interactúan con los lípidos de la membrana celular, exceptuando algunos que requieren receptores para ejercer su actividad. Si existe afinidad del AMP por la membrana del patógeno se formarán poros intramembranales a través de la bicapa lipídica de la membrana, lo cual provocará su lisis y, por lo tanto, la muerte celular. No siempre el mecanismo se centra en la membrana del patógeno, anteriormente se han descrito algunos AMP que tienen interacción con otros blancos como la pared celular, ADN, ARN y moléculas involucradas con la síntesis de proteínas. El potencial y aplicaciones de los AMP son casi ilimitados y han caracterizado miles

de estas moléculas capaces tener un uso farmacológico (Olascoaga-Del A., K. y col., 2018).

Cuadro 1. Tipos de AMP clasificados por su estructura según Téllez y col., 2010

Tipo de AMP	Ejemplos y origen
Péptidos aniónicos	<ul style="list-style-type: none"> • Maximin de anfibios • Pequeños péptidos aniónicos ricos en ácido glutámico y aspártico, provenientes de ovejas, ganado y humanos
Péptidos catiónicos lineales de hélice alfa	<ul style="list-style-type: none"> • Cecropinas, andropín, moricín, ceratotoxina y mellitín de insectos • Cecropín P1 de nematodos <i>Ascaris</i> spp. • Magainín, dermaseptín, bombinín, brevinín-1, esculentinas y buforín II de anfibios • Pleurocidín de la secreción mucosa de la piel de peces • LL37 de humanos
Péptidos catiónicos enriquecidos con aminoácidos específicos	<ul style="list-style-type: none"> • Péptidos que contienen prolina, incluyendo la abaecina de las abejas • Péptidos que contienen prolina y arginina, incluyendo apidaecinas de las abejas, drosocín de <i>Drosophila</i> sp. • Péptidos que contiene prolina y fenilalanina, incluyendo profenina del cerdo • Péptidos que contienen glicina, incluyendo a himenoptaecina de las abejas • Péptidos que contienen glicina y prolina, incluyendo coleopterín y holotripcina de escarabajos
Péptidos aniónicos y catiónicos ricos en residuos de cisteína	<ul style="list-style-type: none"> • Péptidos que contienen un puente disulfuro, incluyendo brevinina • Péptidos con dos puentes disulfuro, incluyendo protegrinas del cerdo y taquiplesinas del cangrejo cacerola • Péptidos con 3 puentes disulfuro incluyendo alfa defensinas de humanos (HBD1, DEFB118), ganado, ratón, rata, cabra y aves de corral
Péptidos productos de proteínas	<ul style="list-style-type: none"> • Lactoferricina de la lactoferrina I • Casodicina I de la caseína humana • Dominios antimicrobianos de la alfa lactoalbúmina bovina, hemoglobina humana, lisosima y ovoalbúmina

Uno de los primeros péptidos caracterizado fue la cecropina, un péptido de aproximadamente 3 kDa, capaz de inhibir el crecimiento de bacterias Gram -. Este péptido adquirió su nombre al inyectar bacterias a la pupa de *Hyalophora cecropia* la cual lo producía en grandes cantidades. Las cecropinas conforman una familia de proteínas relacionadas, con secuencias similares, un alto contenido de prolina y sin cisteína, fuertemente catiónicas y particularmente activas contra bacterias Gram -. Están ampliamente distribuidas y se han detectado en varios grupos de

insectos, ascidias e incluso en vertebrados, como en el intestino de cerdo (Boman, HG. y col., 1981).

En las últimas décadas se han encontrado péptidos antimicrobianos de entre 13 y 17 aminoácidos en tejidos de diversos animales como: dípteros (hemolinfa), abejas, avispa, arañas, escorpiones y hormigas (glándula de veneno) (Mesa y col., 2016). En particular, el péptido antimicrobiano conocido como latarcina Ltc2a se encontró en el veneno de la araña *Lachesana tarabaevi*, el cual se caracterizó química y funcionalmente. Éste induce su efecto biológico a través de un mecanismo de alfombra que consiste en que los péptidos se anclan a la membrana del patógeno hasta alcanzar un punto crítico que provoca la muerte celular (Téllez y col., 2010).

1.4 La seda y sus propiedades

Otro componente importante desde el punto de vista antimicrobiano y bioquímico es la seda o telaraña. Si bien las arañas están indudablemente expuestas a microorganismos saprófitos en su forma nativa y hábitats, como el sotobosque y los arbustos, rara vez se ha observado la descomposición de sus sedas, ya sea en el campo o en el laboratorio. Esto ha sido motivo de estudio para determinar su actividad antimicrobiana y supone una fuente novedosa de compuestos bioactivos útiles para el desarrollo de nuevos fármacos antibióticos (Zhang y col., 2019).

La producción de hilos de seda es un proceso fundamental en la vida de las arañas. Sin embargo, se piensa que esto no siempre fue así, ya que existe la teoría de que, durante la era paleozoica, hace aproximadamente 320 000 000 de años, las arañas no poseían la facultad de secretar e hilar la seda. Su alimento predilecto eran los insectos primitivos que en ese entonces no tenían alas. Fue hasta hace 260 000 000 años aproximadamente que aparecieron los primeros insectos alados y los mecanismos de caza empleados por las arañas se volvieron poco eficaces, así que este factor tal vez influyó en la evolución de las arañas favoreciendo la selección de aquellas que pudiesen secretar un líquido mediante

el cual poco a poco comenzaron a construir redes, nidos y madrigueras que facilitarían su obtención de alimento (Hoffman, A., 1993).

La seda de arañas y tarántulas se produce como consecuencia de la exposición al aire de una solución proteínica altamente concentrada que es producida por hasta siete glándulas especializadas. La seda no se expulsa bajo presión, sino que debe extraerse por medios externos; ya sea por medio del viento, la gravedad o el movimiento de las arañas. Algunas propiedades de interés de la seda son biocompatibilidad y degradación, lo cual le ha adjudicado diversos usos en la medicina. Por ejemplo, este polímero es usado como biomaterial en suturas quirúrgicas, vendajes, piel artificial, ligamentos de reemplazo (injertos), tendones artificiales, soporte para vasos sanguíneos, entre otra variedad de aplicaciones (Elices y col., 2011).

En general, se han descrito siete tipos de seda, cada una con un papel especializado en elementos de construcción de redes e inmovilización de presas. Sin embargo, la seda dragalina o seda de seguridad es la variedad más fuerte y en consecuencia la de mayor interés para la industria. Esta seda está compuesta por proteínas conocidas como espidroínas (MaSp1 y MaSp2) que se caracterizan por presentar una masa molecular de entre 250 y 350 kDa y tres dominios distintos: un dominio central repetitivo rico en residuos de glicina y alanina reservado por dominios N- y C- terminales no repetitivos. Otra característica que debe señalarse es que estas proteínas contienen en su estructura primaria tramos de residuos de alanina que son interrumpidos por repeticiones ricas en glicina. Los dominios terminales constan de aproximadamente 100 residuos de aminoácidos cada uno y están ampliamente conservados en todas las especies (Whittall y col., 2020).

Las propiedades de la seda se presentan dada su composición, por ejemplo, las regiones de polialanina forman dominios cristalinos hidrofóbicos que son responsables de la alta resistencia a la tensión, mientras que las regiones ricas en glicina son hidrofílicas y responsables de los enlaces entre dominios cristalinos, así como la elasticidad de la fibra (Xia y col., 2010).

A partir del descubrimiento de las espidroínas MaSp1 y MaSp2 como las principales fibras de la seda, los laboratorios de todo el mundo se han enfocado en la producción recombinante y purificación de estas proteínas; además del desarrollo de metodologías de hilado en húmedo para sintetizar las fibras de seda artificiales. Sin embargo, han surgido nuevas evidencias bioquímicas que sugieren que proteínas adicionales se hilan en la seda (Larracas y col., 2016). Esto apoya la hipótesis de que algunas de estas proteínas o péptidos adicionales podrían inducir un efecto antimicrobiano.

1.5 La hilatura en arañas y la glándula ampulácea mayor

Las fibras de seda de araña contienen regiones de láminas β cristalinas y no cristalinas, que median la estabilidad mecánica. En contraste, las espidroínas solubles almacenadas en la cola y el saco de las glándulas de seda ampuláceas mayores y menores, exhiben conformaciones helicoidales y desordenadas. Dentro de las glándulas se encuentra una pasta de seda concentrada que se expone a iones metálicos y gradientes de pH. Esta combinación de acidificación, intercambio iónico, deshidratación, fuerza de corte y un flujo de elongación desencadena la formación de las fibras insolubles que conocemos como telarañas (Whittall y col., 2020). Se ha encontrado que el pH disminuye su valor de 7.6 en la cola proximal a 5.7 en la segunda rama del conducto de la glándula, tal como se muestra en la figura 1 (Andersson y col., 2014).

Un estudio proteómico en 2015 sugirió que la espidroína aciniforme 1 (AcSp1) es un componente de la seda de dragalina, lo que ha sido respaldado por su presencia en la glándula ampulácea mayor, confirmando la teoría sobre la presencia de más componentes en una sola fibra de seda. Esto sugiere que las arañas alteran las propiedades mecánicas de sus fibras al cambiar la expresión del gen de la seda y la composición de la proteína de la seda (Chaw, R. y col., 2015).

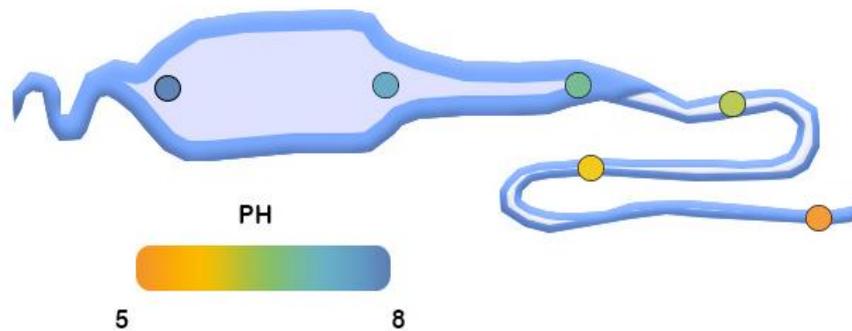


Figura 1. Esquema de gradientes de pH por los que pasa la pasta de hilado a través de la glándula Ampulácea mayor según Whittall y col., 2020.

El éxito evolutivo de las arañas a menudo se atribuye a la utilización de sedas de alto rendimiento para una variedad de funciones ecológicas, junto con una espectacular diversificación de fibras y construcciones de hilado de seda. La caracterización de la familia de genes de espidroínas se ha centrado en las de Araneoidea contando con más de 10,000 especies, además de un linaje dentro del infraorden Araneomorphae o arañas verdaderas, que cuenta con alrededor de 37,000 especies.

Por otro lado, el orden Mygalomorphae se compone de arañas de gran tamaño relativamente sedentarias que habitan principalmente en madrigueras cubiertas de seda. A diferencia de las araneomorfas, los migalomorfos han desarrollado una multitud de tareas específicas para sus tipos de seda, mientras que los araneomorfas parecen basarse en un pequeño número de sedas generalizadas para diferentes propósitos (Garb, J. et al., 2007). En comparación con los orbiculares, los mesotelios y los migalomorfos tienen una biología de la seda más simple y, por lo tanto, se plantea la hipótesis de que tienen menos diversidad de genes de la seda (Starrett y col., 2012).

Actualmente las evidencias sobre los componentes de la seda de arañas se centran en la especie *Trichonephila clavipes*, la cual ha impulsado la investigación para producir seda de manera recombinante y generar productos de interés con las características que la seda ofrece, fungiendo como biomaterial o en la

medicina. Sin embargo, por lo que se refiere a la composición y función de la seda de tarántulas, la información es escasa. En virtud de lo anterior, se infiere la oportunidad que supone la seda de tarántulas como fuente de nuevos compuestos bioactivos con utilidad para el desarrollo de fármacos antibióticos con mecanismos de acción novedosos. En este trabajo se usó la tarántula *Cotztetlana* spp., ya que es una especie endémica del municipio de Querétaro y zonas aledañas. El objetivo de este trabajo fue caracterizar los componentes bioquímicos de la seda de la uno de sus productos como lo es la seda de la tarántula *Cotztetlana* spp. y determinar su efecto antimicrobiano. Además, se pretende expandir la información científica reportada sobre arañas del orden *Mygalomorphae*.

2. OBJETIVOS

2.1 General

Caracterizar bioquímicamente la seda de la tarántula *Cotztetlana* spp. y determinar su efecto antimicrobiano

2.1 Específicos

- Obtener una solución homogénea de la seda de la tarántula *Cotztetlana* spp.
- Estandarizar un método para purificar y cuantificar la proteína obtenida de la solución homogénea de seda.
- Identificar los componentes proteínicos de la seda de *Cotztetlana* spp.
- Determinar el efecto antimicrobiano que induce la seda de *Cotztetlana* spp. sobre *Escherichia coli* (Gram-) y *Staphylococcus aureus* (Gram+).

3. METODOLOGÍA

La estrategia experimental del presente proyecto se muestra en la Figura 2. El proyecto se realizó en las instalaciones del laboratorio de inmunología y vacunas en el Campus aeropuerto de la Universidad Autónoma de Querétaro.

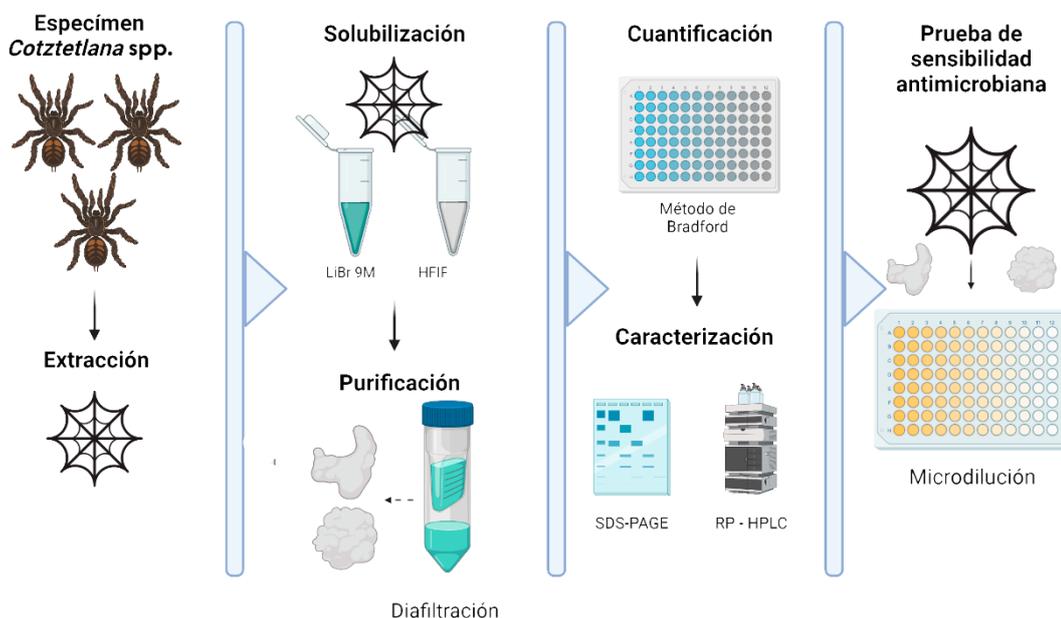


Figura 2. Estrategia experimental.

3.1 Recolección de especímenes

Los especímenes de *Cotztetlana* spp. forman parte de la colección del Aracnario de la Universidad Autónoma de Querétaro. Se contó con seis tarántulas de dicho género. Cada tarántula fue alimentada dos veces por semana con larvas de *Tenebrio molitor* (conocido como el gusano de la harina). Las extracciones de seda se realizaron un total de 25 veces, con descansos de 10 días, antes de una nueva extracción.

3.1.1 Extracción de seda

Se desarrolló un mecanismo automático de extracción de manera artesanal, fue elaborado a partir de una placa de baquelita, cloruro férrico y un servomotor (Figura 2.). Las tarántulas fueron inmovilizadas con pinzas, sujetándolas entre el protosoma y el opistosoma. Con uso de dos capilares se enrolló la seda directamente de las hileras, y se hizo girar como carrete con ayuda de un servomotor programado a una velocidad de 2 cm por segundo. Este procedimiento de extracción se llevó a cabo por 5 minutos con cada individuo. El capilar con la muestra de seda fue resguardado en un tubo de microcentrifuga el cual fue pesado con anterioridad junto con el capilar sin muestra, para determinar el peso de la muestra de seda recolectada.



Figura 3. Extracción de seda de tarántula usando dos capilares como carrete y servomotor programado con Arduino.

3.2 Solubilización de las fibras de seda y separación de sus compuestos proteínicos mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A partir de las muestras de seda se hizo un análisis de solubilización con solventes y agentes caotrópicos, elegidos con base en lo reportado por Larracas, C. (2016), donde se usaron soluciones sobresaturadas de bromuro de litio (LiBr, 9 M) y

hexafluoroisopropanol (HFIP). Estos disolventes fueron seleccionados dado que muestran una amplia gama de propiedades que facilitan la desnaturalización y solubilización de proteínas. Se obtuvieron soluciones de seda con cada disolvente, en presencia de LiBr la seda se expuso por 30 minutos hasta disolverse, mientras que en HFIP (200 μ L) se mezcló por 30 minutos hasta solubilizar la mayor parte del tejido. Esta última muestra fue colocada en un tubo de microcentrífuga abierto y expuesto a temperatura ambiente hasta alcanzar la evaporación del disolvente. Posteriormente se realizó un tratamiento adicional de desnaturalización con 500 μ L de clorhidrato de guanidina (GndHCl, 8 M) y ditioneitol (DTT, 10mM), calentado a 95 °C por 5 minutos.

Posterior a la solubilización se preparó un gel SDS-PAGE de Tris-glicina 8% para confirmar la presencia e integridad de las proteínas de la seda. Las muestras se prepararon en relación 1:1 con tampón de muestra (Tampón Laemmli 2X) y se incubaron a 95 ° C, durante 5 min. Después de enfriar a temperatura ambiente las muestras se corrieron en electroforesis a 100 V por 2 horas y se visualizaron con tinción de Coomassie. Una vez confirmada la integridad de la muestra mediante la visualización de las proteínas en el gel, se realizó la purificación por diafiltración (Whaite y col., 2018).

3.3 Purificación por medio de diafiltración

Los extractos de seda obtenidos mediante el uso de LiBr y HFIP fueron sometidos a una purificación por medio de filtración por centrifugación, usando tubos con membranas de polietersulfona con un punto de corte de 10, 000 MWCO (molecular weight cut-off). Se realizaron 2 ciclos de centrifugación a 12,000 rpm durante 15 minutos y se hicieron lavados con 200 μ L de agua estéril al finalizar cada ciclo de centrifugación.

Una vez que la muestra fue total o parcialmente purificada, se analizó mediante electroforesis SDS-PAGE para determinar la presencia e integridad de las proteínas siguiendo la metodología descrita en el punto anterior.

3.4 Cuantificación de proteína (método de Bradford)

Para la cuantificación de proteína se usó el método de Bradford con base en la metodología usada por Fernández, E., 2016 (Cuadro 1.). Se colocaron 5 μ L de estándar de BSA (Bovine Serum Albumin) por duplicado en cada pocillo en concentraciones de 0.125, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2 mg/mL; también se colocó un duplicado de 5 μ L de la muestra de seda. La reacción se llevó a cabo durante 10 minutos a temperatura ambiente y se detectó la absorbancia a 595 nm.

Cuadro 2. Protocolo para la cuantificación de proteínas por el método de Bradford en microplaca

M = Muestra con proteínas de seda

BSA = Albúmina de suero bovino

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	M	M						
B	BSA 2 mg/mL	BSA 2 mg/mL						
C	BSA 1.5 mg/mL	BSA 1.5 mg/mL						
D	BSA 1 mg/mL	BSA 1 mg/mL						
E	BSA 0.75 mg/mL	BSA 0.75 mg/mL						
F	BSA 0.5 mg/mL	BSA 0.5 mg/mL						
G	BSA 0.25 mg/mL	BSA 0.25 mg/mL						
H	BSA 0.125 mg/mL	BSA 0.125 mg/mL						

3.5 Identificación de los compuestos proteínicos de la seda

La muestra de seda que se obtuvo de la solubilización con HFIP fue sometida a un proceso de separación por RP-HPLC. Se prepararon volúmenes de inyección aproximados de 20 μ L a una concentración de 300 μ g de proteína, disueltos en agua grado HPLC (J.T. Baker) 0.1 % TFA. El fraccionamiento cromatográfico de la seda se llevó a cabo utilizando una columna de fase reversa C18 (Waters 250 mm x 4.6 mm, 5 μ m; Symmetry, CA, USA). La composición de la fase móvil consistió en: fase A (agua en 0.1 % ácido trifluoroacético) y fase B (acetonitrilo 100 %), utilizando una pendiente proporcional a 1 % de solución B/min (60 min). La composición del programa fue isocrática durante los primeros 5 minutos (fase A), y posteriormente se empleó un gradiente que alcanzó el 60% de la fase B en los siguientes 60 minutos con un flujo fijo de 1 mL/min. Las fracciones eluidas fueron monitoreadas a una longitud de onda de 220 nm y recolectadas en tubos de polipropileno para microcentrífuga de 2 mL. La muestra de seda fue fraccionada en un gel SDS-PAGE de Tris-glicina 8%) visualizado con tinción de Coomassie.

Una de las muestras de seda tratada con HFIP se analizó por medio de espectrometría de masas MALDI-TOF. Así mismo, se realizó un análisis de secuenciación parcial por medio de HPLC-MS/MS a las proteínas presentes en la banda separada por medio de SDS-PAGE (figura 5). La muestra fue reducida con ditiotretitol, alquilada con iodoacetamida y digerida "in gel" con tripsina. La digestión fue realizada usando una solución de 50 mM bicarbonato de amonio (pH 8.2) e incubada por 18 horas a 37°C. Los péptidos trípticos resultantes fueron desalados con Zip-Tips con 0.6 μ L de resina de C18.

3.6 Prueba de sensibilidad antimicrobiana por microdilución

La actividad antimicrobiana de la seda fue determinada mediante un ensayo de microdilución en placas estériles de 96 pocillos usando un volumen final de 100 μ L, la concentración usada fue limitada a la cantidad obtenida de proteína en la cuantificación, de igual manera se siguieron las recomendaciones del manual de

CLSI. Se contó con un stock de un volumen aproximado de 130 μ L que contenía una concentración de 0.5 mg/mL de proteína, del cual se obtuvieron alícuotas de 30 μ L donde cada pocillo alberga una concentración final de 150 μ g/mL, siendo una de las concentraciones más altas que usan en los ensayos antimicrobianos mediante los protocolos del manual de CLSI. Se utilizó la bacteria Gram + *Staphylococcus aureus*, una cepa ATCC 6538. Se ajustó un inóculo de bacterias a 0.5 en la escala de McFarland (1.5×10^8 UFC/mL). Posterior a inocular las placas, se incubaron a $37^\circ \pm 2^\circ$ C durante 20 horas. Los resultados fueron analizados mediante la medición de absorbancia con un lector de placas a 655 nm para determinar el grado de inhibición del crecimiento bacteriano.

3.6.1 Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron por triplicado, reportando los resultados como la media \pm la desviación estándar y se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido por la prueba de Tukey. En todos los casos, las diferencias con valores de $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativas. Todos los análisis se realizaron empleando el software GraphPad Prism.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Extracción de seda y solubilización de las fibras de seda

La extracción de seda fue un limitante para obtener resultados más completos. El rendimiento de seda por cada individuo de *Cotztetlana* spp. fue bajo lo cual causó que la cantidad total de seda obtenida fuera muy reducida. Las glándulas encargadas de producir seda constantemente están produciendo nuevas proteínas. Algunas arañas pueden producir hasta 600 metros de hilo continuo. Dichas glándulas almacenan una llamada pasta de seda o pasta de hilado la cual es una solución acuosa concentrada entre 30 y 50% peso/volumen. Se puede adjudicar este bajo rendimiento a que las arañas emplean su seda para diferentes fines en comparación a las tarántulas, por lo tanto, este es un tejido de mayor importancia para las arañas (Whittall y col., 2020).

Por otro lado, la solubilización fue efectiva con las soluciones de LiBr y HFIP, pues a pesar de no ser las más usadas en investigación relacionada con seda de arañas, son realmente efectivas, y ambas logran deshacer las fibras, observando un efecto a los 15 y 20 minutos de tratamiento. El solvente HFIP fue seleccionado como método de solubilización definitivo, debido a que facilita la purificación de proteínas y la solución final contiene una matriz más compatible con el método de cuantificación de proteína empleado. En contraste, a pesar de que la solubilización de seda con LiBr fue efectiva, las soluciones finales saturadas de sales interfieren con los ensayos de cuantificación y el análisis antimicrobiano.

4.2 Solubilización de las fibras de seda y separación de sus compuestos proteínicos mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

La separación de proteínas por la técnica de SDS-PAGE fue útil para identificar la presencia e integridad de las proteínas de la seda. También permitió evaluar la eficacia de las soluciones usadas para solubilizar la muestra, siendo el tratamiento con HFIP la muestra que mostraba mayor cantidad de proteína tal como se observa en la figura 4. Podemos notar que el uso de LiBr también ayudó a extraer

proteína de las fibras de seda. Se pueden observar proteínas de alto peso molecular mayores a 270 kDa las cuales se asocian a las proteínas estructurales de las telarañas MaSp1 y MaSp2; además de encontrar pequeñas bandas de bajo peso molecular cercanas a los 30 kDa. Posteriormente, se realizó una nueva electroforesis en gel de la solución de seda, la cual permitió visualizar de mejor manera la banda de bajo peso molecular cercana a la banda de 17 kDa del marcador de peso molecular (figura 5). Anteriores estudios han encontrado proteínas de bajo peso molecular en la seda de arañas, además de proteínas pertenecientes a las familias de MaSp, estas son proteínas ricas en cisteína nombradas CRP,s (Cysteine Rich Proteins), las cuales se cree pueden tener un papel importante en el ensamblaje de las fibras de seda. Modelados computacionales de las secuencias primarias de los miembros de la familia CRP sugieren que estas proteínas se pliegan en un nudo de cistina (Shanafelt, M., 2019).

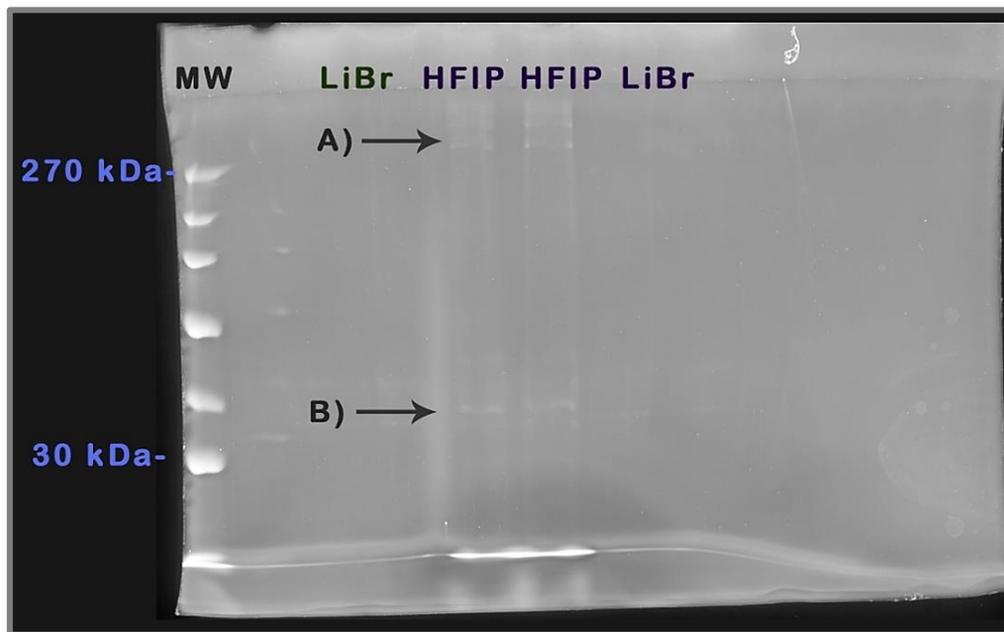


Figura 4. Perfil de electroforesis de las soluciones de seda obtenidas con HFIP y LiBr. Se observan bandas que corresponden a las proteínas extraídas de las fibras de seda, las cuales fueron tratadas con diferentes solventes (LiBr y HFIP).

A) Proteínas de mayor peso molecular. Mayores a 270 kDa.

B) Proteínas de bajo peso molecular cercanas a una masa molecular de 30 kDa.

Anteriormente se han reportado péptidos antimicrobianos que son ricos en cisteína, estos han sido péptidos caracterizados de plantas y se ha identificado que debido a la abundancia de residuos de cisteína se favorece la formación de puentes disulfuro. El plegamiento, producto de los enlaces disulfuro provee una estructura a los AMP que les dota de estabilidad química y térmica. Se sabe que las defensinas de los mamíferos son péptidos catiónicos, generalmente ricos en arginina, con un peso molecular de 3 - 4.5 kDa y que además contienen invariablemente seis residuos de cisteínas, los cuales están unidos entre sí por tres puentes de disulfuro, que son característicos de éstas. Analizar las proteínas de bajo peso molecular de la seda de la familia CRP podría ser un buen inicio para determinar el efecto antimicrobiano ya que se puede asociar que estas moléculas antimicrobianas requieren tener ciertas conformaciones para efectuar su mecanismo de acción (Rivas, B. y col., 2006).

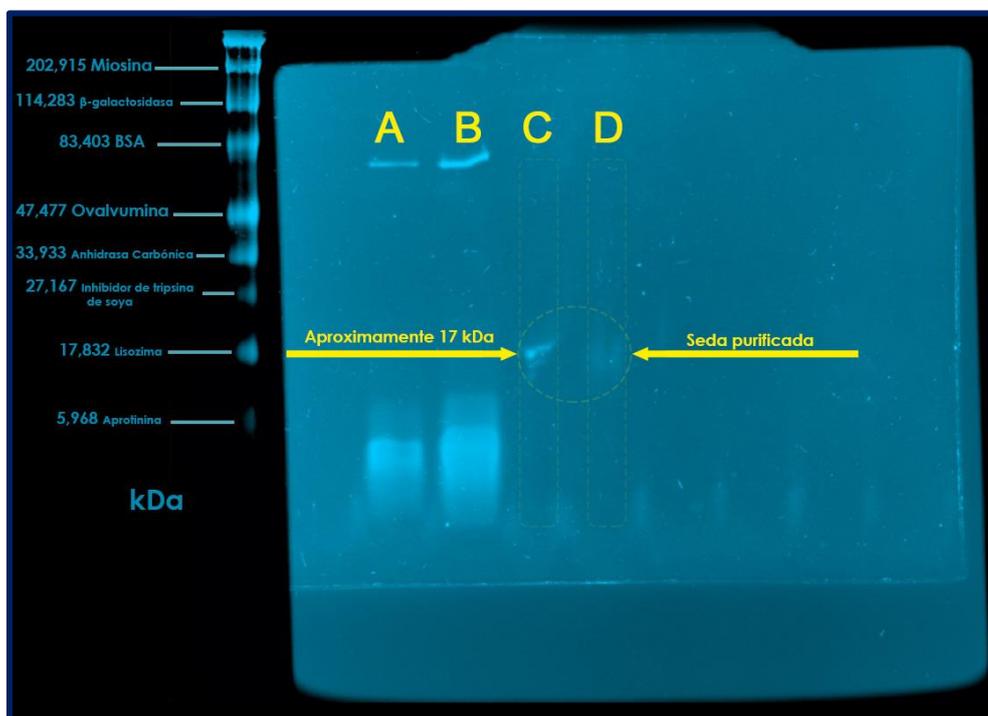


Figura 5. Separación de las proteínas de bajo peso molecular presentes en la solución de seda mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de la solución de seda (C y D). La banda correspondiente a proteínas con masas moleculares cercanas a 17 kDa fueron cortadas para su posterior análisis. Así mismo, se aprecia como control las bandas correspondientes a las proteínas presentes en el veneno de tarántula (A y B).

4.3 Análisis de espectrometría de masas MALDI-TOF y LC-MS/MS

El análisis de masas se realizó a partir de una muestra del conjunto de proteínas extraídas de la seda de tarántula, con el fin de complementar los resultados encontrados en los análisis de electroforesis. El análisis de masas arrojó la presencia de un ion mono isotópico con una masa de 11,339.6380 [M + H]⁺ (figura 6.) Luego del análisis manual de este espectro, se determinó que corresponde a la proteína presente en la banda de 17 kDa de la figura 5. El estudio de Larracas, C. en 2016 demostró que la adición de un método de digestión trípica puede mejorar la identificación de los componentes de la seda. En ese estudio se realizó un análisis nanoLC MS/MS con un espectrómetro de masas equipado con tres modos diferentes de fragmentación molecular para péptidos trípticos, lo que ayudó en la identificación de la mayor parte estructural de las fibras de seda.

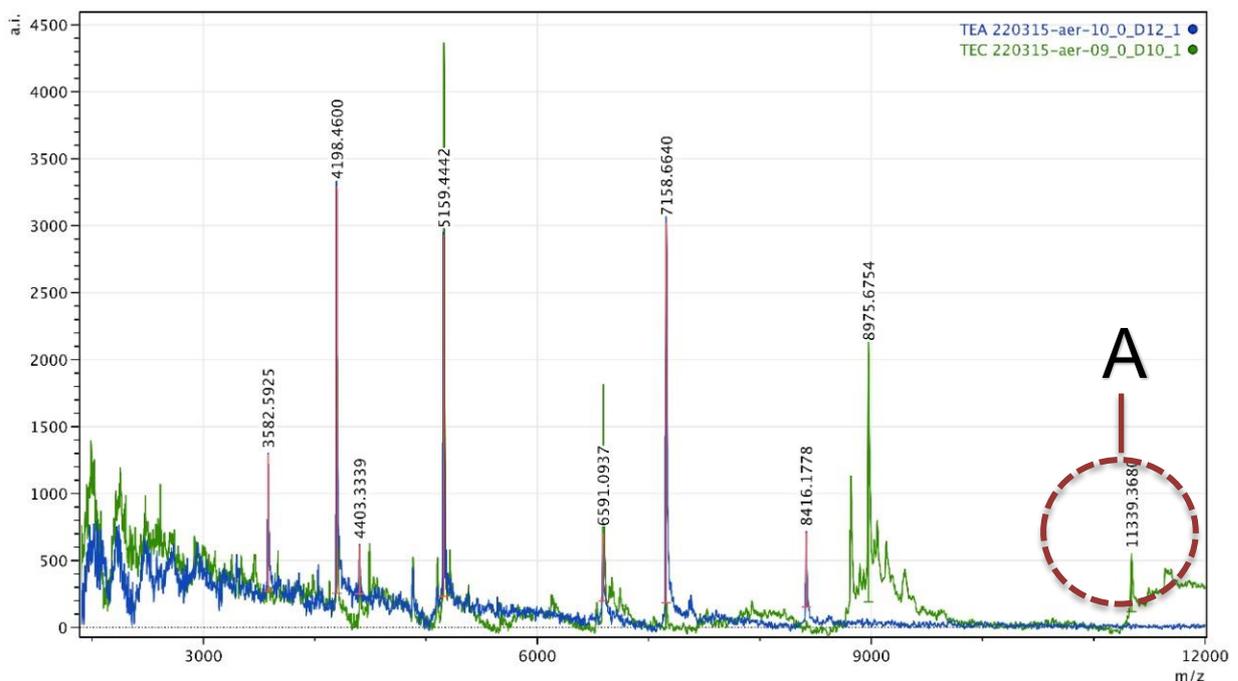


Figura 6. Espectro de masas de los componentes presentes en la seda. La deconvolución de los iones presentes en este espectro indica que los iones no tienen relación entre sí. Por lo tanto, cada ion corresponde a una molécula distinta.

A) Ion mono isotópico (11339.36 m/z)

Los resultados obtenidos de la secuenciación fueron visualizados con Scaffold 5.1.2 (Proteome Software) donde se identificaron 14 proteínas con un valor de confianza del 99% (figura 7) Se encontraron coincidencias desde 72% de una toxina identificada en el veneno de una tarántula (*Poecilotheria vittata*), hasta proteínas no caracterizadas. Estos resultados sugieren que la banda analizada se trata de un complejo proteínico y no solo una proteína de bajo peso molecular. Se necesitan hacer más estudios, incluyendo una electroforesis en 2 dimensiones para poder analizar este posible complejo de proteínas con un peso molecular similar que podrían tener distintos puntos isoeléctricos. De manera interesante, las masas moleculares de algunos iones analizados se encuentran en un rango similar al de toxinas peptídicas del tipo ICK (inhibitor cystine knots) (figura 6). Estas toxinas afectan la conducción neuronal en la placa neuromuscular, lo cual les permite a las tarántulas paralizar a sus presas mientras se alimentan de ellas. Por lo tanto, la presencia de estos péptidos en la tela tiene una explicación teleológica clara que hace un vínculo bioquímico y ecológico tangible. En la figura 8 se muestra la coincidencia dentro de la secuencia de la toxina peptídica PcaTx1a/b. De las 14 proteínas identificadas, enfocamos mayor atención en esta toxina, sin embargo, también hay coincidencia con otra toxina del tipo Sparotoxina, con la cual comparte un 31 % de identidad en secuencia.

#	Visible?	Starred?	Bio View: Identified Proteins (14/26) Including 0 Decoys	Accession Number	Alternate ID	Molecular Weight	Protein Grouping Ambiguity	Araneae
1	✓	✓	Beta/delta/mu-theraphotoxin-Pv1 OS=Poecilotheria vittata OX=2053141 P...C0HLN4			4 kDa		72%
2	✓	✓	Putative actin OS=Cupiennius salei OX=6928 GN=CSH_0437 PE=2 SV=1	A0A061QLG5 (+4)	CSH_0437	42 kDa	★	44%
3	✓	✓	U30-Sparatoxin-Hju1a_1 OS=Heteropoda jugulans OX=1358901 PE=4 SV=1	A0A4Q8K1S1		10 kDa		31%
4	✓	✓	Uncharacterized protein OS=Araneus ventricosus OX=182803 GN=AVEN_62... A0A4Y2JDJ2		AVEN_62041_1	13 kDa		24%
5	✓	✓	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Stegodyphus mimosarum OX=407... A0A087TBV2		X975_04353	54 kDa		19%
6	✓	✓	BLTX338 OS=Nephila pilipes OX=299642 PE=2 SV=1	A0A076KUP8 (+7)		36 kDa		15%
7	✓	✓	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Lycosa tarantula OX=332... A0A7G7FEW4			36 kDa		11%
8	✓	✓	Integrin beta (Fragment) OS=Stegodyphus mimosarum OX=407821 GN=X9... A0A087TNU6		X975_15184	88 kDa		10%
9	✓	✓	RNA-binding protein cabeza OS=Araneus ventricosus OX=182803 GN=caz P... A0A4Y2LEN4		caz	51 kDa		8.7%
10	✓	✓	RNA-directed DNA polymerase OS=Araneus ventricosus OX=182803 GN=Tf... A0A4Y2BTM8		Tf2-6_329	153 kDa	★	5.3%
11	✓	✓	Low-density lipoprotein receptor-related protein 2 (Fragment) OS=Stegod... A0A087UCY0		X975_21981	126 kDa		4.7%
12	✓	✓	Low-density lipoprotein receptor-related protein 2 (Fragment) OS=Araneu... A0A4Y2NZL8		LRP2_11	324 kDa	★	2.6%
13	✓	✓	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Stegodyphus mimosarum OX=407... A0A087UY1		X975_21308	240 kDa		2.2%
14	✓	✓	Platelet glycoprotein Ib alpha chain (Fragment) OS=Stegodyphus mimosar... A0A087T425		X975_01468	315 kDa		1.4%

Figura 7. Visualización de 14 proteínas identificadas a partir de la secuenciación de las proteínas presentes en la banda obtenida mediante electroforesis de la figura 5. El análisis se realizó con el 99% de confianza.

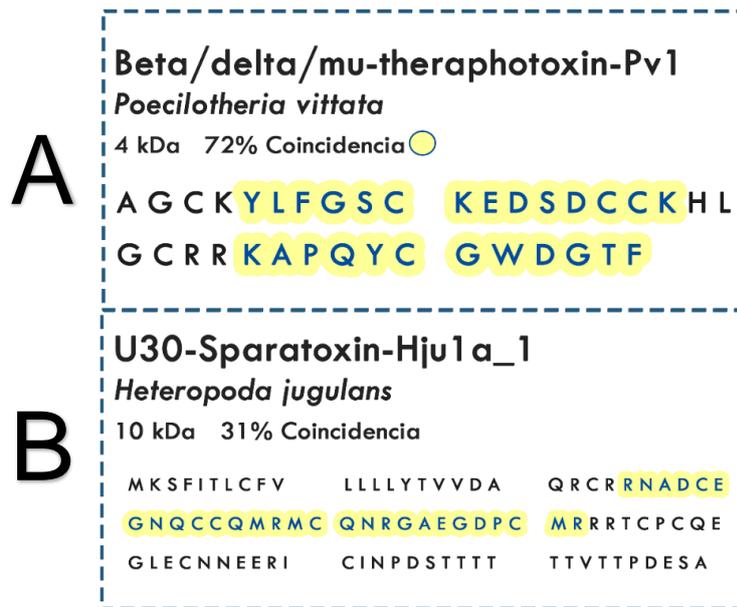


Figura 8. Secuencias de las proteínas identificadas de toxinas por el programa Scaffold 5 y la coincidencia de los péptidos analizados.

A: Beta/delta/mu-theraphotoxin-Pv1. **B:** U30-Sparatoxin-Hju1a_1

4.4 Purificación y cromatografía de líquidos de alta resolución en fase reversa 'RP-HPLC'

La cromatografía fue parte del proceso exploratorio para el análisis de las proteínas de la seda de tarántula, por lo que la muestra que fue analizada contenía GndHCl 8 M y DTT 10mM. Se esperaba purificar parcialmente la muestra pues la adición de dichos componentes fue como se logró solubilizar la seda. Sin embargo, el espectro resultante arrojó una serie de picos iniciando alrededor del minuto 12, donde dichos picos se encuentran tanto en la muestra blanco como en la muestra que contiene las proteínas de la seda, por lo que esto indica que dichos picos pertenecen a la elución de los componentes de la matriz en la que se encuentran disueltas las proteínas, es decir el GndHCL y DTT. Se hipotetiza que los péptidos se pueden estar eluyendo junto a estos componentes, por lo que se optó por no recurrir momentáneamente al HPLC pues significaba una pérdida de muestra que se había recolectado con un tiempo muy considerable y no era rentable para el avance del proyecto pues aún hacía falta hacer las pruebas de purificación, cuantificación y la del análisis antimicrobiano. La columna C18 se usó

debido a su manejo en el mapeo de péptidos, sin embargo, el equipo de laboratorio recomendó usar una columna C8 para posteriores experimentos ya que favorece la separación de proteínas con mayor peso molecular.

4.5 Cuantificación de proteína (Método de Bradford)

La cuantificación de proteína fue realizada en una microplaca basada en el esquema de la figura 10, usando estándares de BSA para generar la curva estándar (Figura 9). Se determinó que la solución con proteína de seda de tarántula tiene una concentración de 0.5 mg/mL. Como ya fue mencionado, llegar a una concentración alta de proteína fue complicado debido a la poca cantidad de individuos de la especie *Cotztetlana* spp. y el complicado manejo de las proteínas que forman la seda. Para este extracto de seda fueron usadas ocho recolecciones. A partir de esta cuantificación se contó con un stock de aproximadamente 130 μ L. Cabe recalcar que dicha concentración es de proteína total y no específicamente de algún péptido o proteína parcial. Por lo que el conjunto proteínico total de la seda fue el utilizado para determinar su efecto antimicrobiano.

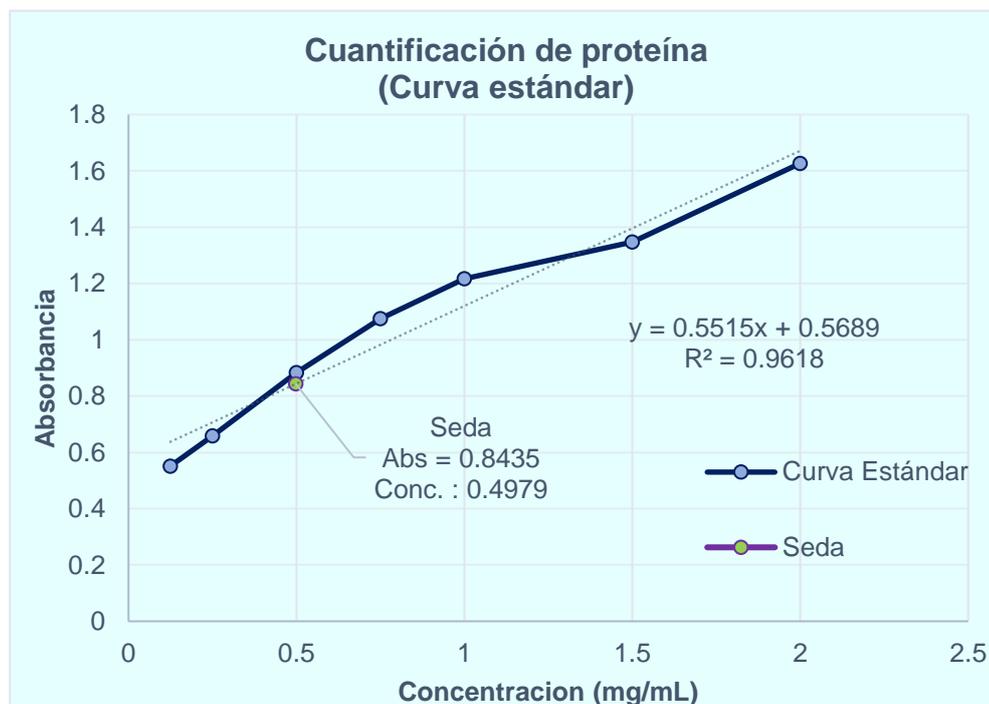


Figura 9. Curva estándar de para la determinación de la concentración final de la muestra obtenida de seda de tarántula.

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	M 0.5 mg/mL	M 0.5 mg/mL						
B	BSA 2 mg/mL	BSA 2 mg/mL						
C	BSA 1.5 mg/mL	BSA 1.5 mg/mL						
D	BSA 1 mg/mL	BSA 1 mg/mL						
E	BSA 0.75 mg/mL	BSA 0.75 mg/mL						
F	BSA 0.5 mg/mL	BSA 0.5 mg/mL						
G	BSA 0.25 mg/mL	BSA 0.25 mg/mL						
H	BSA 0.125 mg/mL	BSA 0.125 mg/mL						

Figura 10. Esquema de la cuantificación por método de Bradford. Pocillo A1 y A2 se coloca la muestra M de seda purificada obteniendo una concentración de 0.5 mg/mL de proteína total.

4.6 Análisis antimicrobiano por microdilución

El análisis antimicrobiano se representa en la figura 11. Se obtuvieron resultados no favorables para una cuantificación de la inhibición bacteriana pues el control positivo de los pocillos A3, B3 y C3 indicó que el experimento fue realizado con éxito y que se realizó un inóculo adecuado, mientras que los pocillos del control negativo A5, A6, A7 y al igual que sus repeticiones inhibieron el crecimiento bacteriano debido a las concentraciones de ampicilina que se le agregó. Por otro lado, los pocillos de la columna 4 indicaron si el vehículo o matriz estaba interfiriendo con el crecimiento bacteriano pues dicha matriz en la cual estarían disueltas las proteínas de la seda es una solución parcialmente purificada que podría contener aún residuos de GndHCL y DTT. En este caso se observó que se había inhibido completamente el crecimiento; además en la columna 8 se observa la inhibición de crecimiento bacteriano, los pocillos A8, B8 y C8 contenían la solución proteínica de seda con una concentración de 150 µg/mL. Con esto no se demuestra que la seda a dicha concentración haya ejercido un efecto

antimicrobiano, ya que la inhibición del crecimiento bacteriano en los pocillos de la columna 8 podría ser causa de un falso positivo al observar que la misma matriz en la que están disueltas las proteínas podría estar afectando el crecimiento bacteriano indirectamente. Se considera que hacen falta más estudios, sin embargo, una de las mayores problemáticas que se presentaron fue encontrar una solución en la que las proteínas de la seda puedan ser disueltas y que a su vez sea compatible para realizar el análisis antimicrobiano sin ninguna interferencia.

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	Caldo Estéril	Caldo + Agua	Caldo + Inóculo	Vehículo + Inóculo	Amp 4 $\mu\text{g/mL}$	Amp 2 $\mu\text{g/mL}$	Amp 1 $\mu\text{g/mL}$	SEDA
B	Caldo Estéril	Caldo + Agua	Caldo + Inóculo	Vehículo + Inóculo	Amp 4 $\mu\text{g/mL}$	Amp 2 $\mu\text{g/mL}$	Amp 1 $\mu\text{g/mL}$	SEDA
C	Caldo Estéril	Caldo + Agua	Caldo + Inóculo	Vehículo + Inóculo	Amp 4 $\mu\text{g/mL}$	Amp 2 $\mu\text{g/mL}$	Amp 1 $\mu\text{g/mL}$	SEDA
D								
E								
F								
G								

Figura 11. Esquema de representación para los resultados obtenidos del análisis antimicrobiano por microdilución. Color más tenue (Ej. Carril A1) representa un poco o nulo crecimiento de bacterias. Color más opaco (Ej. Carril A3) representa la turbidez generada por el crecimiento de bacterias.

SEDA: Extracto de proteínas de seda 150 $\mu\text{g/MI}$

El análisis ANOVA y la prueba de Tukey demostraron que no hay diferencias significativas entre los valores de absorbancia obtenidos del cuadro 3. Únicamente hubo una diferencia significativa en cuanto al valor de la columna 3 (Caldo+Inoculo), es decir, las sales presentes en la solución vehículo inhibieron por completo el crecimiento bacteriano en los casos de la columna 4 y 8.

Cuadro 3. Tabla con los valores de inhibición bacteriana. Con un $T\alpha = 0.14$ obtenido del método de Tukey ningún valor tuvo diferencia significativa mayor al $T\alpha$, además del pocillo 3 el cual es el blanco utilizado.

HSeda - H: Es la relación entre las diferencias del valor promedio de absorbancia de la seda contra todos los demás pocillos

H4 - H: Es la relación del pocillo 4 (que contiene la solución vehículo con sales) entre las diferencias del valor promedio de absorbancia de la seda contra todos los demás pocillos

	1	2	3	4	5	6	7	8
Tα= 0.14	Caldo estéril	Caldo + Agua	Caldo + Inoculo	Vehículo + Inoculo	Amp 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Amp 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Amp 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Seda 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$
	0.066234	0.070609	0.857753	0.077608	0.276161	0.081316	0.067016	0.134563
	0.086793	0.083405	0.842473	0.089754	0.09541	0.096672	0.100762	0.129594
	0.05951	0.056119	0.973141	0.061664	0.056686	0.061254	0.065975	0.112133
Promedio	0.070845667	0.07004433	0.89112233	0.076342	0.14275233	0.07974733	0.07791766	0.12543
HSeda - H	0.054584333	0.05538566	0.76569233	0.049088	0.01732233	0.04568266	0.04751233	0
Decisión	No significativa	No significativa	Significativa	No significativa	No significativa	No significativa	No significativa	/
H4 - H	0.005496333	0.00629766	0.81478033	0	0.06641033	0.00340533	0.00157566	0.049088
Decisión	No significativa	No significativa	Significativa	/	No significativa	No significativa	No significativa	No significativa

Con anterioridad se ha estudiado la posibilidad de encontrar moléculas antimicrobianas en venenos, hemolinfas o seda de arañas, de esta manera se ha asociado un potencial efecto antimicrobiano con toxinas presentes en el veneno de algunos artrópodos. En el 2014 se realizó un estudio donde se reconocieron péptidos antimicrobianos provenientes del veneno de escorpiones (Harrison, PL. y col, 2014).

Otro estudio realizado con arañas *Cupiennius salei* por Haerberli y colaboradores en el año 2000, se utilizaron cinco péptidos aislados del veneno para determinar su actividad antimicrobiana. Los resultados obtenidos demostraron que las bacterias (*Escherichia coli* K12, *Pseudomonas putida*, *Paracoccus denitrificans*, *Staphylococcus epidermidis* y *Bacillus subtilis*) fueron susceptibles a todos los péptidos utilizados en ciertas concentraciones. Así mismo, se probó el efecto del veneno crudo en el crecimiento bacteriano y se pudo evidenciar la ausencia de crecimiento. Por otro lado, en la araña *Lycosa carolinensis*, se han reportado las licotoxinas I y II y en *Oxyopes kitabensis* las oxiopepininas, los cuales cuentan con actividad antimicrobiana (Corzo. G. y col, 2003).

El trabajo realizado por Mesa, S en 2016 encontró que la seda tiene un efecto bactericida, pues a lo largo de ese proyecto evaluaron el efecto antimicrobiano de veneno, hemolinfa y de sacos de huevo de arañas del género *Latrodectus*. El método que emplearon para evaluar el efecto de la seda fue a partir de preparar un agar que contenía un extracto de la seda que se obtuvo de los sacos de huevo. Si bien concluyen que el efecto bactericida que se encuentra al no haber crecimiento bacteriano sobre los agares que contienen seda, no indica de manera directa la concentración mínima inhibitoria que es crucial para que un antimicrobiano sea validado como tal, siendo un resultado cualitativo. Por lo que también concluyeron necesario realizar más estudios sobre la seda y su efecto antimicrobiano. Otro estudio indica que la seda no cuenta con capacidades antimicrobianas, esto debido a que insinúan que el nitrógeno de las proteínas de la seda es clave para evitar el crecimiento de bacterias ya que el nitrógeno no se encuentra de manera accesible para estos microorganismos. En este trabajo utilizaron un ensayo de rayas cruzadas, que lo consideramos poco convencional

pues consistió en colocar una línea de seda sobre el estriado de cada bacteria, lo cual no indica de manera asertiva la determinación de un efecto antimicrobiano en la seda, pues hay altas probabilidades de generar falsos positivos o negativos (Zhang, S, y col, 2019).

El estudio para identificar nuevos agentes antimicrobianos lleva un proceso bastante complejo, y más al tener limitada la cantidad de muestra que se pueda llegar a obtener, por lo que si se quiere indagar más sobre el tema para encontrar péptidos o moléculas antimicrobianas en la seda de tarántulas se debería optar por un estudio de proteómica que ayude a la identificación de pequeños péptidos los cuales podrían estar presentes en las glándulas productoras de seda.

Las proteínas de bajo peso molecular identificadas en los geles son resultados valiosos ya que aportan a seguir estudiando estos pequeños péptidos los cuales pueden tener efecto antimicrobiano si se tienen en mayor concentración, por lo que se hay reportado si existen toxinas que puedan tener efecto antimicrobiano por lo que evaluar las toxinas encontradas una a una sería un complemento importante para este estudio.

5. CONCLUSIONES

Se obtuvo una solución homogénea de la seda extraída de *Cotztetlana* spp. por medio del uso de solventes como HFIP y soluciones sobresaturadas de LiBr y GndHCl. La seda obtenida de la tarántula *Cotztetlana* spp. contiene componentes proteínicos que presentan masas moleculares cercanas a los 17 kDa, así como péptidos neurotóxicos del tipo ICK. A pesar de que las muestras analizadas indujeron un efecto antimicrobiano, este se debe a la cantidad de sales presentes en la solución.

En perspectiva, aún se debe trabajar en encontrar un método capaz de solubilizar la seda y que no interfiera en la realización del análisis antimicrobiano, una solución alternativa sería encontrar la manera de desalar las muestras de seda sin que las proteínas se precipiten por métodos como diálisis.

6. BIBLIOGRAFÍA

Andersson, M., Chen, G., Otikovs, M., Landreh, M., Nordling, K., Kronqvist, N., Rising, A. Carbonic anhydrase generates CO₂ and H⁺ that drive spider silk formation via opposite effects on the terminal domains. PLOS Biology [serie en internet] **2014** [consultado 2021 marzo 13]; 12(8). Disponible en: <https://journals.plos.org/plosbiology/article?id=10.1371/journal.pbio.1001921>

Boman. HG, Steiner, H., Humoral immunity in Cecropia pupae. Current Topics in Microbiological Immunology [serie en internet] **1981** [consultado 2022 agosto 18]; 94-95:75-91. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7030643/>

Chaw, R. C., Correa-Garhwal, S. M., Clarke, T. H., Ayoub, N. A., & Hayashi, C. Y. Proteomic evidence for components of spider silk synthesis from black widow silk glands and fibers. Journal of Proteome Research [serie en internet] **2015** [consultado 2021 enero 18]; 14(10), 4223–4231. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5075943/>

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Ed.26. Pennsylvania, EE. UU: Clinical and Laboratory Standards Institute, **2016**.

Corzo G, Escoubas P. Pharmacologically active spider peptide toxins. Cell Mol Life Sci. [serie en internet] **2003** [consultado 2022 enero 4]; 60(11):2409-26. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14625686/>

Elices M., Perez, J., Guinea, G. Usos médicos de la seda, Universidad politécnica de Madrid, investigación y ciencia [serie en internet] **2011** [consultado 2021 enero 18]; N° 419, 2011, 28-35. Disponible en: <https://oa.upm.es/12124/>

Fernández, E., Galvan, A. Métodos para la cuantificación de proteínas. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus Universitario de Rabanales, Córdoba, España, **2016**.

Garb, J. E., DiMauro, T., Lewis, R. V., & Hayashi, C. Y. Expansion and intragenic homogenization of spider silk genes since the triassic: evidence from mygalomorphae (tarantulas and their kin) spidroins. *Molecular Biology and Evolution* [serie en internet] **2007** [consultado 2021 junio 5]; 24(11), 2454–2464. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17728281/>

Haeberli S, Kuhn-Nentwig L, Schaller J, Nentwig W. Characterisation of antibacterial activity of peptides isolated from the venom of the spider *Cupiennius salei*. *Toxicon*. [serie en internet] **2000** [consultado 2023 febrero 18] ;38(3):373-80. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10669026/>

Harrison PL, Abdel-Rahman MA, Miller K, Strong PN. Antimicrobial peptides from scorpion venoms. *Toxicon*. [serie en internet] **2014** [consultado 2023 febrero 18]; 88:115-37. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24951876/>

Hoffmann, A. El maravilloso mundo de los arácnidos. 1era Edición. Mexico, D.F. Fondo de cultura económica, **1993**.

Larracas, C., Hekman, R., Dyrness, S., Arata, A., Williams, C., Crawford, T., & Vierra, C. Comprehensive proteomic analysis of spider dragline silk from black widows: A recipe to build synthetic silk fibers. *International Journal of Molecular Sciences* [serie en internet] **2016** [consultado 2021 junio 18]; 17(9), 1537. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27649139/>

Lazovski J., Corso A., Pasteran F., Monsalvo M., Frenkel J., Cornistein W., Corral G., Nacinovich F. Estrategia de control de la resistencia bacteriana a los antimicrobianos en Argentina. *Rev Panam Salud Publica*. [serie en internet] **2017** [consultado 2023 enero 18] 19;41: e88. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6660862/>

Mesa, S., Rueda, M., Dussan, J. Actividad antimicrobiana de veneno, hemolinfa y sacos de huevos de *Latrodectus sp.* en bacterias ambientales. [monografía en

internet] Bogotá, Colombia: Universidad de los Andes Facultad de Ciencias Departamento de Ciencias Biológicas, **2016** [consultado 2021 abril 2]. Disponible en:<https://repositorio.uniandes.edu.co/bitstream/handle/1992/18650/u722454.pdf>

Montaño, K., Vargas, F. Péptidos antimicrobianos: un mecanismo de defensa ancestral con mucho futuro. INCI [serie en internet] **2002** [consultado 2023 enero 22]; 27(1): 21-27. Disponible en: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442002000100004&lng=es.

Olascoaga-Del, A. K., Sánchez-Evangelista, G., Carmona-Navarrete, I., Galicia-Sánchez, M., Gómez-Luna, A., Islas-Arrollo, S. J., et al. Péptidos antimicrobianos, una alternativa prometedora para el tratamiento de enfermedades infecciosas. Gaceta medica de México [serie en internet] **2018** [consultado 2021 octubre 12]; 154(6), 681–688. Disponible en: https://www.anmm.org.mx/GMM/2018/n6/GMM_6_18_681-688.pdf

Rivas, B., Sada, E., Hernández R. & Tsutsumi, V. Péptidos antimicrobianos en la inmunidad innata de enfermedades infecciosas. *Salud Pública de México*, 48(1), 62-71. [serie en internet] **2006** [consultado 2021 octubre 12]; Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S003636342006000100010&lng=es&tlng=es.

Rodriguez, L., Hernandez, P., Escriche, B. El sistema inmune de los insectos: algo más complejo que simples barreras. Universidad de Valencia, Valencia, España: Panorama, **2022**; 12;18 Vol41.

Shanafelt, M. Structural Characterization of Black Widow Spider Dragline Silk Proteins CRP1 and CRP4. *Molecules*. [serie en internet] **2019** [consultado 2023 enero 21]; 25(14):3212. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7397007/>

Starrett, J., Garb, J. E., Kuelbs, A., Azubuiké, U. O., & Hayashi, C. Y. Early events in the evolution of spider silk genes. *PLoS ONE* [serie en internet] **2012** [consultado 2021 agosto 28]; 7(6), e38084. Disponible en: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0038084>

Téllez, G. A., Castaño, J. C. Péptidos antimicrobianos. Grupo de inmunología molecular. *Infect.* [serie en internet]. **2010** [consultado 2021 marzo 22] 14(1): 55-67. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/inf/v14n1/v14n1a07.pdf>

Whaite, A. D., Wang, T., Macdonald, J., & Cummins, S. F. Major ampullate silk gland transcriptomes and fibre proteomes of the golden orb-weavers, *Nephila plumipes* and *Nephila pilipes* (Araneae: Nephilidae). *PLOS ONE* [serie en internet] **2018** [consultado 2021 enero 12]; 13(10), e0204243. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30332416/>

Whittall, D. R., Baker, K. V., Breitling, R., & Takano, E. Host systems for the production of recombinant spider silk. *Trends in Biotechnology.* [serie en internet] **2020** [consultado 2021 enero 20]; 39(6):560-573. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33051051/>

Xia, X.-X., Qian, Z.-G., Ki, C. S., Park, Y. H., Kaplan, D. L., & Lee, S. Y. Native-sized recombinant spider silk protein produced in metabolically engineered *Escherichia coli* results in a strong fiber. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [serie en internet] **2010** [consultado 2021 enero 20]; 107(32), 14059–14063. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2922564/>

Zhang, S., Piorkowski, D., Lin, W.-R., Lee, Y.-R., Liao, C.-P., Wang, P.-H., & Tso, I.-M. (2019). Nitrogen unavailability helps to protect spider silk from bacterial growth. *The Journal of Experimental Biology* [serie en internet] **2019** [consultado 2021 marzo 12]; 222(Pt 20): jeb214981. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31562186/>