



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Maestría en Salud y Producción Animal Sustentable

Caracterización anti-microbiana del veneno de *Theraphosa stirmi*

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Maestría en Salud y Producción Animal Sustentable

Presenta:

I.B.Q Miguel Ernesto Guzmán Rodríguez

Dirigido por:

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito

SINODALES

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito

Presidente

Dr. Alejandro García Arredondo

Secretario

Dr. Luis Alfonso Amarillas Bueno

Vocal

Dra. Angelina Rodríguez Torres

Suplente

M. en C. Luis Fernando Díaz Peña

Suplente

Facultad de Ciencias Naturales , Querétaro, Qro.
Fecha de aprobación por el Consejo Universitario (mes y año) México

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de ciencias naturales, por haberme formado durante mi etapa de mi Maestría en Salud y Producción Animal Sustentable.

Al laboratorio de inmunología y vacunas (LINVAS), UAQ. Por haberme permitido realizar parte de mis experimentos en sus instalaciones.

Al laboratorio de toxicología de la Facultad de química, UAQ. Por apoyarme en gran parte de la realización de la metodología de esta investigación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo económico que nos otorgan a los afortunados, es realmente de gran ayuda y muchos no podríamos desarrollar las tesis sin esta ayuda. Les deseo éxito con el maíz criollo.

A mi director de tesis, la Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito, quien desde que fue mi tutor durante una estancia de verano en mi periodo de licenciatura, me inculco el gusto por la investigación, su pasión por los animales, especialmente artrópodos y anfibios. Gracias también por su amistad.

Al M. en C. Luis Fernando Díaz Peña, por su valioso aporte y ayuda en la realización de los experimentos y metodologías que realizamos en la facultad de química. Hubiera sido muy difícil realizar esta tesis sin su apoyo. Por su sinceridad y por su amistad.

Al Dr. Luis Alfonso Amarillas Bueno, por su apoyo con los conocimientos sobre el área de microbiología, redacción y otras metodologías que lamentablemente no formaron parte final de esta tesis, por su amistad y su honestidad en el área de la investigación.

Al Dr. Alejandro García Arredondo por sus atinadas sugerencias durante el desarrollo de las metodologías en esta investigación y por sus amenas clases y pláticas sobre los compuestos naturales y sobre la vida.

A la Dra. Talina Rodríguez Torres por su disposición para ayudar y aportar a la investigación y dudas en general, me parece un ejemplo como investigadora que demuestra pasión por su trabajo y por la ciencia.

Al Aracnólogo. Luis Cuellar, gracias a el aprendí enormemente sobre tarántulas y otros artrópodos, por su apoyo durante las extracciones de veneno las cuales fueron pilar fundamental para el desarrollo de esta investigación, espero siga trabajando con tanto empeño y pasión en lo que le gusta que es la aracnología.

Al equipo encargado de World Spider Catalog (World Spider Catalog, 2020), por la importante labor que realizan de manera gratuita y abierta al público, son el pilar de cientos de investigaciones en donde se involucran las arañas (Araneae).

A mis amigos que conocí en la maestría, Alma Cárdenas, Aldo Pavón, Aida Olgún por haberme apoyado incondicionalmente en mi estancia allá, soportar los buenos y malos momentos y especialmente por brindarme su amistad.

A mis compañeros de maestría, Osmar, Oscar, Andrés, Bárbara, Chyntia, Alejandra, Lorena, Fernanda, José Miguel, por haberme brindado su amistad, por los buenos momentos que pasamos en las clases y las reuniones y por haber atendido mis dudas sobre sus conocimientos de medicina veterinaria.

A Diego Josimar, Gaby Aleirbag, Mario Hidalgo, Edwin Esaú, Andrés Elizondo por haberme apoyado en el laboratorio y con dudas cuando acudí a ellos.

A mis amigos Julián García, Lucía Rubí, Francisco Gaxiola, José Luis Rodríguez, Omar Maya, Luis Castelo, Juan Pablo Alba, Leonardo Carreón, Diana Cárdenas, Celena Duarte. Por acompañarme en el camino de la vida durante tantos años y apoyarme cuando lo he necesitado. Han influido de manera directa y algunos indirectamente en mi formación profesional y personal.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

DEDICATORIA

A mi familia, por siempre apoyarme en las decisiones que he tomado a lo largo de mi vida, por inculcarme valores que han sido pilares para mi formación personal y académica.

A **Norman Platnick**, por su inmensurable aportación al conocimiento en el área de la aracnología, que en paz descanse.

Per aspera ad astra

CONTENIDO

RESUMEN.....	i
ABSTRACT	ii
ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ÍNDICE DE CUADROS	vi
ABREVIATURAS.....	vii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	2
2.1 Descripción de la especie.....	2
2.1.1 Hábitat y distribución.....	2
2.1.2 Taxonomía.....	4
2.2 Anatomía externa.....	4
2.2.1 Prosoma.....	6
2.2.2 Opistosoma.....	6
2.2.3 Pedicelo.....	6
2.2.4 Tubérculo ocular.....	6
2.2.5 Glándulas hileras.....	7
2.2.6 Glándulas de veneno.....	7
2.3 Anatomía interna.....	9
2.3.1 Sistema circulatorio.....	9
2.3.2 Sistema digestivo.....	10
2.3.4 Sistema respiratorio.....	11
2.3.5 Sistema reproductivo.....	12
2.3.6 Sistema inmunitario.....	16

2.3.7 Células del sistema inmune de los terafósidos.....	19
2.4 Venómica en artrópodos.....	21
2.5 Péptidos antimicrobianos.....	22
2.5.1 Generalidades de los péptidos antimicrobianos.....	22
2.5.2 Clasificación de péptidos antimicrobianos.....	22
2.6 Péptidos antimicrobianos de invertebrados.....	26
2.6.1 Péptidos antimicrobianos de arácnidos.....	28
II. HIPÓTESIS.....	30
III. JUSTIFICACIÓN.....	31
IV. OBJETIVOS.....	32
4.1 Objetivo general.....	32
4.2 Objetivos específicos.....	32
V. METODOLOGÍA.....	33
5.1 Especímenes.....	33
5.2 Declaración de ética.....	33
5.3 Extracción de veneno.....	33
5.4 Cuantificación de proteína.....	35
5.5 Fraccionamiento del veneno.....	35
5.6 Microorganismos utilizados.....	36
5.7 Ensayos antibióticos.....	37
5.7.1 Ensayo antibacteriano del veneno de <i>Theraphosa stirmi</i>	37
5.7.2 Ensayo antimicótico del veneno de <i>Theraphosa stirmi</i>	38
5.8 Análisis filogenético.....	40
5.9 Análisis estadístico.....	41
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	42
6.1 Fraccionamiento del veneno de <i>Theraphosa stirmi</i>	42

6.2 Actividad antibacteriana del veneno de <i>Theraphosa stirmi</i> determinada mediante la inhibición del crecimiento líquido.....	43
6.2.1 Actividad antibacteriana de las fracciones del veneno de <i>Theraphosa stirmi</i> determinada mediante la inhibición del crecimiento líquido	44
6.2.2 Actividad antibacteriana del veneno de <i>Theraphosa stirmi</i> determinada mediante difusión en disco	45
6.2.3 Actividad antibacteriana de las fracciones del veneno de <i>Theraphosa stirmi</i> determinada mediante difusión en disco.....	46
6.2.4 Actividad antibacteriana del veneno de <i>Theraphosa stirmi</i> determinada mediante extensión en placa.....	48
6.1.5 Actividad antimicótica del veneno de <i>Theraphosa stirmi</i> determinada mediante extensión en placa.....	49
6.3 Árbol filogenético	50
VII. CONCLUSIONES	57
VIII. REFERENCIAS	58

RESUMEN

El acelerado incremento en el surgimiento y diseminación de cepas bacterianas multirresistentes a los antibióticos representa uno de los riesgos globales más apremiantes que amenazan a la humanidad, por ello, se han explorado diversas alternativas para desarrollar nuevos fármacos, entre ellos los péptidos antimicrobianos, son moléculas clave en la respuesta inmune innata presentes en diversas especies de animales y plantas. Recientemente se ha considerado la caracterización y aislamiento de péptidos antimicrobianos sintetizados por organismos invertebrados. En el presente trabajo se evaluó la actividad antimicrobiana del veneno de la tarántula Goliat de Borgoña (*Theraphosa stirmi*) y cuatro fracciones obtenidas del veneno separadas por cromatografía de fase reversa, sobre los microorganismos *S. saprophyticus* (ATCC baa-750), *S. tiphymurium* (ATCC 14028), *C. albicans* (ATCC 276), *S. cerevisiae* (ATCC MYA-198), *L. monocytogenes* (ATCC 7644), *E. coli* (ATCC 25922) utilizando ensayos de microdilución en placa, pruebas de difusión en disco y ensayos de vertido en placa. El veneno y las fracciones obtenidas no demostraron tener actividad inhibitoria antibiótica en las pruebas de inhibición en disco. No se encontró actividad inhibitoria significativa ($P \leq 0,05$) en las pruebas de dilución en caldo ni en las de extensión en placa. Mediante un análisis filogenético, se compararon los péptidos antimicrobianos reportados de otras especies de arácnidos y se determinó que los péptidos antimicrobianos previamente reportados, obtenidos a partir del veneno de terafósidos, presentan una divergencia mayor comparada con el género *Theraphosa* que comparado entre los dos géneros de terafósidos con péptidos antimicrobianos.

Palabras clave: Veneno, antimicrobiano, *Theraphosa*, Cromatografía

ABSTRACT

The emergence and dissemination of multidrug-resistant bacteria strains is one of the biggest public health challenges of our time, various alternatives have been studied to develop new drugs, including antimicrobial peptides, they are key molecules in the innate immune response present in various species of animals and plants. The characterization and isolation of antimicrobial peptides from venom and cells of invertebrate organisms has recently been considered. In the present work, the antimicrobial activity of the venom of the Goliath of Burgundy tarantula (*Theraphosa Stirmi*) and four fractions obtained from the venom separated by reverse phase chromatography, were evaluated using the microorganisms *S. saprophyticus* (ATCC baa-750), *S. typhimurium* (ATCC 14028), *C. albicans* (ATCC 276), *S. cerevisiae* (ATCC MYA-198), *L. monocytogenes* (ATCC 7644), *E. coli* (ATCC 25922) using microdilution plate assays, disk diffusion assays and plate pouring assay. The venom and the fractions obtained did not show antibiotic inhibitory activity in the disk inhibition tests. No significant inhibitory activity ($P \leq 0.05$) was found in the broth dilution tests or the plate spread tests. Through a phylogenetic analysis, the antimicrobial peptides reported from other species of tarantulas were compared and it was determined that the previously reported antimicrobial peptides, obtained from the teraphoside venom, present a greater divergence compared to the genus *Theraphosa* than compared to the two genera of teraphosides. with antimicrobial peptides.

Key words: Venom, antimicrobial, *Theraphosa*, Chromatography

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Mapa de distribución del género <i>Theraphosa</i> . <i>Theraphosa blondi</i> (amarillo), <i>Theraphosa stirmi</i> (rojo), <i>Theraphosa apophysis</i> (azul), <i>Theraphosa</i> no taxonomizada (naranja).	3
2	Ejemplar juvenil de <i>Theraphosa stirmi</i> .	3
3	Morfología de la tarántula Goliat de Borgoña (<i>Theraphosa stirmi</i>).	5
4	Localización putativa de la glándula de veneno en la tarántula Goliat de Borgoña (<i>Theraphosa stirmi</i>).	8
5	Tomografía micro computarizada de un molde de resina del sistema vascular en el opistosoma de la araña <i>Cupiennius salei</i> .	10
6	Ubicación del libro de pulmón y la apertura genital en hembra madura de <i>Theraphosa stirmi</i> .	13
7	Macho de <i>Theraphosa stirmi</i> mostrando sus bulbos espermáticos.	14
8	<i>Theraphosa apophysis</i> (Tinter, 1991) macho, cuerpo. A. Ejemplar. B. bulbo espermático derecho. Bulbo espermático vista lateral. D. pierna 1, tibia apófisis. vista lateral E. pierna 1, tibia apófisis. vista retro lateral.	15
9	Anatomía interna hipotética de una tarántula hembra.	16
10	Diferenciación celular en arácnidos.	17
11	Respuesta inmunológica a lesión o enfermedad de los arácnidos.	18
12	Esquema del sistema inmunitario de los terafósidos; origen y función de las células del sistema inmune.	20
13	Las siete subunidades de hemocianina de <i>Aphonopelma hentzi</i> ; etiquetado en la derecha, hexámeros laterales	25

	mostrados en diferentes colores: (a) verde;(b) gris; (c) marrón;(d) amarillo; (e) rosa;(f) azul; (g) rojo.	
14	Electro estimulación de quelícero.	34
15	Extracción de veneno de <i>Theraphosa stirmi</i> .	34
16	Fundamento del método del ácido bicinconínico.	35
17	Cromatograma de veneno completo de <i>Theraphosa stirmi</i> ; 1% B/min.	42
18	Cromatograma del veneno crudo de <i>Theraphosa stirmi</i> , se muestra la separación en color rojo que corresponde a cada fracción recolectada; F1:0-15', F2:15-30', F3:30-45', F4:45-60'.	43
19	Comparación de la inhibición del crecimiento utilizando distintos tratamientos: las cuatro fracciones; F1(amarillo), F2(marrón), F3(Azul oscuro), F4(verde). Veneno (gris), Kanamicina (Gris claro), Albumina sérica bovina (azul claro), Control no inoculado (CNI)/(naranja). A las mismas concentraciones 1.25, 2.5, 5, 10 y 20 µg con el microorganismo <i>S. saprophyticus</i> (ATCC baa-750).	44
20	Comparación de la inhibición del crecimiento utilizando distintos tratamientos: las cuatro fracciones; F1(verde), F2(azul oscuro), F3(marrón), F4(gris oscuro). Veneno (gris claro), Kanamicina (azul claro), Albumina sérica bovina (naranja), Control no inoculado (CNI)/ (azul real). A las mismas concentraciones 1.25, 2.5, 5, 10 y 20 µg con el microorganismo <i>S. typhimurium</i> (ATCC 14028).	45
21	Medio agar Luria-Bertani, Bacterias 0.5 McFarland. A1: Fracción 0-15 min vs <i>Staphylococcus saprophyticus</i> (ATCC baa-750); A2: Fracción 0-15 min vs <i>Salmonella typhimurium</i> (ATCC 14028); B1: Fracción 15-30 min vs <i>Staphylococcus saprophyticus</i> (ATCC baa-750); B2: Fracción 15-30 min vs <i>Salmonella typhimurium</i> (ATCC 14028); C1: Fracción 30-45	47

	min vs <i>Staphylococcus saprophyticus</i> (ATCC baa-750); C2: Fracción 30-45 min vs <i>Salmonella typhimurium</i> (ATCC 14028).	
22	Medio agar Luria-Bertani, Bacterias 0.5 McFarland. D1: Fracción 30-45 min vs <i>Staphylococcus saprophyticus</i> (ATCC baa-750); D2: Fracción 30-45 min vs <i>Salmonella typhimurium</i> (ATCC 14028).	48
23	Resultado del conteo de UFC promedio de los ensayos realizados con una concentración de 800 µg/ml de veneno crudo de <i>Theraphosa stirmi</i> para la prueba de extensión en placa.	49
24	Árbol filogenético de distintas especies del orden Araneae (A), suborden Araneomorphae (B), Sub-orden Mygalomorphae (C). Especies araneomorfos (Rojo); Especies migalomorfos de subfamilias distintas a las tarántulas (<i>Theraphosidae</i>) (Verde); Migalomorfos pertenecientes a la subfamilia <i>Theraphosidae</i> (Azul).	50
25	Relación filogénica de los subórdenes Mesothelae, Mygalomorphae, Araneomorphae	53
26	Análisis BLAST del péptido GsMTx-4.	55
27	Análisis BLAST del péptido OH-Defensina.	55
28	Clasificación de dominio de GsMTx-4; Super familia "Toxin-12".	56

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Taxonomía de <i>Theraphosa stirmi</i>	4
2	AMPs identificados en algunos invertebrados	27
3	Comparación de la actividad antibacteriana de los distintos péptidos antimicrobianos reportados en tarántulas (Theraphosidae).	29
4	Concentración de inóculo de cada especie de microorganismo.	39

Dirección General de Bibliotecas UAQ

ABREVIATURAS

AMP: Péptido antimicrobiano (del inglés *Antimicrobial peptide*)

BCA: Ácido bicinconínico (del inglés *bicinchoninic acid*)

BSA: Albumina sérica bovina del (inglés *Bovine serum albumin*)

CLSI: Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (del inglés *Clinical & Laboratory Standards Institute*)

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia (del inglés *High performance liquid chromatography*)

RPC: Cromatografía de fase reversa (del inglés *Reversed-phase chromatography*).

MAMPs: Péptidos antimicrobianos de acción a membrana (del inglés *Membrane Active Antimicrobial Peptides*)

BLAST: Herramienta básica de búsqueda de alineación local (del inglés *Basic Local Alignment Search Tool*)

NCBI: Centro Nacional de Información Biotecnológica (del inglés *National Center for Biotechnology Information*)

MYA: Hace millones de años (del inglés *Million Years Ago*).

UMA: Unidades de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre.

I. INTRODUCCIÓN

La resistencia a los antibióticos representa un problema serio, pues se prevee que para el año 2050 sea la principal causa de muerte a nivel mundial (De Kraker *et al.*, 2016). En los últimos años se han desarrollado diversas alternativas a los antibióticos convencionales, el uso de enzimas, compuestos naturales provenientes de plantas, bacteriófagos y péptidos antimicrobianos (Gadde *et al.*, 2017). Los péptidos antimicrobianos (AMPs por sus siglas en inglés *Antimicrobial Peptides*), son moléculas que tienen la capacidad de interactuar con la membrana citoplasmática de los patógenos, poseen carga neta positiva y se caracterizan por un bajo peso molecular (Zasloff, 2002; Gutschmann, 2016). Estas moléculas se han identificado en los venenos de diversas especies de artrópodos y forman parte del sistema inmunitario (Vizioli & Salzet, 2002; Iwanaga, 2002; Yi *et al.*, 2015; Wang & Wang, 2016). Particularmente, el caso de las tarántulas (*Theraphosidae*), es un campo pobremente estudiado en este aspecto, aunque existen algunos antecedentes que reportan la presencia de moléculas con posible uso antibiótico (Jung, *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2011). En el caso de las tarántulas del género *Theraphosa* no existen estudios previos sobre compuestos antimicrobianos en su veneno. En el presente trabajo se desafiaron cepas tipificadas de microorganismos como bacterias Gram positivo, Gram negativo y hongos contra el veneno completo de la tarántula Goliath de Borgoña (*Theraphosa stirmi*) y cuatro fracciones obtenidas mediante la separación de cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa en concentraciones de proteína que fueron desde 1.25 µg hasta los 800 µg en la última metodología desarrollada.

II. ANTECEDENTES

2.1 Descripción de la especie.

Las tarántulas (Theraphosidae) Goliat pertenecen al suborden de los migalomorfos (Mygalomorphae), la familia de los terafósidos (Theraphosidae) que comprende 147 géneros y 984 especies descritas al momento (Coddington, 1991; World Spider Catalog, 2020). La tarántula Goliat fue inicialmente descrita por Pierre André Latreille como *Mygale blondii* en 1804 (Latreille, 1804). Sin embargo, el año 1996 se describió como *Theraphosa blondi* (Cuadro 1) (Pérez-Miles, *et al.*, 1996). Posteriormente, la especie *Theraphosa blondi* se separó en dos subespecies distintas, *Theraphosa blondi* y *Theraphosa apophysis* (Bertani, 2001). Fue hasta 2010 cuando se describió la tercera especie como *Theraphosa stirmi* (Rudloff & Weinmann, 2010).

Los organismos del género *Theraphosa* son especímenes que se caracterizan por su gran tamaño, el cual puede alcanzar entre los 28 y 30 cm de diámetro entre los extremos de sus patas totalmente extendidas y un peso de hasta 155 gramos (Figura 2). La coloración de estos ejemplares suele ser rojo oscuro, marrón oscuro y en ocasiones color naranja. Las crías de *Theraphosa stirmi* poseen la particularidad de tener los tarsos de las patas de color rosado. La dieta básica de las tarántulas del género *Theraphosa* incluye insectos e invertebrados como aves, roedores, anfibios y reptiles.

2.1.1 Hábitat y distribución.

La distribución geográfica de esta especie comprende el sureste de Guayana (Figura 1) (Gershenz, 1996; Carwardine, 2008; Carvalho *et al.*, 2017). Se desarrolla en una zona geográfica cercana a la línea ecuatorial, la temperatura de la región va desde 21°C como mínima y 31°C como máxima durante el año. La región se caracteriza por una alta humedad que se mantiene constante todo el año en un rango de 90-95% (Es.weatherspark.com consultado en 2020).



Figura 1. Mapa de distribución del género *Theraphosa*. *Theraphosa blondi* (amarillo), *Theraphosa stirmi* (rojo), *Theraphosa apophysis* (azul), *Theraphosa* no taxonomizada (naranja) (Adaptado de Rudloff & Weinmann, 2010; Datos geograficos © Google Maps).



Figura 2. Ejemplar juvenil de *Theraphosa stirmi*; Fotografía: Miguel Guzmán.

2.1.2 Taxonomía.

Cuadro 1. Taxonomía de *Theraphosa stirmi*

Filo	Arthropoda
Orden	Araneae
Suborden	Mygalomorphae
Familia	Theraphosidae
Subfamilia	Theraphosinae
Género	<i>Theraphosa</i>
Especie	<i>Theraphosa stirmi</i>

2.2 Anatomía externa.

Las tarántulas cuentan con un endoesqueleto que les provee un soporte interno y un exoesqueleto que les protege. La morfología de los terafósidos está constituida por dos partes principales, el prosoma y el opistosoma (Figura 3) que están unidos el uno al otro por una pequeña columna carnosa conocida como pedicelo. Por el pedicelo pasan nervios, el sistema digestivo y el sistema circulatorio. Cuentan con ocho piernas, dos extremidades frontales llamadas pedipalpos que cumplen funciones reproductivas y dos extremidades retractoras de los colmillos, llamadas quelíceros (Vlierberghe, 2015).

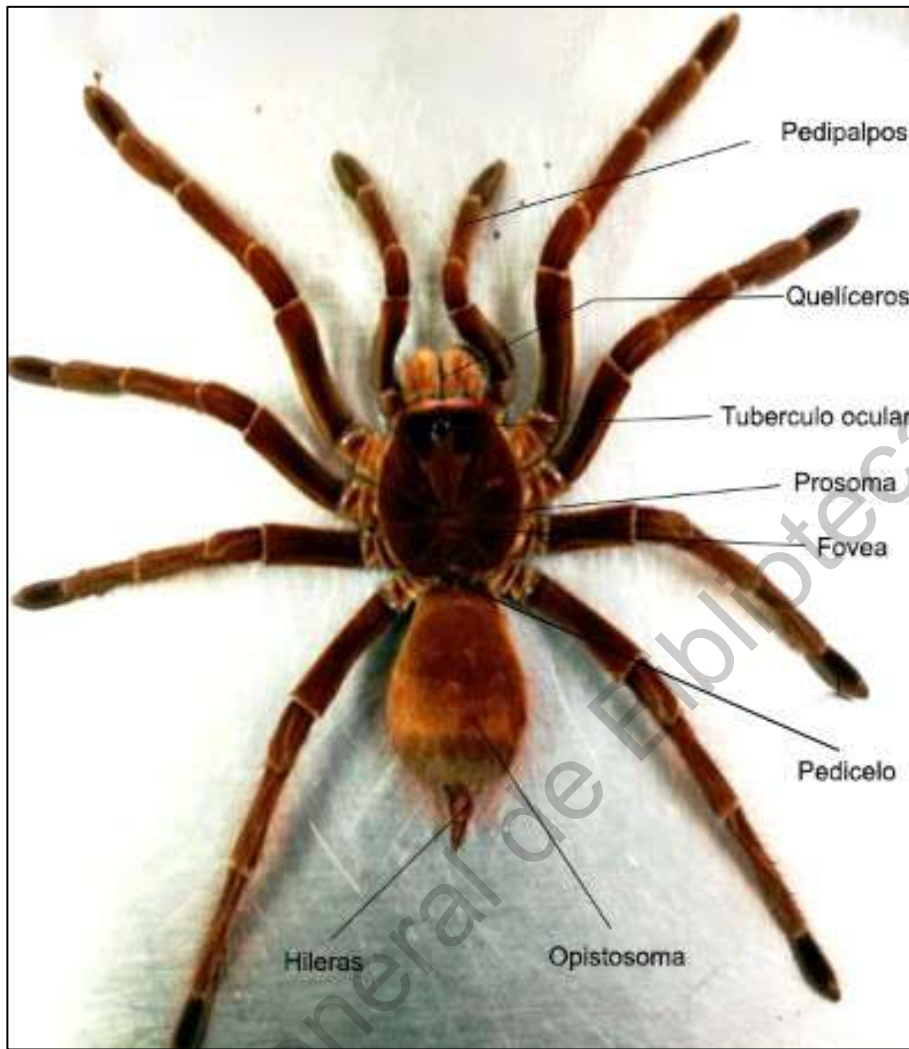


Figura 3. Morfología de la tarántula Goliat de Borgoña (*Theraphosa stirmi*).
Fotografía: Miguel Guzmán.

2.2.1 Prosoma.

El prosoma es la parte anterior al opistosoma, es la parte donde internamente se encuentran los músculos retractores que van conectados a los miembros para desplazamiento. En el prosoma también se encuentran órganos como el cerebro, el tubérculo ocular, los quelíceros, la boca, junto con el esófago y el estómago. Al prosoma también se le suele llamar caparazón debido a que posee una dureza superior a la de la parte posterior de los terafósidos, conocida como opistosoma (Orozco, 2020; Vlierberghe, 2020).

2.2.2 Opistosoma.

El opistosoma es la parte posterior al prosoma. A diferencia del prosoma, esta parte del cuerpo de la tarántula es una zona anatómica flexible. Tiene forma oval y recubierto en la superficie por vellos urticantes. El opistosoma contiene órganos internos como el libro de pulmón, los ovarios (o los testículos en el caso de los machos), los ductos copulatorios, así como las glándulas hileras y el tubérculo anal para la excreción de heces fecales (Orozco, 2020; Vlierberghe, 2020).

2.2.3 Pedicelo.

Es una hendidura localizada en el prosoma que lo une con el opistosoma. Por el cual pasa parte del sistema nervioso y circulatorio (Orozco, 2020; Vlierberghe, 2020).

2.2.4 Tubérculo ocular

Al conjunto de ocho ojos que se sitúa en la parte superior del prosoma, se le denomina tubérculo ocular. Los terafósidos al ser organismos nocturnos poseen una alta sensibilidad a los cambios de luz en sus ojos. Es la distinción entre luz y oscuridad el uso casi exclusivo del tubérculo ocular de los terafósidos (Orozco, 2020; Vlierberghe, 2020).

2.2.5 Glándulas hileras.

Los terafósidos poseen dos pares de glándulas hileras (hileras superiores e hileras inferiores) también conocidas como espineretos cuya función es la producción de seda o también conocida como tela. La función de la tela en los terafósidos va desde la construcción de una cama o tapete sobre el cual se alimentan, dar forma a la guarida, así como inclusive reproductivas como la fabricación del ovisaco por parte de las hembras (Orozco, 2020; Vlierberghe, 2020).

2.2.6 Glándulas de veneno

Las tarántulas poseen la habilidad de inocular veneno, esta acción es utilizada para sus funciones más básicas como la alimentación, su supervivencia y como método de defensa contra depredadores. El sistema de las glándulas de veneno es anatómicamente simple, los arácnidos cuentan con un órgano conocido como glándula de veneno o reservorio. A diferencia de los escorpiones, en las arañas y tarántulas, este se encuentra situado en la parte superior del quelícero y conectado directamente con los canales del colmillo (Figura 4) (Foelix, 2011).

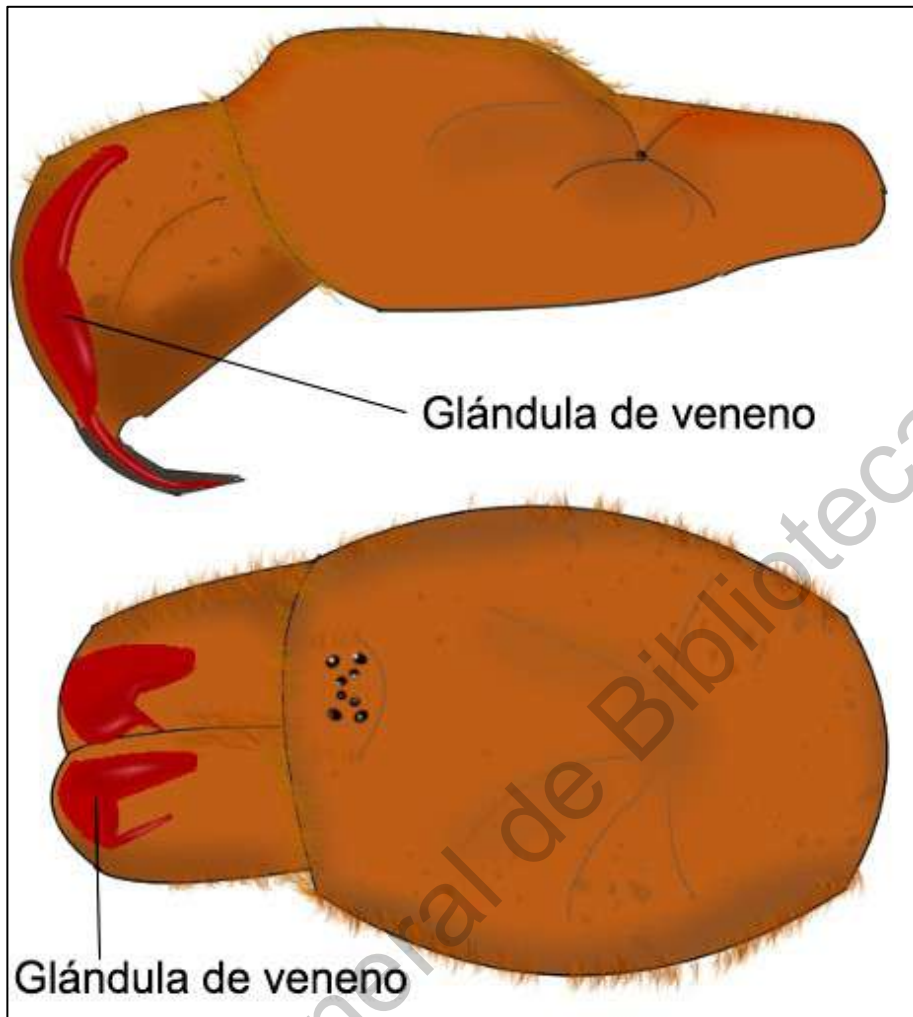


Figura 4. Localización putativa de la glándula de veneno en la tarántula Goliat de Borgoña (*Theraphosa stirmi*) (Imagen; Miguel Guzmán Adaptado de Undheim *et al.*, 2018).

2.3 Anatomía interna.

La característica principal del sistema circulatorio de invertebrados es que por él circula la hemolinfa, un fluido característico de los artrópodos que es el análogo de la sangre en otros organismos. Este fluido puede ser considerado multipropósito ya que transporta oxígeno, moléculas inorgánicas, iones, aminoácidos libres, etc. (Wyatt, 1961; Wirkner & Huckstorf, 2013). Las tarántulas tienen un sistema circulatorio abierto, lo que significa que el oxígeno a los órganos por contacto directo con los tejidos (Figura 9). El oxígeno es transportado con ayuda de la hemocianina, una metalo-proteína con 2 átomos de cobre que es el análogo de la hemoglobina en mamíferos. El corazón de las tarántulas se encuentra localizado en la parte superior del opistosoma, por encima del sistema digestivo y el sistema respiratorio (Comstock, 1912; Foelix, 2011; Wirkner & Huckstorf, 2013).

2.3.1 Sistema circulatorio.

El órgano cardíaco o corazón de las tarántulas es un órgano alargado con forma tubular en la parte dorsal del opistosoma. El órgano cardíaco de las arañas está formado por una cámara tubular, que recubre el corazón de la tarántula con túbulos flexibles de organizadas entradas y salidas de hemolinfa que fluyen por el sistema circulatorio libremente (Figura 5). Este órgano posee tres orificios de salida a lo largo de toda su longitud, tienen la función de válvulas a través de las cuales circula la hemolinfa bajo presión. Durante la contracción del órgano, la hemolinfa tiene la posibilidad de circular en tres direcciones distintas: hacia adelante a través de la aorta frontal, hacia atrás a través de la aorta posterior y hacia un lado. Al ingresar al corazón, la hemolinfa se mueve a través de la aorta frontal hasta el prosoma, donde irriga órganos y tejidos a través de capilares. Después es dirigida hacia el libro de pulmón donde se satura la hemolinfa con oxígeno y reingresa al corazón para volver a recircular (Wirkner & Huckstorf, 2013; Bagaturov, 2014).



Figura 5. Tomografía micro computarizada de un molde de resina del sistema vascular en el opistosoma de la araña *Cupiennius salei* (Huckstorf *et al.*, 2013).

2.3.2 Sistema digestivo.

El sistema digestivo de las tarántulas, al igual que otros arácnidos, esta inicialmente vinculado con la “digestión externa”. A diferencia de las arañas, no se ha demostrado que las tarántulas posean en su veneno enzimas digestivas como proteasas, de esta manera el proceso digestivo de las tarántulas es distinto al de las otras arañas. La boca se ubica entre los quelíceros, esta está conectada a la faringe que a su vez está conectada con el órgano de succión. Un conducto corto une al estómago con el intestino, atravesando el pedicelo hasta el abdomen (Opistosoma). En el opistosoma se encuentra una red de órganos conocida como túbulos de Malpighi que se unen al intestino. (Walter *et al.*, 2017).

La forma en la que la tarántula es capaz de procesar a sus presas se basa en la digestión externa que es producida por un bombeo de jugo digestivo desde el estómago. En esta parte de la alimentación, una gran variedad de hidrolasas, proteasas, lipasas, nucleasas y enzimas degradadoras de carbohidratos comienzan a descomponer los tejidos de las presas. También, se han identificado hialuronidasas en el veneno de terafósidos la cual se le adjudica acción en romper la matriz extracelular de las presas (Cohen, 1998; Girish & Kemparaju, 2007). Posteriormente, las partículas son filtradas por múltiples setas en la base de los quelíceros y pedipalpos. La presa líquida es succionada a través del órgano de succión del estómago y llega hasta el estómago verdadero, donde se digiere de manera parcial para posteriormente ser procesada en el intestino con los túbulos de Malpighi, de ahí en adelante los aglomerados de los alimentos ya digeridos son almacenados en la perforación estercoral para posteriormente ser eliminados a través del ano en forma de excretas (Bagaturov, 2014).

2.3.4 Sistema respiratorio.

Las arañas (Araneae) son los únicos animales conocidos que poseen una respiración tanto pulmonar como traqueal, es decir, respiran simultáneamente por sus órganos homólogos a los pulmones (Libro de pulmón) y la tráquea. El libro de pulmón funciona como un órgano difusor, el intercambio gaseoso es regulado por el área de entrada del espiráculo de este (Figura 9), que posee músculos que pueden contraer y relajar en función de la demanda y difusión del gas (Schmitz, 2016). En el caso de los migalomorfos, sub orden que agrupa a las tarántulas (Theraphosidae), estas poseen dos pares de libros de pulmón (Figura 6), lo que sustituye a la tráquea en el proceso respiratorio (Paul, 1992; Figueroa *et al.*, 2010).

2.3.5 Sistema reproductivo.

A pesar de que las tarántulas son invertebrados, la reproducción de estas se lleva a cabo de manera sexual, es decir la combinación del espermatozoides de un individuo macho y el ovulo de un individuo hembra es necesaria en el proceso de fertilización que dará lugar a nuevos individuos.

Las hembras poseen un par de ovarios y una apertura genital en el opistosoma ubicada cerca del libro de pulmón (Figura 6). En cuanto a los machos, estos poseen testículos internos en el opistosoma y los machos maduros poseen bulbos de retención de espermatozoides. En algunas especies, el tarso y la tibia se convierten en un espolón tibial que se utiliza para sostener a la hembra durante el apareamiento. En el caso de las tarántulas del género *Theraphosa* no se desarrolla dicha modificación, con excepción de *Theraphosa apophysis* que presenta la modificación en tarso y la tibia como otras especies de Mygalomorphae (Figura 8), pero sí que las tres especies del género desarrollan los bulbos espermáticos en machos maduros (Figura 7) (Figuerola *et al.*, 2010).



Figura 6. Ubicación del libro de pulmón y la apertura genital en hembra madura de *Theraphosa stirmi*. (Fotografía: Miguel Guzmán).



Figura 7. Macho de *Theraphosa stirmi* mostrando sus bulbos espermáticos.
(Fotografía: Redwizard000, 2013).



Figura 8. *Theraphosa apophysis* (Tinter, 1991) macho, cuerpo. A. Ejemplar. B. bulbo espermático derecho. Bulbo espermático vista lateral. D. pierna 1, tibia apófisis. vista lateral E. pierna 1, tibia apófisis. vista retro lateral (Almeida *et al.*, 2018).

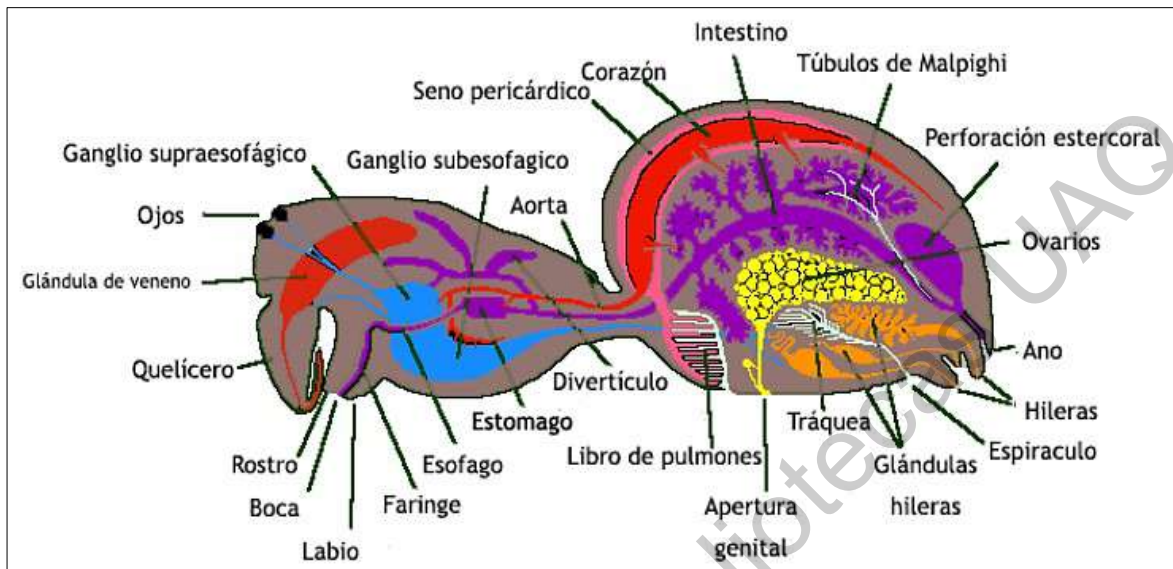


Figura 9. Anatomía interna hipotética de una tarántula hembra (Modificado; Ramel, 2018).

2.3.6 Sistema inmunitario.

Al sistema inmunitario de los artrópodos se le denomina como sistema inmune innato. Está basado en una respuesta rápida en cuestión de minutos a unas pocas horas

En los arácnidos, el sistema inmune está localizado principalmente en la hemolinfa. Los hemocitos se desarrollan a partir de las células en el corazón en la pared del principal órgano del aparato circulatorio de los terafósidos. Inicialmente, se desarrollan como pre-hemocitos y posteriormente se diferencian en distintos tipos de células como coagulocitos/granulocitos, plasmaticos, cianocitos y pre-hemocitos (Figura 10) (Kavanagh & Reeves, 2004; Kuhn-Nentwig & Nentwig, 2013).

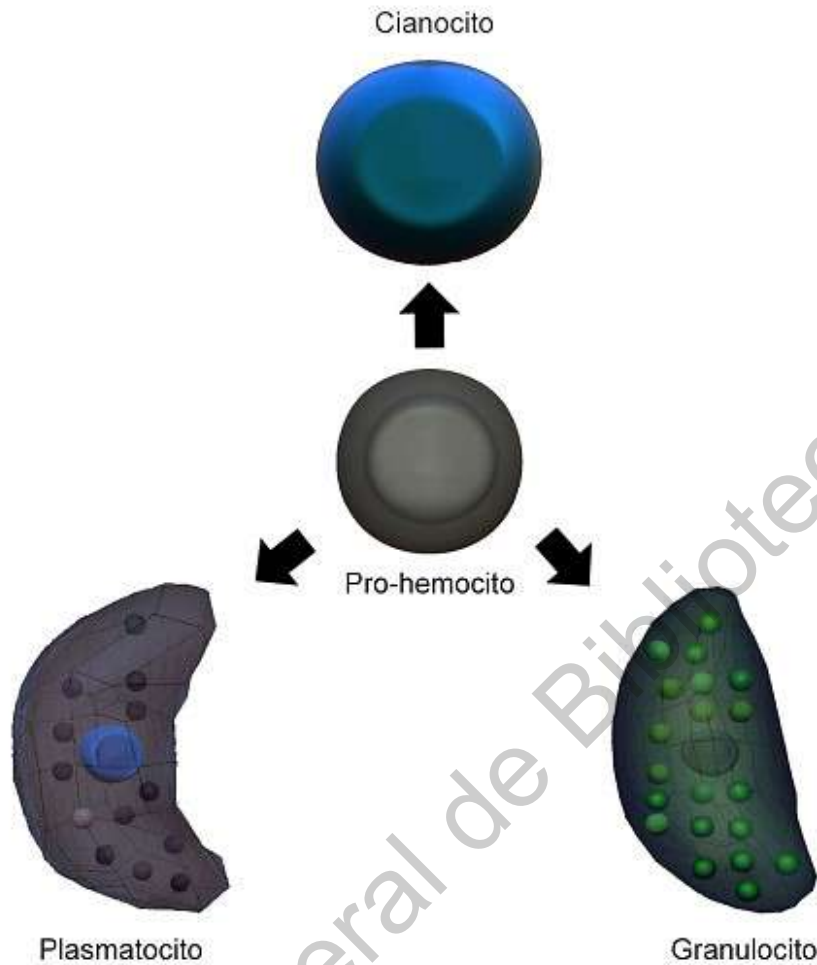


Figura 10. Diferenciación celular en arácnidos. (Imagen: Miguel Guzmán Modificado Kuhn-Nentwig & Nentwig, 2013).

Ante un estímulo de lesión o la invasión de un patógeno, los granulocitos y plasmátocitos entran en acción (Figura 11). Se consideran los tipos de hemocitos más importantes para los terafósidos. Los granulocitos son hemocitos que están recubiertos de gránulos los cuales contienen péptidos antimicrobianos que son liberados en la hemolinfa en presencia de un estímulo por patógenos externos en el proceso de degranulación y fagocitosis (Fukuzawa *et al.*, 2008). El rol de los plasmátocitos se da principalmente en el proceso de coagulación, son el tipo más común de hemocito presente en la hemolinfa. Presentan estructuras irregulares y

son de un tamaño similar a los granulocitos, también están involucrados en la fagocitosis de los patógenos (Kuhn-Nentwig & Nentwig, 2013; Gupta, 2019).

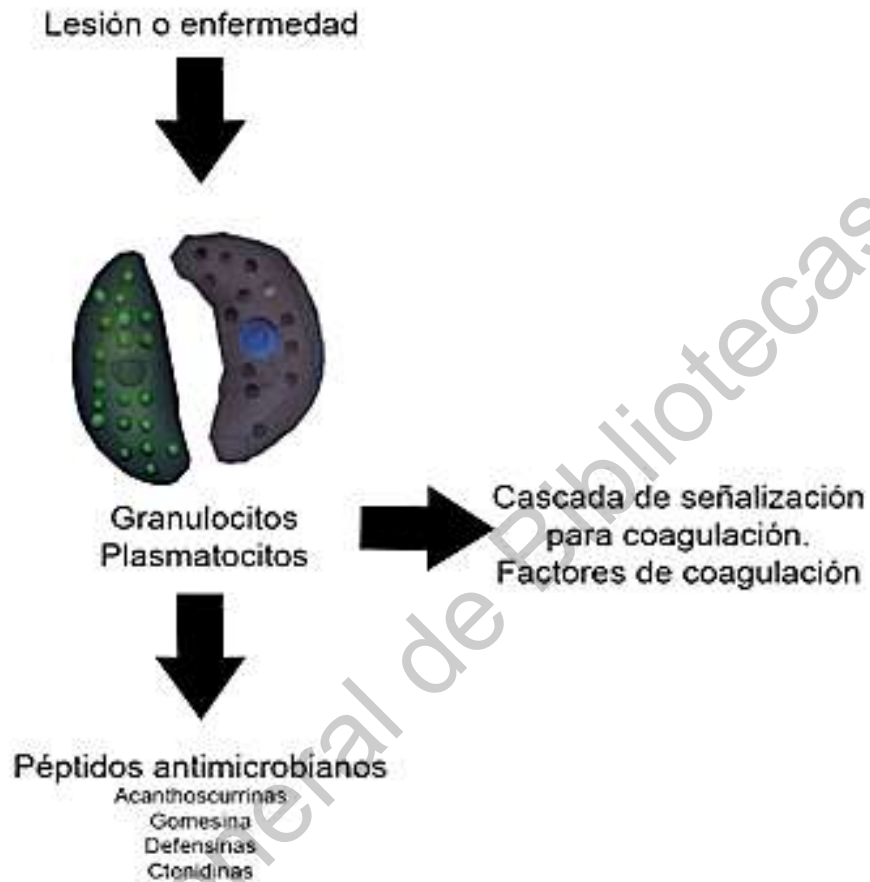


Figura 11. Respuesta inmunológica a lesión o enfermedad de los arácnidos. (Imagen: Miguel Guzmán; Modificado Kuhn-Nentwig & Nentwig, 2013).

2.3.7 Células del sistema inmune de los terafósidos.

2.3.7.2 Hemocitos.

La primera descripción de los hemocitos en un terafósido se le atribuye al investigador Sherman en 1973, quien trabajó con *Aphonopelma marxi* y describió la función de sus hemocitos en el proceso de coagulación y defensa inmunológica. La diferenciación de los hemocitos está catalogada con base en su función y anatomía. Se conocen hasta ahora coagulocitos/granulocitos, plasmaticitos, cianocitos y pre-hemocitos (Figura 12) (Sherman, 1973).

2.3.7.2 Coagulocitos / Granulocitos.

Los coagulocitos también conocidos como granulocitos, son células de la hemolinfa de artrópodos que poseen una forma y tamaño variable. Son de forma esférica y hialina. Están involucrados en el proceso de la formación del coágulo (Vetvicka & Sima, 2012; Gordh & Headrick, 2001). Estas células se encuentran llenas de gránulos que contienen péptidos antimicrobianos que en el proceso de degranulación son liberados en la hemolinfa con el objetivo de eliminar patógenos (Kuhn-Nentwig & Nentwig, 2013). También se les atribuye la eliminación de patógenos por fagocitosis (Fukuzawa *et al.*, 2008).

2.3.7.2 Plasmaticitos.

Se consideran la célula con mayor presencia en la hemolinfa de los artrópodos, poseen pocos gránulos muy finos en su citoplasma y una estructura triangular con picos irregulares. Los plasmaticitos son células involucradas en el proceso de fagocitosis de los patógenos, así como también en los procesos de coagulación (Sherman, 1981).

2.3.7.3 Cianocitos.

Los cianocitos son considerados como las células más abundante en el corazón de los terafósidos y la menos abundante en la hemolinfa, se estima que menos del 5% de las células en hemolinfa corresponden a cianocitos (Sherman, 1981) Su forma es redonda y alargada. Son la célula encargada de sintetizar la hemocianina, proteína encargada del transporte y la distribución del oxígeno y liberarla en la hemolinfa (Kemper, 1983).

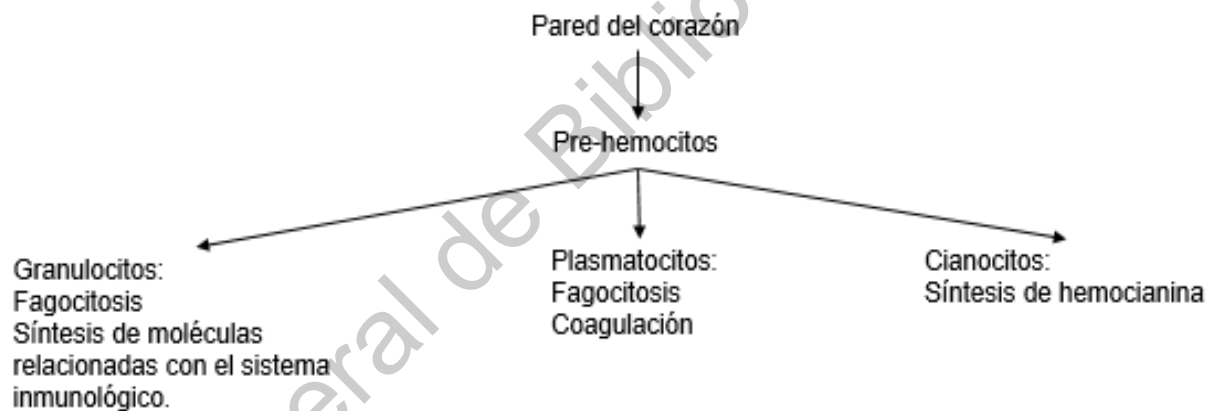


Figura 12. Esquema del sistema inmunitario de los terafósidos; origen y función de las células del sistema inmune (Modificado Kuhn-Nentwig & Nentwig, 2013; Imagen: Miguel Guzmán).

2.4 Venómica en artrópodos.

En el veneno de los arácnidos existe una gran abundancia de moléculas aún no caracterizadas, con funciones para un amplio uso en la farmacología, Receptores de canales iónicos, neurotóxicas, péptidos antimicrobianos, péptidos antifúngicos, etc. Sin embargo, la enorme diversidad farmacológica de estas toxinas ha sido muy poco explorada (Escoubas & Rash, 2004). A pesar de que existe una gran variedad de especies de arácnidos, se dice que solo se ha estudiado alrededor de 100 de estas (Vassilevski *et al.*, 2009).

El veneno en general es una mezcla multicomponente, tienen como finalidad el paralizar a la presa, matarla en algunos casos y hasta fungir como función de repelente (Bettini, 2013; Mebs, 2002). Particularmente, la composición del veneno de terafósidos está constituida predominantemente por péptido-toxinas de nudos de cistina, cuya actividad principal es la parálisis casi inmediata de las presas, modulando el canal iónico en las células musculares (Klint *et al.*, 2012; Undheim *et al.*, 2013; Herzig & King, 2013).

A la fecha, se han identificado y caracterizado péptidos antimicrobianos del veneno de algunas especies de arácnidos como *Pandinus imperator*, *Centruroides suffusus*, *Vaejovis punctatus* y *Ornithoctonus hainana* (Corzo *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2011; García *et al.*, 2013; Ramírez-Carretero *et al.*, 2015).

2.5 Péptidos antimicrobianos.

2.5.1 Generalidades de los péptidos antimicrobianos.

Los organismos eucariontes comúnmente se encuentran expuestos a una ingente cantidad de microorganismos (bacterias, hongos, levaduras, parásitos y virus), las tarántulas no son la excepción y poseen mecanismos de defensa ante el ataque de patógenos. Las tarántulas han desarrollado mecanismos de protección propios al sistema inmunitario conocido como innato. Uno de estos métodos se basa en la síntesis péptidos antimicrobianos (AMPs), que son moléculas pequeñas (<10 kDa) de carácter peptídico y longitud variable desde 10 hasta más de 50 aminoácidos (Zasloff, 2002; Harris *et al.*, 2009; Gutschmann, 2016). Estas moléculas actúan sobre distintos microorganismos patógenos como bacterias Gram positivo, Gram negativo, hongos, levaduras e incluso virus (Bulet *et al.*, 1999). Los péptidos suelen tener como característica en común que poseen carga positiva y son hidrofóbicos (Reddy *et al.*, 2004).

2.5.2 Clasificación de péptidos antimicrobianos.

Los AMPs se clasifican con base en su estructura y su secuencia, de esta manera se dividen en distintas familias como lo son las defensinas, péptidos ricos en glicina, péptidos cíclicos, y fragmentos de hemocianina (Kuhn-Nentwig *et al.*, 2013).

2.5.2.1 Defensinas.

Son pequeños péptidos catiónicos ricos en cisteína, que naturalmente se encuentran en una vasta cantidad de organismos vertebrados e invertebrados, y las plantas y organismos del reino fungi no son la excepción (Wu *et al.*, 2014). Las defensinas identificadas en artrópodos son particularmente pequeñas; son péptidos compuestos por 37 residuos de aminoácidos que mantienen un patrón de enlaces de cisteínas (C1–C4, C2–C5, C3–C6) (Froy & Gurewitz, 2003). La actividad

antimicrobiana primaria de las defensinas es contra bacterias Gram positivos. Particularmente, se han caracterizado defensinas de varios géneros de araneomorfos (Araneae) (*Argiope*, *Cupiennis*, *Phoneutria*, *Tegenaria*) que presentan una homología de 75-100% a nivel de aminoácidos (Baumann *et al.*, 2010).

En tarántulas (Theraphosidae) existe el reporte de la OH-Defensina, caracterizada del veneno de *Ornithoctonus hainana* que posee actividad inhibitoria para bacterias Gram positivos, Gram negativos y levaduras. Sin embargo, no se ha demostrado la presencia de defensinas en las células de ningún migalomorfo (Lorenzini *et al.*, 2006).

2.5.2.2 Péptidos ricos en glicina.

Péptidos antimicrobianos que se caracterizan por un alto contenido de glicina en su estructura (71-73%) y solo de 6 a 8 aminoácidos adicionales. Hasta ahora en arañas se conocen dos subfamilias muy similares, las acanthoscurrinas y las ctenidinas. En los terafósidos (Theraphosidae) se han aislado y caracterizado dos isoformas de la tarántula *Acanthoscurria gomesiana*, acanthoscurrina 1 y 2 tienen una longitud de 130 y 132 aminoácidos respectivamente y ambas una masa molecular cercana a 10 kDa, estos péptidos han demostrado actividad en contra de *Escherichia coli*, *Micrococcus Luteus* y *Candida albicans*. Se sabe que se expresan de manera constitutiva en los hemocitos de las tarántulas *Acanthoscurria* (Lorenzini *et al.*, 2003; Fukuzawa *et al.*, 2008). En el caso de las ctenidinas, se han aislado 3 isoformas de la araña errante (*Cupiennius salei*). Son péptidos de no más de 120 aminoácidos de longitud y un peso molecular menor a 10 kDa que presentan actividad contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* (Baumann *et al.*, 2010).

2.5.2.3 Péptidos cíclicos.

En tarántulas (Theraphosidae) un ejemplo de este tipo de péptidos es conocido como gomesina, un péptido pequeño de 2.3 kDa, aislado de los hemocitos presentes en la hemolinfa de la tarántula *Acanthoscurria gomesiana*. La gomesina

posee una estructura cíclica sin límites fijos (Open-Ended) constituida por 18 aminoácidos (Silva *et al.*, 2000). La gomesina se encuentra expresada constitutivamente en los granulocitos de la tarántula y es liberada en la hemolinfa ante un estímulo de un lipopolisacárido. La gomesina ha probado ser útil afectando el crecimiento de 24 microorganismos entre los que se encuentran bacterias Gram positivos, Gram negativos, hongos y levaduras (Fukuzawa *et al.*, 2008). Ha sido desafiada también contra organismos eucariotas como *Leishmania amazonensis* y eritrocitos humanos, mostrando también actividad citotóxica tanto en experimentos *in vitro* como *in vivo*. Se ha propuesto que la citotoxicidad de la gomesina es debida a que se involucra con la entrada de iones a canales de calcio de tipo L, así como la señalización intracelular y la generación de especies reactivas de oxígeno (Soletti *et al.*, 2010).

2.5.2.4 Fragmentos de hemocianina.

En los últimos años, se ha caracterizado un péptido antifúngico presente en la hemolinfa de *Acanthoscurria rondoniae*. Como su nombre lo indica, este péptido no posee actividad inhibitoria contra bacterias Gram positivos o bacterias Gram negativos, por otro lado, es efectivo inhibiendo el crecimiento de hongos y levaduras. El péptido fue bautizado como Rondonina (IIIQYEGHKH) y se encuentra en la porción del carbono terminal de la subunidad "D" de la hemocianina (Figura 13) de *Acanthoscurria rondoniae* (Riciluca *et al.*, 2012).

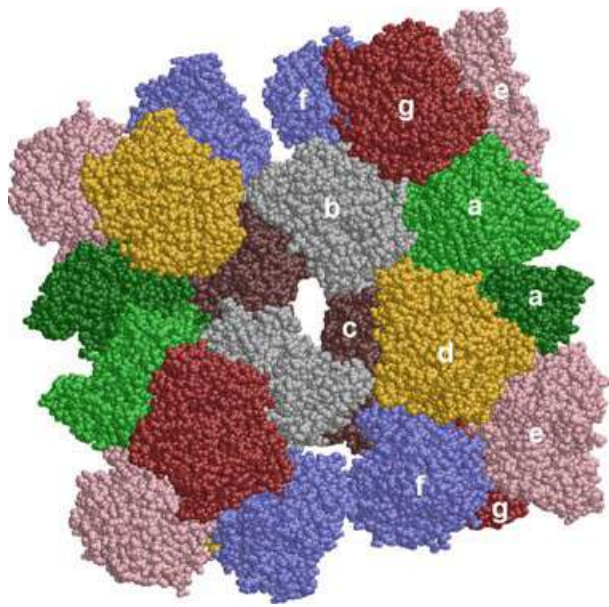


Figura 13. Las siete subunidades de hemocianina de *Aphonopelma hentzi*; etiquetado en la derecha, hexámeros laterales mostrados en diferentes colores: (a) verde;(b) gris; (c) marrón;(d) amarillo; (e) rosa;(f) azul; (g) rojo (Burmester, 2012).

2.6 Péptidos antimicrobianos de invertebrados.

Más de 150 péptidos antimicrobianos (AMP) han sido caracterizados en distintos organismos invertebrados. El primer AMP aislado de un insecto fue caracterizado a partir de la hemolinfa de la polilla de cecropia (*Hyalophora cecropia*) en los años 80. Desde entonces más de 150 AMPs han sido identificados en organismos invertebrados (Vizioli & Salzet, 2002). Se han aislado también de insectos voladores como la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*), la abeja común europea (*Apis cerana*) y en escarabajos como el escarabajo de la harina (*Tenebrio molitor*) e invertebrados acuáticos como el cangrejo herradura japonés (*Tachypleus tridentatus*) y el camarón patiblanco (*Litopenaeus vannamei*) (Reddy *et al.*, 2004). Los AMPs también se encuentran en diversas especies de artrópodos como escorpiones, garrapatas, cangrejos herradura, arañas y tarántulas (Iwanaga, 2002; Zhao *et al.*, 2011; Yi *et al.*, 2015; Wang & Wang, 2016).

Cuadro 2. AMPs identificados en algunos invertebrados

Péptido	Organismo de origen	Tejido	Bibliografía
antimicrobiano			
Cecropina A	<i>Bombyx mori</i>	H,E	Vizioli & Salzet, 2002
Drosomisina	<i>Drosophila melanogaster</i>	H	Imler & Bulet, 2005
Androctonin	<i>Androctonus australis</i>	H	Ehret-Sabatier <i>et al.</i> , 1996
Oh-Defensina	<i>Ornithoctonus hainana</i>	V	Zhao <i>et al.</i> , 2011
IP-Defensina	<i>Ixodes persulcatus</i>	H	Saito <i>et al.</i> , 2009
VpAmp 1 y 2	<i>Vaejovis punctatus</i>	GV	Ramírez <i>et al.</i> , 2015
Css54	<i>Centruroides suffusus</i>	V	Garcia <i>et al.</i> , 2013
Defensin-like	<i>Haemaphysalis longicornis</i>	H	Zhou <i>et al.</i> , 2007
Ctenidina	<i>Cupiennius salei</i>	H	Baumann <i>et al.</i> , 2010
Gomesina	<i>Acanthoscurria gomesiana</i>	H	Silva Jr <i>et al.</i> , 2000
Acanthoscurrina	<i>Acanthoscurria gomesiana</i>	H	Fukuzawa <i>et al.</i> , 2008
Pandinina	<i>Pandinus imperator</i>	V	Corzo <i>et al.</i> , 2001

H, Hemolinfa; E, Epitelio; V, Veneno; GV, Glándula de veneno.

2.6.1 Péptidos antimicrobianos de arácnidos.

A pesar del amplio estudio de los AMPs en invertebrados, su caracterización en arácnidos es escasa. Se han caracterizado y purificado péptidos de la hemolinfa de varias especies de garrapata (*Boophilus microplus*, *Ixodes persulcatus*, *Haemaphysalis longicornis*, *Amblyomma hebraeum*) que poseen actividad inhibitoria contra bacterias Gram positivos y Gram negativos. En algunas especies de escorpiones (*Androctonus australis* Y *Centruroides limpidus*.) (Ehret-Sabatier *et al*, 1996; Fogaça *et al.*, 1999; Ren *et al.*, 2004; Rodríguez de la Vega *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2007; Saito *et al.*, 2009). En organismos más cercanos a los terafósidos se ha caracterizado la ctenidina un péptido rico en glicina aislado de *Cupiennius salei* (Baumann *et al*, 2010).

Los terafósidos, organismos de metabolismo lento, carentes de sistema inmunitario adaptativo y habitantes de lugares privados de luz, húmedos, cálidos (temperaturas superiores a los 25°C) y aislados, se desarrollan en un ambiente idóneo para el crecimiento y desarrollo de una ingente cantidad de patógenos, desde microorganismos hasta parásitos. Debido a esto, los terafósidos han desarrollado un sistema inmune innato muy poderoso (Zhao *et al.*, 2005; Mirghani *et al*, 2012; Wright & Goodacre, 2012).

Particularmente, en terafósidos se han caracterizado péptidos como la gomesina, la acanthoscurrina 1 y 2; caracterizada en *Acanthoscurria gomesiana* y la rondonina de *Acanthoscurria rondoniae* (Silva Jr *et al.*, 2000; Lorenzini *et al.*, 2003). También, se han caracterizado AMPs provenientes del veneno de varias especies de arácnidos como *Pandinus imperator*, *Centruroides suffusus*, *Vaejovis punctatus* y *Ornithoctonus hainana* (Corzo *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2011; García *et al.*, 2013; Ramírez-Carretero *et al.*, 2015) (Cuadro 3).

Cuadro 3. Comparación de la actividad antibiótica de los distintos péptidos antimicrobianos reportados en terafósidos (Theraphosidae).

M.O	Actividad inhibitoria				
	Gomesina	Rondonina	Acanthoscurrinas	Juruina	OH-Defensina
Bacterias Gram positivo					
<i>Staphylococcus sp.</i>	A	ND	NP	ND	A
<i>Listeria monocytogenes</i>	NP	NP	NP	NP	NP
Bacterias Gram negativo					
<i>Escherichia coli</i>	A	ND	A	ND	A
<i>Salmonella tiphy</i>	NP	NP	NP	NP	NP
Levaduras					
<i>Candida albicans</i>	A	A	A	A	A
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NP	NP	NP	NP	NP
<i>Candida Sp.</i>				A	

A: Actividad inhibitoria reportada contra la especie; ND: Actividad inhibitoria no detectada en el ensayo contra la especie; NP: Actividad inhibitoria no probada contra la especie.

II. HIPÓTESIS

En el veneno de *Theraphosa stirmi* existen péptidos antimicrobianos con actividad inhibitorias en bacterias y levaduras.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

III. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad el principal tratamiento para combatir infecciones bacterianas ha sido el uso de antibióticos, sin embargo, en los últimos años se ha visto limitada la eficacia de estos, debido a que se ha generado resistencia por parte de los microorganismos patógenos. Menos del 2% de la investigación farmacológica está enfocada al desarrollo de nuevos antibióticos y se estima que para el año 2050 la principal causa de mortalidad en el mundo sean las afecciones relacionadas con la resistencia bacteriana. Se prevén hasta 10,000,000 muertes por año debido a esto. Aunado a este hecho, el desarrollo de antibióticos en las últimas tres décadas ha sido escasa, solo se han desarrollado variantes de los fármacos, pero no nuevos principios activos. Debido a esto, es importante desarrollar nuevas alternativas con características antibacterianas y de esta manera desarrollar nuevas alternativas antibióticas. Se sabe que en el veneno y en sistema inmunitario de los arácnidos existe una gran abundancia de nuevas moléculas aún no caracterizadas con funciones para una amplia variedad de receptores con actividad en canales de sodio, potasio y calcio, péptidos antimicrobianos, péptidos antifúngicos, etc. A pesar de que existe una gran variedad de especies de arácnidos, se estima que solo se ha estudiado alrededor de 100 especies distintas. *Theraphosa* es un género poco estudiado de artrópodos y no existe caracterización alguna de péptidos propios del sistema inmunitario en este género. Es por eso que en el presente trabajo se pretende caracterizar la actividad antibiótica de bacterias Gram positivos, Gram negativo y levaduras.

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Caracterizar la actividad antimicrobiana del veneno de *Theraphosa stirmi*

4.2 Objetivos específicos

- 1) Caracterizar químicamente el veneno de *Theraphosa stirmi*
- 2) Determinar el efecto antibacteriano del veneno de *Theraphosa stirmi*
- 3) Determinar el efecto antibacteriano de las fracciones provenientes del veneno de *Theraphosa stirmi*.
- 4) Determinar el efecto antifúngico del veneno de *Theraphosa stirmi*

V. METODOLOGÍA

5.1 Especímenes

El modelo animal utilizado para el presente trabajo de investigación fue la tarántula Goliath de Borgoña (*Theraphosa stirmi*). En total dieciséis ejemplares de entre 20-25 cm de envergadura, reproducidas en cautiverio, que fueron proporcionadas por el arcnario de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro (Registro U.M.A en trámite). Los ejemplares fueron mantenidos en terrarios individuales de (50x50x30 cm) con una mezcla 1:1 de Peat moss y fibra de coco (Peat moss/Fibra de coco, Petmmal®) a una temperatura de 28° - 30°C con humedad relativa de 90%. Se mantuvieron con agua disponible en todo momento y fueron alimentadas 2 veces por semana con cucaracha de Madagascar (*Gromphadorhina portentosa*).

5.2 Declaración de ética

El uso de los ejemplares y la metodología fue llevado a cabo bajo la aprobación del comité institucional de bioética de la Universidad Autónoma de Querétaro con el número de registro **119FCN2018**.

5.3 Extracción de veneno

El veneno se extrajo por medio de estimulación eléctrica en la base de los quelíceros, para ello las tarántulas se privaron de alimento durante una semana con el objetivo de obtener una mayor cantidad de veneno. Previo a la extracción, las tarántulas se anestesiaron con isoflurano (Sofloran® Vet, PiSA® Agropecuaria), Se colocaron micro tubos estériles (Flex-Tube®, Eppendorf Quality™) de 1.5 ml bajo los colmillos de las tarántulas para recibir el veneno (Figura 15). La electroestimulación se aplicó utilizando electrodos de una fuente de poder modificada para electroforesis. (PowePac Basic, Bio-Rad, Hércules, CA, USA Cat # 164-5050) a 15

volts por 2 segundos con intervalos de 2 segundos entre choques durante 1 minuto (Figura 14). El veneno fue liofilizado y posteriormente almacenado a -70°C . (Rocha-Silva *et al.*, 2017).



Figura 15. Extracción de veneno de *Theraphosa stirmi*.



Figura 14. Electro estimulación de quelícero.

5.4 Cuantificación de proteína

Se determinó la concentración de proteína en el veneno utilizando el método del ácido bicinconínico (BCA), el cual es un método basado en colorimetría que combina la reducción del óxido de cobre II (Cu^{2+}) a óxido de cobre I (Cu^{1+}) en medio alcalino (reacción de Biuret) utilizando ácido bicinconínico (Figura 16). Los resultados son comparados con una curva estándar de albumina sérica bovina (BSA) y medidos a 562 nm (Fujimoto *et al.*, 1951).

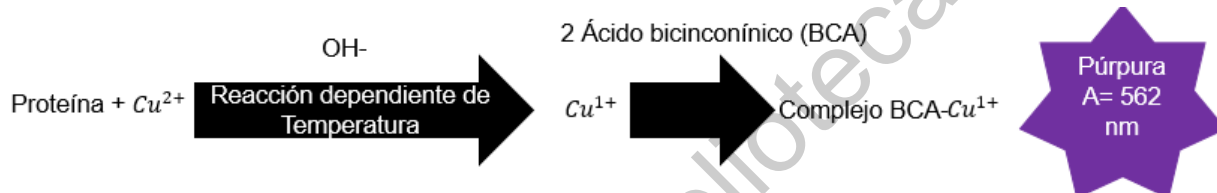


Figura 16. Fundamento del método del ácido bicinconínico. Adaptado: Fujimoto *et al.*, 1951).

5.5 Fraccionamiento del veneno

El procedimiento de RHPLC (cromatografía de líquidos de alta resolución de fase reversa) del veneno de la tarántula *Theraphosa stirmi* se llevó a en las instalaciones del Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Química. Se utilizaron 100 μ g de proteína para cada inyección, usando como solución A: agua/ Ácido trifluoroacético al 0.1 %, y como solución B: acenotinitrilo / Ácido trifluoroacético 0.09%, con un flujo de 1 ml/minuto, en una columna C18, 4.6 \times 250 mm, aplicando un gradiente lineal 1.6%, de 0-100% de solución B. Posteriormente, para ajustar la pendiente y realizar una mejor separación, se trabajó con un gradiente lineal 0.65%, de 0-59% de solución B. La absorbancia fue monitoreada a 210 nm.

5.6 Microorganismos utilizados

Las cepas de bacterias y levaduras utilizadas en los ensayos experimentales pertenecen a la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC - American Type Culture Collection): *Staphylococcus saprophyticus* (ATCC baa-750), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Candida albicans* (ATCC 276), *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC MYA-198), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644) y *Escherichia coli* (ATCC 25922).

5.7 Ensayos antibióticos

5.7.1 Ensayo antibacteriano del veneno de *Theraphosa stirmi*

La actividad antimicrobiana del veneno se analizó mediante un ensayo de inhibición del crecimiento líquido utilizando la bacteria Gram-negativo *Salmonella tiphymurium* (ATCC 14028) y la bacteria Gram-positivo *Staphylococcus saprophyticus* (ATCC baa-750) que se cultivaron en caldo BD Difco™ Mueller-Hinton. La determinación de la actividad antimicrobiana tanto del veneno completo como de las fracciones obtenidas por RHPLC, se realizó utilizando un ensayo de dilución de caldo de microdilución por quintuplicado en placas estériles de 96 pocillos a un volumen final de 100 µl. Las fracciones y el veneno se probaron por triplicado. las placas de 96 pocillos se incubaron en cámaras húmedas a $37^{\circ} \pm 2$ C durante 20 horas. Los resultados se analizaron mediante la medición de absorbancia en un lector de placas a 655 nm, con la finalidad de determinar el grado de inhibición del crecimiento bacteriano. Los protocolos se apegaron a los manuales del CLSI (Clinical & Laboratory Standards Institute, 2016).

Se realizó un ensayo de difusión en disco en placas Petri estándar utilizando Agar Luria-Bertani (LB). Se vertieron 100 µL de caldo BD Difco™ Mueller-Hinton con el inóculo ajustado a 0.5 en la escala de McFarland. Se utilizaron 5, 10 y 20 µg de veneno para empapar los discos de papel filtro de 6 mm (Whatman No. 42) y 5, 10 y 20 µg de proteína de cada una de las fracciones obtenidas de la separación por RHPLC. Los discos se colocaron sobre las superficies de cada placa con agar Luria-Bertani. Se utilizaron los microorganismos *Staphylococcus saprophyticus* (ATCC baa-750) y *Salmonella tiphymurium* (ATCC 14028). Las placas se incubaron invertidas a $37^{\circ} \pm 2$ C por 18 horas. Posteriormente, se midieron los halos de inhibición incluyendo el diámetro de los discos (Mahasneh & El-Oqlah, 1999; Rossi

et al., 2002).

Como último ensayo, se realizó el ensayo de extensión en placa con los microorganismos *Staphylococcus saprophyticus* (ATCC baa-750), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644) y *Escherichia coli* (ATCC 25922). Se tomó una colonia aislada de cada bacteria, se incubó en caldo BD Difco™ Mueller-Hinton durante 24h a 37 ± 2 . Después de 24h los tubos fueron centrifugados a 5500 g x 10 minutos y se decantó el sobrenadante, posteriormente se les añadió 10 ml de H₂O estéril y se repitió el proceso tres veces. Se realizaron diluciones seriadas hasta obtener una concentración de inóculo (UFC/ml) deseable para el ensayo. Se manejaron tres placas como controles negativos y tres placas como tratamiento, así como tres placas controles no inoculados (CNI). Para el control negativo se extendieron 100 µl con un aza de cristal en placas con agar Luria-Bertani y se incubaron invertidas a $37 \pm 2^\circ\text{C}$. Para el tratamiento se extrajeron 800 µl de la solución y posteriormente se añadieron 800 µg de veneno completo de *Theraphosa stirmi*. Se dejó reposar a temperatura ambiente durante 1 h ($32^\circ \pm 2$ C). Posteriormente se extendieron 100 µl con un aza de cristal en placas con agar Luria-Bertani y se incubaron invertidas a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24h. El control no inoculado consistió de placas con agar Luria-Bertani el cual no se le fue inoculado ningún microorganismo (Zhao *et al.*, 2011).

5.7.2 Ensayo antimicótico del veneno de *Theraphosa stirmi*

El ensayo antifúngico se realizó usando un ensayo de extensión en placa con los microorganismos *Candida albicans* (ATCC 276) y *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC MYA-198). Se tomó una colonia aislada de cada microorganismo, se incubó en 10 ml caldo en caldo YPDB, durante 24h a $37^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ para *Candida albicans* y $25^\circ \pm 2$ C para *Saccharomyces cerevisiae*. A las 24h los tubos fueron centrifugados a 5500 G x 10 minutos y se decantó el sobrenadante. Posteriormente se les añadió 10 ml de H₂O estéril y se repitió el proceso tres veces. Se realizaron diluciones seriadas hasta obtener una concentración de inóculo (UFC/ml) deseable para el ensayo. Se extendieron 100 µl con un aza de cristal en placas con agar Luria-Bertani

y se incubaron durante 24h a 37 ± 2 C para *Candida albicans* y 25 ± 2 C para *Saccharomyces cerevisiae*. Para el tratamiento se extrajeron 800 μ l de la solución y posteriormente se añadieron 800 μ g de veneno de *Theraphosa stirmi* y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 1 h (32 ± 2 C) posteriormente se extendieron 100 μ l con un aza de cristal en placas con agar Luria-Bertani y se incubaron invertidas. El control no inoculado consistió en placas con agar Luria-Bertani el cual no se le fue inoculado ningún microorganismo (Zhao *et al.*, 2011).

Cuadro 4. Concentración de inóculo de cada especie de microorganismo.

Concentración de inóculo UFC/ml	Especie
2.6×10^3	<i>Listeria monocytogenes</i> (ATCC 7644)
1×10^3	<i>Salmonella tiphymurium</i> (ATCC 14028)
1×10^2	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)
1×10^3	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> (ATCC baa-750)
1×10^2	<i>Candida albicans</i> (ATCC 276)
1×10^3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (ATCC MYA-198)

5.8 Análisis filogenético

Con el objetivo de conocer la cercanía evolutiva entre distintas especies de arañas (Araneae). En algunas de las cuales se ha reportado la caracterización de péptidos antimicrobianos provenientes de su veneno y sistema inmunitario. Se realizó un árbol filogenético en BEAST (Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees) (Suchard *et al.*, 2018). Con las condiciones: Modelo de sustitución: HKY, frecuencias base: Estimadas, modelo de sitio de heterogenicidad: Ninguno, Clock type: Estricto, Tree model: UPGMA starting tree (Hasegawa & Kishino, 1985). Se repitió utilizando MEGA (Molecular Evolutionary Genetic Analysis) (Kumar *et al.*, 2018) bajo las mismas condiciones y finalmente con Clustal Omega (Madeira, y otros, 2019). Las condiciones se basaron en las de estudios previamente realizados en arácnidos (Sirvid, Moore, Chambers, & Prendergast, 2013; Garrison, y otros, 2016; Foley, y otros, 2019)

En los tres métodos se utilizó la secuencia FASTA de aminoácidos de la “Subunidad 1 - NADH deshidrogenasa” de cinco especies del suborden araneomorfos (Araneomorphae), cuatro especies del suborden migalomorfos (Mygalomorphae) de familias diferentes a las tarántulas (Theraphosidae) y catorce especies pertenecientes a 9 géneros distintos de tarántulas (Theraphosidae), incluyendo las 3 especies hasta ahora taxonomizadas del género *Theraphosa* obtenidas del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, 1988).

5.9 Análisis estadístico

Se desarrollo un análisis estadístico de los resultados de la microdilución en placa, el conteo de UFC de la metodología de extensión en placa. Se utilizó el software estadístico IBM SPSS® Statistics versión 23 (IBM, 2015) con un nivel de significancia de $P \leq 0,05$ y una prueba de Tukey HSD (diferencia honestamente significativa), para la metodología de extensión en placa se realizó una ANOVA de con un nivel se significancia de $P \leq 0,05$.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Fraccionamiento del veneno de *Theraphosa stirmi*

Utilizando cromatografía de fase reversa, se obtuvo un cromatograma del veneno crudo de *Theraphosa stirmi* (Figura 17), el cual se dividió en cuatro cuadrantes (Figura 18), que dieron como resultado cuatro fracciones que se utilizaron en la prueba de microdilución en plato y en la prueba de difusión en disco.

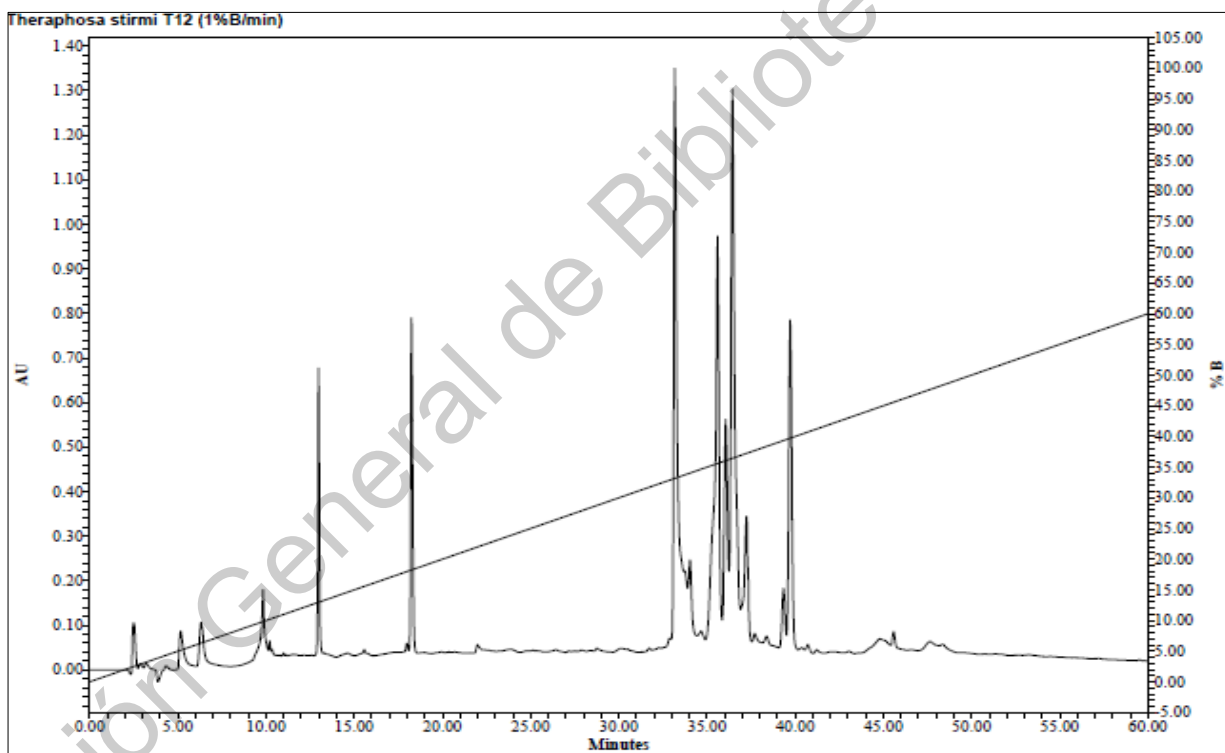


Figura 17. Cromatograma de veneno completo de *Theraphosa stirmi*; 1% B/min.

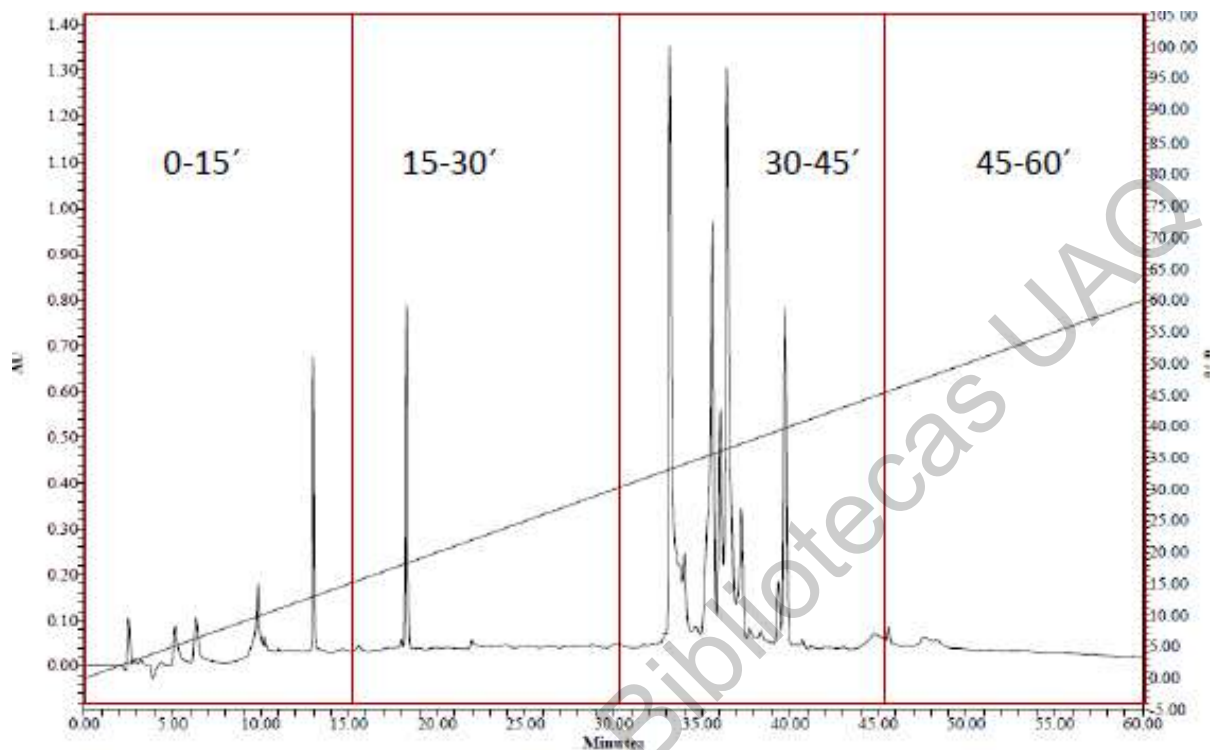


Figura 18. Cromatograma del veneno crudo de *Theraphosa stirmi*, se muestra la separación en color rojo que corresponde a cada fracción recolectada; F1:0-15', F2:15-30', F3:30-45', F4:45-60'.

6.2 Actividad antibacteriana del veneno de *Theraphosa stirmi* determinada mediante la inhibición del crecimiento líquido

La actividad antibacteriana del veneno de *Theraphosa stirmi* se analizó utilizando una especie de bacteria Gram positivo y una especie de bacteria Gram-negativo. Se desafió a los estos organismos en concentraciones que van de 1.25 a 20 μg y se demostró que con estas concentraciones y siguiendo esta metodología no existe inhibición del crecimiento de la bacteria Gram-negativo *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) y la bacteria Gram-positivo *Staphylococcus saprophyticus* (ATCC baa-750).

6.2.1 Actividad antibacteriana de las fracciones del veneno de *Theraphosa stirmi* determinada mediante la inhibición del crecimiento líquido

La actividad antibacteriana de cuatro fracciones obtenidas del veneno de *Theraphosa stirmi* por medio de cromatografía líquida de fase reversa se analizó utilizando una especie de bacteria Gram positivo y una especie de bacteria Gram-negativo. Se desafió a los estos organismos en concentraciones que van de 1.25 a 20 μg de cada fracción y se demostró que con estas concentraciones y siguiendo la metodología antes planteada no existe inhibición significativa del crecimiento de la bacteria Gram-negativo *Salmonella tiphymurium* (ATCC 14028) (Figura 20) y la bacteria Gram-positivo *Staphylococcus saprophyticus* (ATCC baa-750) (Figura 19).

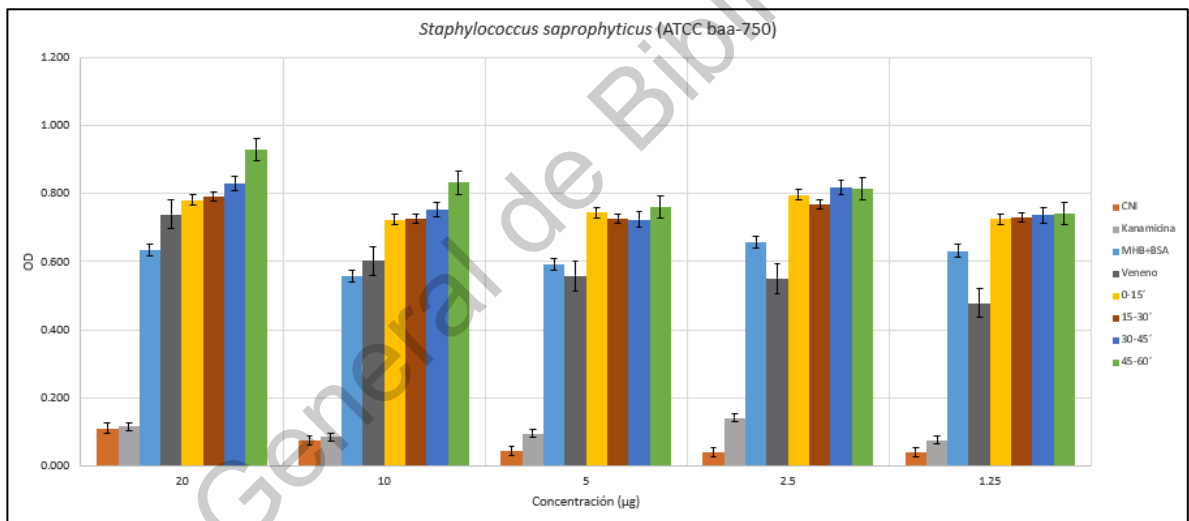


Figura 19. Comparación de la inhibición del crecimiento utilizando distintos tratamientos: las cuatro fracciones; F1(amarillo), F2(marrón), F3(Azul oscuro), F4(verde). Veneno (gris), Kanamicina (Gris claro), Albumina sérica bovina (azul claro), Control no inoculado (CNI)/(naranja). A las mismas concentraciones 1.25, 2.5, 5, 10 y 20 μg con el microorganismo *S. saprophyticus* (ATCC baa-750).

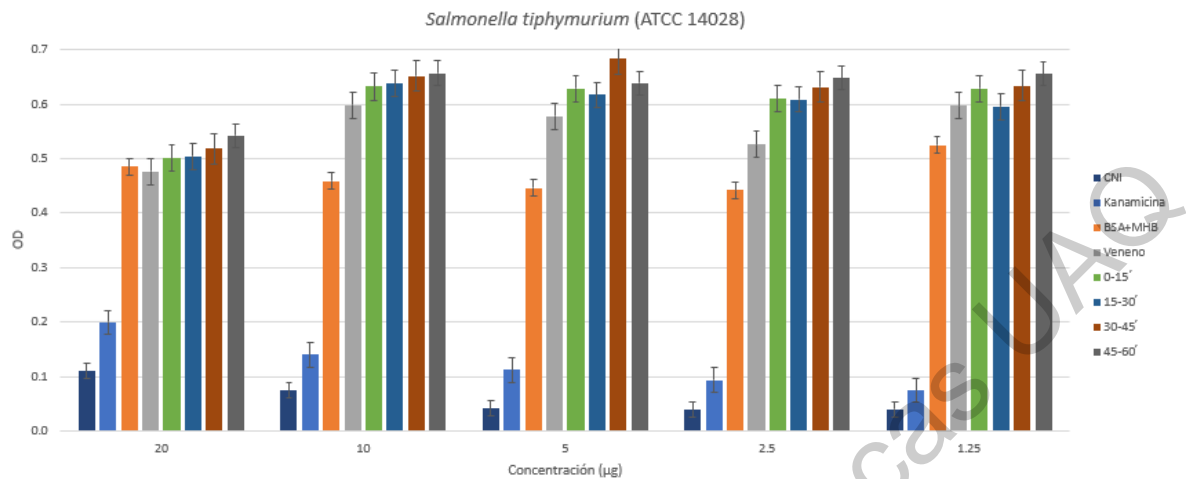


Figura 20. Comparación de la inhibición del crecimiento utilizando distintos tratamientos: las cuatro fracciones; F1(verde), F2(azul oscuro), F3(marrón), F4(gris oscuro). Veneno (gris claro), Kanamicina (azul claro), Albumina sérica bovina (naranja), Control no inoculado (CNI)/ (azul real). A las mismas concentraciones 1.25, 2.5, 5, 10 y 20 µg con el microorganismo *S. tiphymurium* (ATCC 14028).

6.2.2 Actividad antibacteriana del veneno de *Theraphosa stirmi* determinada mediante difusión en disco

La actividad antibacteriana del veneno de *Theraphosa stirmi* se analizó utilizando una especie de bacteria Gram positivo y una especie de bacteria Gram-negativo. Se desafió a las bacterias *Staphylococcus saprophyticus* (ATCC baa-750) y *Salmonella tiphymurium* (ATCC 14028) contra 5, 10 y 20 µg de proteína cuantificada en veneno crudo y un control positivo de 5 µg de kanamicina. Se observó que con estas concentraciones y siguiendo esta metodología no existe un halo de inhibición cuantificable que indique disminución del crecimiento de la bacteria Gram-negativo *Salmonella tiphymurium* (ATCC 14028) y la bacteria Gram-positivo *Staphylococcus saprophyticus* (ATCC baa-750). Las imágenes se capturaron utilizando ChemiDoc MP Imaging System © Bio-Rad (Figura 21 y 22).

6.2.3 Actividad antibacteriana de las fracciones del veneno de *Theraphosa stirmi* determinada mediante difusión en disco

La actividad antibacteriana de cuatro fracciones obtenidas por la separación del veneno de *Theraphosa stirmi* mediante RHPLC, se analizó utilizando una especie de bacteria Gram positivo y una especie de bacteria Gram-negativo. Se desafió a las bacterias *Staphylococcus saprophyticus* (ATCC baa-750) y *Salmonella tiphymurium* (ATCC 14028) contra 5, 10 y 20 µg de proteína cuantificada en cada una de las fracciones y un control positivo de 5 µg de kanamicina. Se observó que con estas concentraciones y siguiendo esta metodología no existe un halo de inhibición cuantificable que indique disminución del crecimiento de la bacteria Gram-negativo *Salmonella tiphymurium* (ATCC 14028) y la bacteria Gram-positivo *Staphylococcus saprophyticus* (ATCC baa-750). Las imágenes se capturaron utilizando ChemiDoc MP Imaging System © Bio-Rad (Figuras 21 y 22).

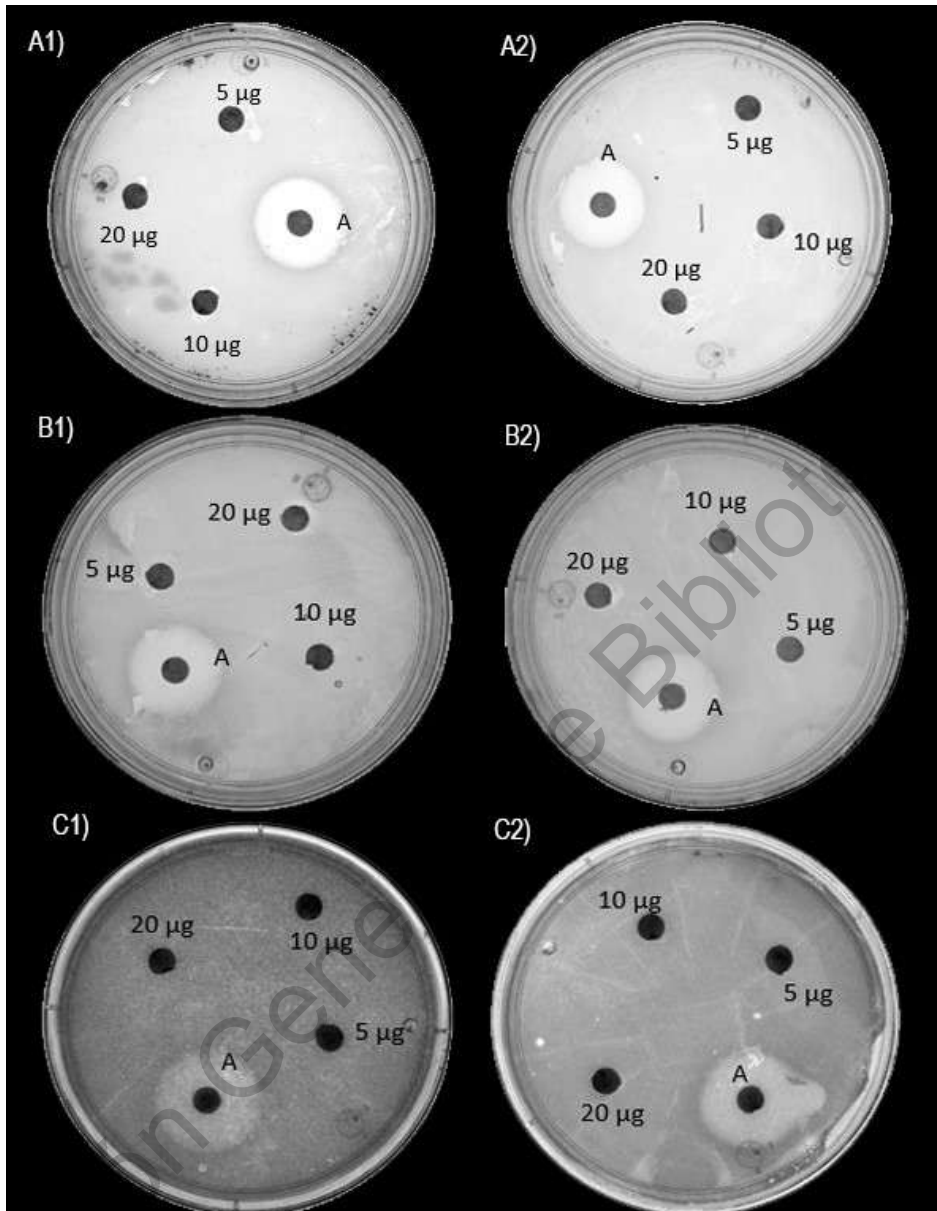


Figura 21. Medio agar Luria-Bertani, Bacterias 0.5 McFarland. A1: Fracción 0-15 min vs *Staphylococcus saprophyticus* (ATCC baa-750); A2: Fracción 0-15 min vs *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028); B1: Fracción 15-30 min vs *Staphylococcus saprophyticus* (ATCC baa-750); B2: Fracción 15-30 min vs *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028); C1: Fracción 30-45 min vs *Staphylococcus saprophyticus* (ATCC baa-750); C2: Fracción 30-45 min vs *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028).

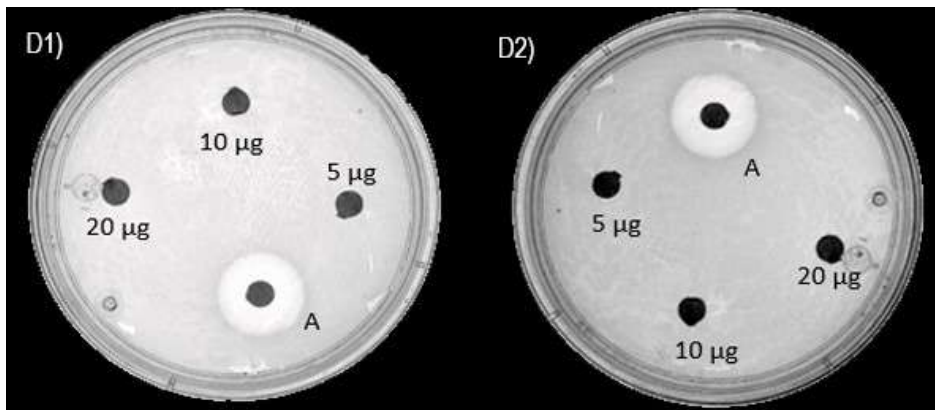


Figura 22. Medio agar Luria-Bertani, Bacterias 0.5 McFarland. D1: Fracción 30-45 min vs *Staphylococcus saprophyticus* (ATCC baa-750); D2: Fracción 30-45 min vs *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028).

6.2.4 Actividad antibacteriana del veneno de *Theraphosa stirmi* determinada mediante extensión en placa

La actividad antibacteriana con el método de extensión en placa, se realizó utilizando dos bacterias Gram positivos y dos bacterias Gram negativos: *Staphylococcus saprophyticus* (ATCC baa-750), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), *Escherichia coli* (ATCC 25922). Se desafió a las cuatro especies de bacterias a 800 µg de proteína de veneno puro. El resultado del ensayo demostró que a esta concentración de proteína y siguiendo esta metodología, no existe una reducción significativa en el conteo de colonias del tratamiento comparado con el grupo control (Figura 23).

6.1.5 Actividad antimicótica del veneno de *Theraphosa stirmi* determinada mediante extensión en placa

La actividad antimicótica se evaluó utilizando el método de extensión en placa y las levaduras *Candida albicans* (ATCC 276) y *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC MYA-198). Se desafiaron contra 800 µg de proteína de veneno puro. Se observó que no existe diferencia significativa entre el número de colonias desarrolladas en el grupo control y en el grupo de tratamiento, se demostró que con esta concentración de proteína de veneno y bajo esta metodología, no existe actividad antimicótica significativa (Figura 23).

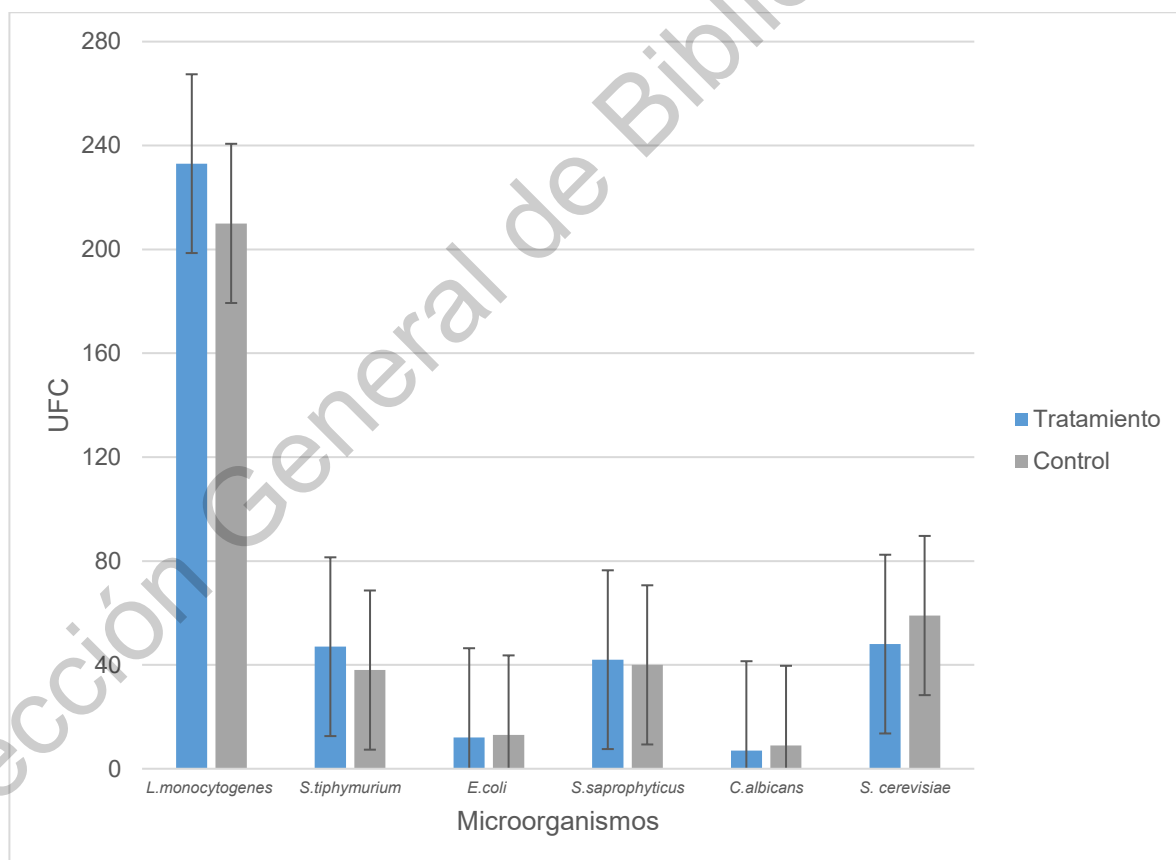


Figura 23. Resultado del conteo de UFC promedio de los ensayos realizados con una concentración de 800 µg/ml de veneno crudo de *Theraphosa stirmi* para la prueba de extensión en placa.

6.3 Árbol filogenético

Del análisis filogenético realizado con los diferentes softwares, se encontró una marcada división entre los subórdenes de araneomorfos (Araneomorphae) y los migalomorfos (Mygalomorphae) de subfamilias distintas a las tarántulas (Theraphosidae), así como también de los migalomorfos de la subfamilia Theraphosidae. Se encontró una agrupación de las especies pertenecientes al mismo género y a géneros sinónimo como *Haplopelma* y *Ornithoctonus* (World Spider Catalog, 2019) o recientemente separados como es el caso del género *Tliltocatl* y *Brachypelma* (Mendoza & Francke, 2020) (Figura 24).

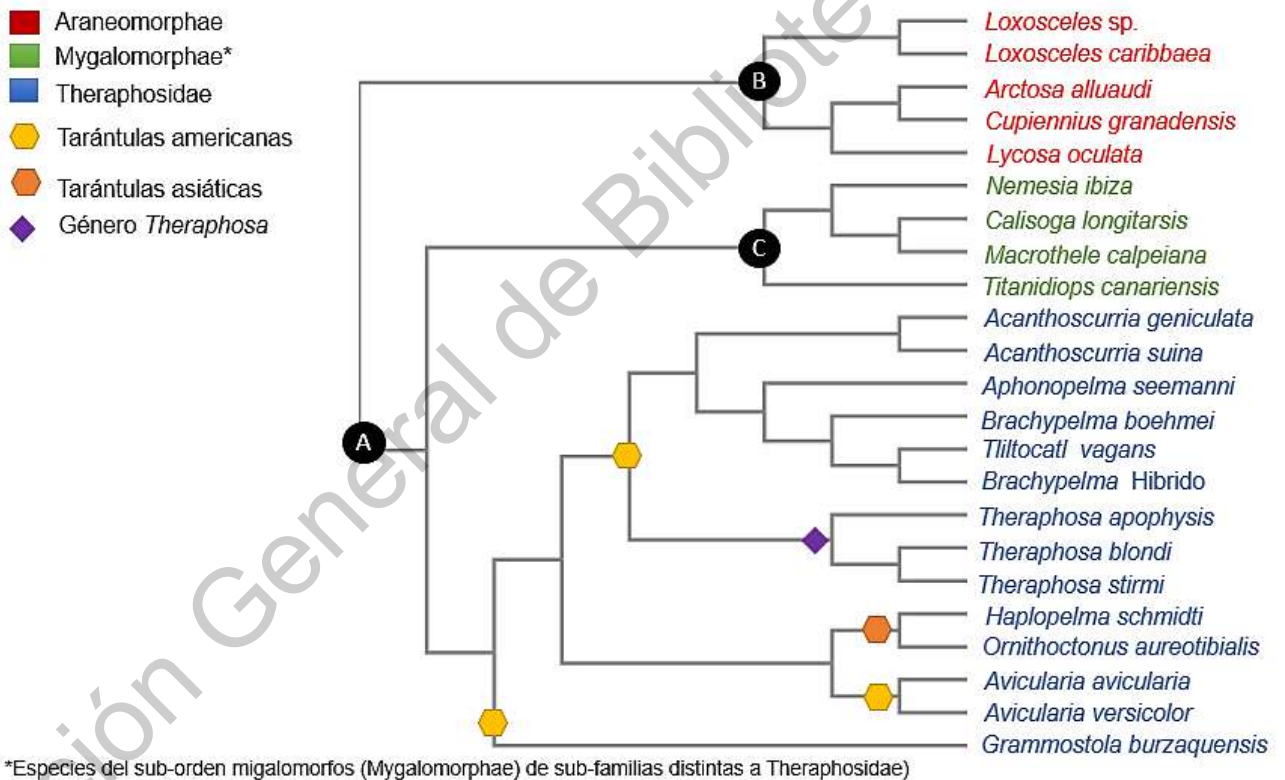


Figura 24. Árbol filogenético de distintas especies del orden Araneae (A), suborden Araneomorphae (B), Sub-orden Mygalomorphae (C). Especies araneomorfas (Rojo); Especies migalomorfos de subfamilias distintas a las tarántulas (Theraphosidae) (Verde); Migalomorfos pertenecientes a la subfamilia Theraphosidae (Azul).

Discusión

En el presente trabajo se evaluaron cuatro fracciones del veneno de *Theraphosa stirmi* separadas por cromatografía líquida de alta resolución fase reversa y el veneno crudo. Se evaluaron utilizando tres metodologías distintas contra cepas tipificadas y los ensayos por triplicado. A partir de los hallazgos encontrados, se rechaza la hipótesis que establece que en el veneno de *Theraphosa stirmi* existen péptidos antimicrobianos con actividad inhibitorias en bacterias y levaduras, debido a que no se encontró diferencia significativa en el uso de las fracciones o el veneno completo comparado con el grupo control.

Estos resultados se relacionan con lo que sostienen (Saez *et al.*, 2010) grupo que hasta el año 2010 mencionaban que no existían reportes de péptidos antimicrobianos de acción a membrana (MAMPs). Por otra parte, se han reportado más de 40 AMPs del suborden de los araneomorfos (Araneomorphae). Los primeros reportes de AMPs en araneomorfos fueron realizados por Yan y Adams en 1998, quienes identificaron péptido-toxinas con potencial antimicrobiano y antifúngico en el veneno la araña lobo (*Lycosa carolinensis*) las cuales fueron clasificadas como lycotoxinas. En posteriores años Tan *et al.*, 2013 identificaron otro péptido en otro araneomorfo del género *Lycosa*, lo bautizaron como “lycosina-I” una péptido-toxina que presenta actividad antibacterial y antifúngica. Estos araneomorfos se encuentran dentro del orden Araneae que es lo que actualmente conocemos como arañas, en el cual se engloban también los migalomorfos (Mygalomorphae) suborden que incluye a la familia de los terafósidos (Theraphosidae) animales que en la actualidad llamamos coloquialmente como “tarántulas”, la media determinada de la fecha propuesta por los siguientes autores (Ballweber *et al.*, 2002; Averdam *et al.*, 2003; Ayoub *et al.*, 2007; Hedges & Kumar, 2009; Rix & Harvey, 2012; Dimitrov *et al.*, 2013; Sharma & Wheeler, 2014; Bond *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2015; Fernandez *et al.*, 2018) indica que los araneomorfos y los migalomorfos presentan una divergencia de aproximadamente 318 millones de años (MYA) (Figura 25).

Lo que puede explicar por qué existe una diferencia en la composición del veneno de los araneomorfos y los migalomorfos. Sin embargo, Jung y sus colaboradores en el año 2006 comprobaron que una toxina que este mismo grupo había caracterizado y bautizado como “GsMTx-4” la cual fue aislada del veneno de la tarántula chilena (*Grammostola rosea*) un migalomorfo de la familia de las tarántulas (Theraphosidae), posee actividad antimicrobiana además de actividad inhibitoria de canales de potasio. En años más recientes el grupo de Zhao y colaboradores identificaron otro péptido con potencial antimicrobiano proveniente del veneno de otro migalomorfo también englobado en la familia Theraphosidae, *Ornithoctonus hainana* (Ornithoctoninae).

Realizando un análisis sobre estudios filogenéticos recientes de la familia Theraphosidae por los autores como Lüddecke *et al.*, 2018 y Foley *et al.*, 2019. Se encontró una marcada divergencia entre la subfamilia Ornithoctoninae (También conocidas como las tarántulas de Asia) (Figura 24), subfamilia a la cual pertenece la *Ornithoctonus hainana* (La tarántula estudiada por Zhao y colaboradores en 2011) y la subfamilia Theraphosinae a la cual pertenecen las especies del género *Theraphosa* con la que trabajamos en el presente estudio. Esto concuerda con el árbol desarrollado en el presente trabajo, donde además se incluyó una especie del género *Grammostola* la cual según el alineamiento se muestra en un clado con una cercanía mayor con tarántulas asiáticas (subfamilia Ornithoctoninae) en contraste con las tarántulas americanas (subfamilia Theraphosinae), además de una lejanía evolutiva mayor, estando mayoritariamente emparentada un ancestro común de

Theraphosidae (Figura 24).

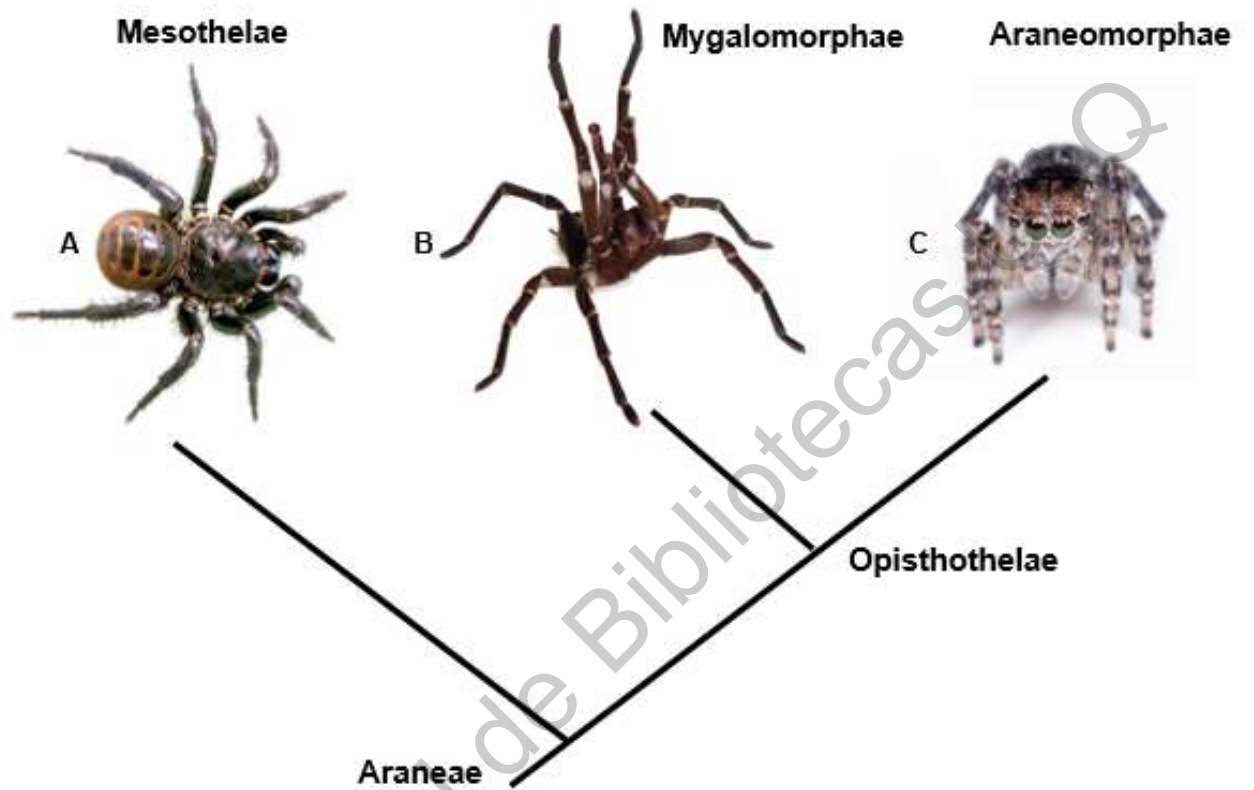


Figura 25. Relación filogenética de los subórdenes Mesothelae, Mygalomorphae, Araneomorphae (Modificado de Coddington, 1991; Fuentes de imagen; A: Schwendinger, 2017, B: Underground Reptiles, 2020, C: Schubert, 2019).

Por otro lado, la mayoría de los péptidos provenientes del veneno en tarántulas (Theraphosidae) que han sido caracterizados a la fecha, son denominados como “neurotóxicas”. Pero también se han caracterizaron péptidos provenientes del veneno tarántulas, en este caso de *Psalmopoeus cambridgei* (Theraphosidae) la cual demostró no poseer actividad inhibitoria con bacterias Gram negativo o Gram positivo, aunque si un notable efecto en la fase intraeritrocitaria de *Plasmodium falciparum* (Choi *et al.*, 2004). Otro péptido proveniente del veneno de una tarántula sudamericana (*Avicularia juruensis*) demostró no tener actividad contra bacterias Gram positivos ni Gram negativos, pero si demostró tener actividad antifúngica contra varias especies del género *Candida* (Ayroza *et al.*, 2012). Este fue bautizado como “Juruina”.

En un análisis BLASTp (Altschul *et al.*, 1997) de las secuencias de aminoácidos de los péptidos antimicrobianos reportados provenientes de terafósidos (Theraphosidae) en un rango de porcentaje de identidad de 50-100, con el péptido proveniente de la tarántula *Grammostola*, nombrado: GsMTx-4 (MKTSVVFVIAGLALLSVVCYASELKEQSSVNEVLSTIFHFQPEERGCLEFWWKC NPNDKCCRPKLKCSKLFKLCNFSFGK) se encontró identidad con proteínas denominadas como “*Toxin-like*” o las “tipo toxinas” si lo traducimos al español. Con el mismo organismo de origen de GsMTx-4 y *Phrixotrichus scrofa* otra especie de tarántula que comparte área de distribución con *Grammostola* (Sherwood *et al.*, 2019), *Chilobrachys guangxiensis* una tarántula asiática que pertenece a la subfamilia Ornithoctoninae que abarca al género *Haplopelma* (Figura 28), género al que pertenece el otro organismo terafósido en el que se ha caracterizado un péptido antimicrobiano

(MLCKLSMFGAVLGVPAIDCLPMGKTGGSCGGVCGCRKLTFKILWDKKFG) caracterizado a partir del veneno de estas, en dicho análisis se encontró identidad solamente con péptidos denominados “*Defensin-like*” o “como defensinas” en español, de organismos del suborden Apocrita que engloba especies de abejas, hormigas y avispa, el cual no guarda identidad con ninguna “péptido-toxina”

reportada en terafósidos (Figura 27). Además, en un análisis de dominio de GsMTx-4 se encontró un dominio conservado con la súper familia de “toxinas-12” (Figura 26), la cual está constituida por péptidos inhibidores de canales iónicos (Liu *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2020).

Reports			
Lineage	Organism	Taxonomy	
17 sequences selected ?			
Taxonomy	Number of hits	Number of Organisms	
<input type="checkbox"/> Theraphosidae	27	5	
<input type="checkbox"/> Grammostola	15	2	
<input type="checkbox"/> Grammostola rosea	14	1	Grammostola rosea hits
<input type="checkbox"/> Grammostola porteri	1	1	Grammostola porteri hits
<input type="checkbox"/> Selenotypus plumipes	1	1	Selenotypus plumipes hits
<input type="checkbox"/> Chilobrachys guangxiensis	8	1	Chilobrachys guangxiensis hits
<input type="checkbox"/> Paraphysa scrofa	3	1	Paraphysa scrofa hits

Figura 26. Análisis BLAST del péptido GsMTx-4.

Reports			
Lineage	Organism	Taxonomy	
9 sequences selected ?			
Taxonomy	Number of hits	Number of Organisms	
<input type="checkbox"/> Holometabola	12	7	
<input type="checkbox"/> Apocrita	10	6	
<input type="checkbox"/> Apoidea	6	5	
<input type="checkbox"/> Megachile rotundata	1	1	Megachile rotundata hits
<input type="checkbox"/> Apinae	4	3	
<input type="checkbox"/> Melipona quadrifasciata	1	1	Melipona quadrifasciata hits
<input type="checkbox"/> Bombus terrestris	1	1	Bombus terrestris hits
<input type="checkbox"/> Eufriesea mexicana	2	1	Eufriesea mexicana hits
<input type="checkbox"/> Dufourea novaeangliae	1	1	Dufourea novaeangliae hits
<input type="checkbox"/> Nasonia vitripennis	4	1	Nasonia vitripennis hits
<input type="checkbox"/> Trypoxylus dichotomus	2	1	Trypoxylus dichotomus hits

Figura 27. Análisis BLAST del péptido OH-Defensina.



Figura 28. Clasificación de dominio de GsMTx-4; Super familia “Toxin-12”.

Los resultados obtenidos de los ensayos antibacterianos y antifúngicos con el veneno crudo y el veneno separado por cromatografía de fase reversa de la tarántula Goliat (*Theraphosa stirmi*), demostraron que a pesar de que existen distintos organismos que poseen péptidos antimicrobianos en su veneno, ya sea por una acción secundaria o por la citotoxicidad de las enzimas en su veneno, no es una regla aplicable a todos los organismos denominados como venenosos, pues no podemos clasificarlos como si tuvieran un origen cercano en común (ejemplo: Entre el género *Theraphosa* y el género *Crotalus* existe un estimado de 736 MYA de divergencia (Kumar *et al.*, 2017)).

Aun teniendo una anatomía y morfología similar, como es el caso de arañas (Araneomorphae) y tarántulas (Mygalomorphae) y yendo más allá comparando incluso especies del mismo género (ejemplo: Entre *Aphonopelma reversum* y *Aphonopelma californicum* existe una divergencia estimada de 6.4 MYA (Starrett *et al.*, 2013)). Es necesario y prudente realizar más estudios sobre el sistema inmunitario en organismos invertebrados venenosos, con el fin de elucidar realmente la robustez de su sistema inmunitario innato, así como también realizar estudios más robustos sobre la composición del veneno de estos y sus mecanismos de acción en presas y microorganismos de la misma.

VII. CONCLUSIONES

- Se determinó que con los análisis antibacterianos con el veneno completo y el veneno fraccionado con la tecnología de cromatografía de fase reversa y con las cepas utilizadas, el veneno de *Theraphosa stirmi* no posee péptidos con actividad antibacteriana.
- Se determinó que con los análisis antifúngicos con el veneno completo y el veneno fraccionado con la tecnología de cromatografía de fase reversa y con las cepas utilizadas, el veneno de *Theraphosa stirmi* no posee péptidos antifúngicos.
- Los péptidos antimicrobianos reportados, obtenidos desde el veneno de terafósidos, presentan una divergencia mayor comparada con el género *Theraphosa* que comparado entre los dos géneros de terafósidos con péptidos antimicrobianos obtenidos del veneno hasta el día de hoy (*Haplopelma* y *Grammostola*)

VIII. REFERENCIAS

- Almeida, M. Q., Salvatierra, L., & Morais, J. W. (2018). First record of Theraphosa apophysis (Tinter, 1991)(Araneae, Mygalomorphae, Theraphosidae) in Brazil. *Check List*, 14, 647.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. . *Nucleic acids research*, 25(17), 3389-3402.
- Averdam, A., Markl, J., & Burmester, T. (2003). Subunit sequences of the 4 x 6-mer hemocyanin from the golden orb-web spider, Nephila inaurata. *Eur J Biochem*, 270(16), 3432-3439.
- Ayoub, N. A., Garb, J. E., Hedin, M., & Hayashi, C. Y. (2007). Utility of the nuclear protein-coding gene, elongation factor-1 gamma (EF-1 γ), for spider systematics, emphasizing family level relationships of tarantulas and their kin (Araneae: Mygalomorphae). *MOL PHYLOGENET EVOL*, 394-409.
- Ayroza, G., Candido Ferreira, I. L., Sayegh, R. S., Tashima, A. K., & Da Silva Junior, P. I. (2012). Juruin: an antifungal peptide from the venom of the Amazonian Pink Toe spider, Avicularia juruensis, which contains the inhibitory cystine knot motif. . *Front Microbiol*, 324.
- Bagaturov, M. F. (2014). <http://tarantulas.su/>. Obtenido de <http://tarantulas.su/en/internal>
- Ballweber, P., Markl, J., & Burmester, T. (2002). Complete Hemocyanin Subunit Sequences of the Hunting Spider Cupiennius salei. *JOC*, 14451–14457.
- Baumann, T., Kämpfer, U., Schürch, S., Schaller, J., Largiader, C., Nentwig, W., & Kuhn-Nentwig, L. (2010). Ctenidins: antimicrobial glycine-rich peptides from the hemocytes of the spider Cupiennius salei. *Cell. Mol. Life Sci.* 67(16), 2787-2798.
- Bertani, R. (2001). Revision, cladistic analysis, and zoogeography of Vitalius, Nhandu, and Proshapalopus; with notes on other theraphosine genera

- (Araneae, Theraphosidae). *Arquivos de Zoologia* 36, 265-356.
- Bettini, S. (2013). *Arthropod venoms (Vol. 48)*. New York: Springer Science & Business Media.
- Bond, J. E., Garrison, N. L., Hamilton, C. A., Godwin, R. L., Hedin, M., & Agnarsson, I. (2014). Phylogenomics resolves a spider backbone phylogeny and rejects a prevailing paradigm for orb web evolution. *Curr Biol*, 1765-1771.
- Bulet, P., Hetru, C., Dimarcq, J. L., & Hoffmann, D. (1999). Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Dev. Comp. Immunol*, 23(4-5), 329-344.
- Burmester, T. (2012). Evolution and Adaptation of Hemocyanin Within Spiders. En I. N. Ecophysiology.. Berlin, Heidelberg: Springer.
- Cannon, B. (2014). Resistance fighters. *Nature*, 509(7498), S6.
- Carvalho, L., Martins, P., Schneider, M., & Cabra-García, J. (2017). New records of spiders (Arachnida, Araneae) from the state of Roraima, northern Brazil. . *Check List* 13(1, 2040), 1-23.
- Carwardine, M. (2008). *Animal Records*. Nueva York, EE. UU: Sterling Publishing Company.
- Chaparro, E., & Da Silva Jr, P. I. (2016). Lacrain: the first antimicrobial peptide from the body extract of the Brazilian centipede *Scolopendra viridicornis*. *Int J Antimicrob Agents*, 277-285.
- Choi, S. J., Parent, R., Guillaume, C., Deregnaucourt, C., Delarbre, C., Ojcius, D. M., & Molgo, J. (2004). Isolation and characterization of Psalmopeotoxin I and II: two novel antimalarial peptides from the venom of the tarantula *Psalmopoeus cambridgei*. . *FEBS letters*, 572(1-3), 109-117.
- CLSI. (2016). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 26th Ed.* 26. Pennsylvania, EE.UU: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Coddington, J. A. (1991). Systematics and evolution of spiders (Araneae). *Annu Rev Ecol Syst*, 22(1), 565-592.
- Cohen, A. C. (1998). Solid-to-liquid feeding: the inside (s) story of extra-oral digestion in predaceous Arthropoda. . *Am. Entomol.*, 44(2), 103-117.
- Comstock, J. H. (1912). *The spider book: A manual for the study of the spiders and*

their near relatives, the scorpions, pseudoscorpions, whip-scorpions, harvestmen, and other members of the class arachnida, found in America North of Mexico. Doubleday.

- Corzo, G., Escoubas, P., Villegas, E., Barnham, K. J., He, W., Norton, R. S., & Nakajima, T. (2001). Characterization of unique amphipathic antimicrobial peptides from venom of the scorpion *Pandinus imperator*. *Biochem J* 359(1), 35-45.
- De Kraker, M. E., Stewardson, A. J., & Harbarth, S. (2016). Will 10 million people die a year due to antimicrobial resistance by 2050?. *PLoS medicine*, 13(11), e1002184.
- Dimitrov, D., Astrin, J. J., & Huber, B. A. (2013). Pholcid spider molecular systematics revisited, with new insights into the biogeography and the evolution of the group. *Cladistics* 29(2), 132-146.
- Ehret-Sabatier, L., Loew, D., Goyffon, M., Fehlbau, P., Hoffmann, J. A., Van Dorssealer, A., & Bulet, P. (1996). Characterization of novel cysteine-rich antimicrobial peptides from scorpion blood. *J. Biol. Chem.* 271(47), 29537-29544.
- Escoubas, P., & Rash, L. (2004). Tarantulas: eight-legged pharmacists and combinatorial chemists. *Toxicon*, 43(5), 555-574.
- Fernandez, R., Kallal, R. J., Dimitrov, D., Ballesteros, J. A., Arnedo, M. A., & Hormiga, G. (2018). Phylogenomics, Diversification Dynamics, and Comparative Transcriptomics across the Spider Tree of Life. *Curr Biol* (28), 1489-1497.
- Figueroa, D., Sabat, P., Torres-Contreras, H., Veloso, C., & Canals, M. (2010). Participation of book lungs in evaporative water loss in *Paraphysa parvula*, a migalomorph spider from Chilean Andes. *J. Insect Physiol* 56, 731–735.
- Foelix, R. (2011). *Biology of spiders*. USA: Oxford University Press.
- Fogaça, A. C., Da Silva, P. L., Miranda, M. T., Bianchi, A. G., Miranda, A., Ribolla, P. E., & Daffre, S. (1999). Antimicrobial activity of a bovine hemoglobin fragment in the tick *Boophilus microplus*. *J. Biol. Chem.* 274(36), 25330-

25334.

- Foley, S., Lüddecke, T., Cheng, D., Krehenwinkel, H., Künzel, S., Longhorn, S. J., & Piel, W. (2019). Tarantula phylogenomics: A robust phylogeny of deep theraphosid clades inferred from transcriptome data sheds light on the prickly issue of urticating setae evolution. *Mol. Phylogenet. Evol*, 140, 106573.
- Froy, O., & Gurewitz, M. (2003). Arthropod and mollusk defensins-evolution by exon-shuffling. *Trends Genet*, 684–687.
- Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B., & Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150, 76-85.
- Fukuzawa, A. H., Vellutini, B. C., Lorenzini, D. M., Silva, P. I., Mortara, R. A., Da Silva, J. M., & Daffre, S. (2008). The role of hemocytes in the immunity of the spider *Acanthoscurria gomesiana*. *Dev Comp Immunol* (32), 716–725.
- Gadde, U., Kim, W. H., Oh, S. T., & Lillehoj, H. S. (2017). Alternatives to antibiotics for maximizing growth performance and feed efficiency in poultry: a review. . *Animal Health Research Reviews* 18(01), 26–45. .
- Garcia, F., Villegas, E., Espino-Solis, G. P., Rodriguez, A., Paniagua-Solis, J. F., Sandoval-Lopez, G., & Corzo, G. (2013). Antimicrobial peptides from arachnid venoms and their microbicidal activity in the presence of commercial antibiotics. *J. Antibiot.* 66(1), 3.
- Garrison, N. L., Rodriguez, J., Agnarsson, I., Coddington, J. A., Griswold, C. E., Hamilton, C. A., & Bond, J. E. (2016). Spider phylogenomics: untangling the Spider Tree of Life. *PeerJ*, 4, e1719.
- Gershenz, S. (1996). Laboratory culture techniques for the Goliath tarantula *Theraphosa blondi* and the Mexican red knee tarantula, *Brachypelma smithi* (Araneae: Theraphosidae). *American Association of Zoological Parks and Aquariums (AAZPA), Regional Conference Proceedings, 1996, 773-777.*
- Girish, K. S., & Kemparaju, K. (2007). The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: A biological overview. *Life Sci*, 80(21):1921–1943.
- Gordh, G., & Headrick, D. (2001). *A dictionary of entomology*. Cabi.
- Gupta, A. P. (2019). *Immunology of insects and other arthropods*. CRC Press.

- Gutsmann, T. (2016). Interaction between antimicrobial peptides and mycobacteria. *Biochim. Biophys. Acta.* 1858(5), 1034-1043.
- Halos, L., Jamal, T., Vial, L., Maillard, R., Suau, A., Le Menach, A., & Vayssier-Taussat, M. (2004). Determination of an efficient and reliable method for DNA extraction from ticks. *Vet. Res.* 35, 709–713.
- Harris, F., Dennison, S. R., & Phoenix, D. A. (2009). Anionic antimicrobial peptides from eukaryotic organisms. *Curr. Protein Pept. Sci.* 10(6), 585-606.
- Hasegawa, M., & Kishino, H. Y. (1985). Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J Mol Evol*, 22(2):160-74. .
- Hedges, S., & Kumar, S. (Edits.). (2009). *The timetree of life*. OUP Oxford.
- Herzig, V., & King, G. (2013). The neurotoxic mode of action of venoms from the spider family Theraphosidae. *Spider Ecophysiol.*
- Huckstorf, K., Kosok, G., Seyfarth, E. A., & Wirkner, C. S. (2013). The hemolymph vascular system in *Cupiennius salei* (Araneae: Ctenidae). *Zool Anz* .
- IBM. (2015). IBM SPSS Statistics for Windows. *IBM Corp. Released 2015*.(23). Armonk, NY, USA.
- Imler, J. L., & Bulet, P. (2005). Antimicrobial peptides in *Drosophila*: structures, activities and gene regulation. In *Mechanisms of epithelial defense*. *Karger Publishers.*, 1-21.
- Iwanaga, S. (2002). The molecular basis of innate immunity in the horseshoe crab. *Curr.Opin.Immunol.* (14), 87–95.
- Jeyaprakash, A., & Hoy, M. A. (2009). First divergence time estimate of spiders, scorpions, mites and ticks (subphylum: Chelicerata) inferred from mitochondrial phylogeny. *EXP APPL ACAROL* 47 (1), 1-18.
- Jung, H. J., Kim, P., Lee, S. K., Lee, C. W., Eu, Y. J., Lee, D. G., & Kim, J. I. (2006). Lipid membrane interaction and antimicrobial activity of GsMTx-4, an inhibitor of mechanosensitive channel. *Biochem Bioph Res Co*, 633-638.
- Kavanagh, K., & Reeves, E. P. (2004). Exploiting the potential of insects for in vivo pathogenicity testing of microbial pathogens. *FEMS Microbiol. Rev.*(28), 101-112.

- Kemper, B. (1983). Site of hemocyanin biosynthesis in the tarantula *Euryplema californicum*. *Naturwissenschaften* 70, 255–256.
- Klint, J. K., Senff, S., Rupasinghe, D. B., Er, S. Y., Herzig, V., Nicholson, G. M., & King, G. F. (2012). Spider-venom peptides that target voltage-gated sodium channels: Pharmacological tools and potential therapeutic leads. *Toxicon*(60), 478–491.
- Kuhn-Nentwig, L., & Nentwig, W. (2013). The Immune System of Spiders. En W. Nentwig (Ed.), *Spider Ecophysiology* (págs. 81-85). Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- Kumar, G., Stecher, M., Suleski, & Hedges, S. (2017). TimeTree: a resource for timelines, timetrees, and divergence times. *Molecular Biology and Evolution* 34, 1812-1819,. Obtenido de <http://www.timetree.org/>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol bio and evol*, 1547-1549.
- Latreille, P. A. (1804). *Histoire naturelle générale et particulière des Crustacés et des Insectes*. . Paris 7: 144-305.
- Liu, Z., Dai, J., Chen, Z., Hu, W., Xiao, Y., & Liang, S. (2003). Isolation and characterization of hainantoxin-IV, a novel antagonist of tetrodotoxin-sensitive sodium channels from the Chinese bird spider *Selenocosmia hainana*. *Cell Mol Life Sci*, 972-978.
- Lorenzini, D. M., Da Silva Jr, P. L., Fogaça, A. C., Bulet, P., & Daffre, S. (2003). Acanthoscurrin: a novel glycine-rich antimicrobial peptide constitutively expressed in the hemocytes of the spider *Acanthoscurria gomesiana*. *Dev. Comp. Immunol.* 27(9), 781-791.
- Lorenzini, D. M., Da Silva, P. J., Soares, M. B., Setubal, J., & Daffre, S. (2006). Discovery of immune-related genes expressed in hemocytes of the tarantula spider *Acanthoscurria gomesiana*. . *Dev Comp Immunol* , 545–556.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. H., Farr, A. I., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with fohn phenol reagent. *Biol. Chem* 193, 265-275.

- Lu, S., Wang, J., Chitsaz, F., Derbyshire, M. K., Geer, R. C., Gonzales, N. R., & Thanki, N. (2020). CDD/SPARCLE: the conserved domain database in 2020. *Nucleic Acids Res.* 48(D1), D265-D268.
- Lüddecke, T., Krehenwinkel, H., Canning, G., Glaw, F., Longhorn, S., Tänzler, R., & Vences, M. (2018). Discovering the silk road: Nuclear and mitochondrial sequence data resolve the phylogenetic relationships among theraphosid spider subfamilies. *Mol. Phylogenet. Evol.*, Molecular phylogenetics and evolution, 119, 63-70.
- Madeira, F., Park, Y. M., Lee, J., Buso, N., Gur, T., Madhusoodanan, N., & Lopez, R. (2019). The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic acids research*, 47(W1), W636-W641.
- Mahasneh, A. M., & El-Oqlah, A. (1999). Antimicrobial activity of extracts of herbal plants used in the traditional medicine of Jordan. *J. Ethnopharm.* 64(3), 271-276.
- Mebs, D. (2002). *Venomous and Poisonous Animals: A Handbook for Biologists, Toxicologists and Toxinologists, Physicians and Pharmacists*. Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Mendoza, J., & Francke, O. (2020). Systematic revision of Mexican threatened tarantulas *Brachypelma* (Araneae: Theraphosidae: Theraphosinae), with a description of a new genus, and implications on the conservation. *Zool J Linnean Soc*, 188(1), 82-147.
- Mirghani, M., Kabbashi, N. A., Elfaki, F. A., & Zu. (2012). Investigation of the spider web for antibacterial activity. *In Malaysian International Conference on Trends in Bioprocess Engineering (MICOTriBE)*, (págs. (Vol. 201, pp. 1-5).).
- NCBI. (1988). *National Center for Biotechnology Information (NCBI)*. (U. N. Medicine, Productor) Recuperado el 10 de 07 de 2020, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Orozco, R. (14 de 05 de 2020). *Tarantulas México*. Obtenido de <http://tarantulasdemexico.com/anatomia.htm#ANATOMIA>.
- Paul, R. (1992). Gas exchange, circulation, and energy metabolism in arachnids. En

Physiological adaptations in vertebrates: Respiration, Circulation and Metabolism (págs. 169–197). New York.

- Pérez-Miles, F., Lucas, S., & Silva Jr, P. (1996). Systematic revision and cladistic analysis of Theraphosinae (Araneae: Theraphosidae). *Mygalomorph* (1), 33-68.
- Ramírez-Carreto, S., Jiménez-Vargas, J. M., Rivas-Santiago, B., Corzo, G., Possani, L. D., Becerril, B., & Ortiz, E. (2015). Peptides from the scorpion *Vaejovis punctatus* with broadantimicrobial activity. *Peptides* (73), 51-59.
- Reddy, K. V., Yedery, R. D., & Aranha, C. (2004). Reddy, K. V. R., Yedery, R. D., & Aranha, C. (2004). Antimicrobial peptides: premises and promises. *Int J Antimicrob Agents* 24(6), 536–547. doi:doi:10.1016/j.ijantimicag.2004.09.005
- Redwizard000. (2013). Male *T. Stirmi*. *Male T. Stirmi, taken very shortly after his ultimate molt, showing off the tips of his pedipalps*. Arachnoboards, La Vegas, Nevada, USA. Recuperado el 15 de 07 de 2020, de <https://arachnoboards.com/gallery/theraphosa-stirmi-male.25074/>
- Ren, L. A., Lomas, L. O., Jonczyk, J., & Turner, P. C. (2004). Two novel non-cationic defensin-like antimicrobial peptides from haemolymph of the female tick, *Amblyomma hebraeum*. *Biochemi J.* 379(3), 681-685.
- Riciluca, K. C., Sayegh, R. S., Melo, R. L., & Silva Jr, P. I. (2012). Rondonin anantifungal peptide from spider (Acanthoscurriarondoniae) haemolymph. *Results Immunol*, 66-71.
- Rix, M. G., & Harvey, M. S. (2012). Phylogeny and historical biogeography of ancient assassin spiders (Araneae: Archaeidae) in the Australian mesic zone: evidence for Miocene speciation within Tertiary refugia. *MOL PHYLOGENET EVOL* 62(1), 375-396.
- Rocha-e-Silva, T., Hyslop, S., & Sutti, R. (2009). Milking and partial characterization of venom from the Brazilian spider *Vitalius dubius* (Theraphosidae). *Toxicon*, 53(1), 153-161.
- Rodríguez de la Vega, R. C., García, B. I., Ambrosi, C. D., García, E. D., Scaloni, A., & Possani, L. D. (2004). Antimicrobial peptide induction in the

- haemolymph of the Mexican scorpion *Centruroides limpidus limpidus* in response to septic injury. *Cell. Mol. Life Sci.* (61), 1507–1519.
- Rodríguez, L., Díaz, L., Lazcano, F., Arreguín, R., & Rojas, A. (2017). Hyaluronidase-like enzymes are a frequent component of venoms from theraphosid spiders. . *Toxicon*, 136, 34-43.
- Rossi, C., Arias, G., & Lozano, N. (2002). Evaluación antimicrobiana y fitoquímica de *Lepechinia meyeri* Walp "Salvia". . *Ciencia e Investigación* 5, 1-6.
- Rudloff, J. P., & Weinmann, D. (2010). A new giant tarantula from Guyana. *Arthropoda Scientia* (1), 21-40.
- Saez, N. J., Senff, S., Jensen, J. E., Er, S. Y., Herzig, V., Rash, L., & King, G. F. (2010). Spider-venom peptides as therapeutics. *Toxins*, 2851-2871.
- Saito, Y., Konnai, S., Yamada, S., Imamura, S., Nishikado, H., Ito, T., . . . Ohashi, K. (2009). Identification and characterization of antimicrobial peptide, defensin, in the taiga tick, *Ixodes persulcatus*. *Insect Mol. Biol.* 18(4), 531–539.
- Sanggaard, K., Bechsgaard, J., Fang, X., Duan, J., Dyrland, T., Gupta, V., . . . Wang, J. (2014). Spider genomes provide insight into composition and evolution of venom and silk. . *Nat Comm*, 5(1), 7-8.
- Santos, D. M., Reis, P. V., & Pimenta, A. M. (2015). Antimicrobial peptides in spider venoms. *Spider Venoms*, 1-15.
- Schmitz, A. (2016). Respiration in spiders (Araneae). 403–415. . *J Comp Physiol B*, 403-415.
- Schubert, J. (2019). FIGURE 6 in Three new peacock spiders from Southwestern Australia (Araneae: Salticidae: Euophryini: Maratus Karsch, 1878). *Zootaxa*, 81-100.
- Schwendinger, P. J. (2017). Fig. 2 in A revision of the trapdoor spider genus *Liphistius* (Mesothelae: Liphistiidae) in peninsular Malaysia; part 1. . *Revue suisse de Zoologie*, 391-445.
- Sharma, P. P., & Wheeler, W. C. (2014). SCross-bracing uncalibrated nodes in molecular dating improves congruence of fossil and molecular age estimates. *Frontiers in Zoology*, 11(1), 57. *Front Zool*, 57.

- Sherman, R. (1981). *Chelicerates: Invertebrate blood cells*. Academic Press.
- Sherman, R. G. (1973). Ultrastructurally different hemocytes in a spider. *Can J Zool* 51, 1155–1159.
- Sherwood, D., Gabriel, R., Longhorn, & SJ. (2019). A new synonymy in the genus *Homoeomma* Ausserer, 1871 (Araneae, Theraphosidae), with comments on potential homonymy. *Bionomina* 15, 69-73.
- Silva Jr, P. L., Daffre, S., & Bulet, P. (2000). Isolation and Characterization of Gomesin, an 18-Residue Cysteine-rich Defense Peptide from the Spider *Acanthoscurria gomesiana* Hemocytes with Sequence Similarities to Horseshoe Crab Antimicrobial Peptides of the Tachyplesin Family. *J. Biol. Chem.* 275, 33464-33470.
- Sirvid, P. J., Moore, N. E., Chambers, G. K., & Prendergast, K. (2013). A preliminary molecular analysis of phylogenetic and biogeographic relationships of New Zealand Thomisidae (Araneae) using a multi-locus approach. *Invertebrate Systematics*, 27(6), 655.
- Smith, P. E., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M., & Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150(1), 76-85.
- Soletti, R., Del Barrio, L., Daffre, S., Miranda, A., Borges, H. L., Moura-Neto, V., . . . Gabilan, N. (2010). Peptide gomesin triggers cell death through L-type channel calcium influx, MAPK/ERK, PKC and PI3K signaling and generation of reactive oxygen species. *Chem Biol Interact*, 135–143.
- Starrett, J., Hedin, M., Ayoub, N., & Hayashi, C. Y. (2013). Hemocyanin gene family evolution in spiders (Araneae), with implications for phylogenetic relationships and divergence times in the infraorder Mygalomorphae. *Gene*, 175-186.
- Suchard, M. A., Lemey, P., Baele, G., Ayres, D. L., Drummond, A. J., & Rambaut, A. (2018). Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10. *Virus Evolution*.
- Tan, H., Ding, X., Meng, S., Liu, C., Wang, H., Xia, L., . . . Liang, S. (2013). Antimicrobial potential of lycosin-I, a cationic and amphiphilic peptide from the

- venom of the spider *Lycosa singorensis*. *Curr. Mol. Med.*, 900-910.
- Tinter, A. (1991). Eine neue Vogelspinne aus Venezuela *Pseudotheraphosa apophysis* n. gen. n. sp. (Araneae: Theraphosidae: Theraphosinae). *Arachnologischer Anzeiger*, 6-10.
- Underground Reptiles, I. (2020). Goliath Birdeater Tarantula. Florida, USA.
- Undheim, E. A., Sunagar, K., Herzig, V., Kely, L., Low, D. H., Jackson, T. N., & Antunes, A. (2013). A proteomics and transcriptomics investigation of the venom from the barychelid spider *Trittame loki* (brush-foot trapdoor). *Toxins*, 5(12), 2488-2503.
- Vassilevski, A., Kozlov, S., & Grishin, E. (2009). Molecular diversity of spider venom. *Biochemistry (Moscow)*, 74(13), 1505-1534.
- Vetvicka, V., & Sima, P. (2012). *Evolutionary mechanisms of defense reactions*. Birkhäuser.
- Vizioli, J., & Salzet, M. (2002). Antimicrobial peptides from animals: focus on invertebrates. *Trends Pharmacol. Sci.*, 23(11), 494–496.
- Vlierberghe, D. (2015). *www.theraphosidae.be*. Recuperado el 31 de 08 de 2018, de www.theraphosidae.be/en/vogelspinnen/anatomy/
- Vlierberghe, D. (15 de 06 de 2020). *Theraphosidae.be*. Obtenido de <http://www.theraphosidae.be/en/vogelspinnen/anatomy/>
- Walter, A. B., Scavenius, C., Dyrland, T., Sanggaard, K., Enghild, J., & Bilde, T. (2017). Characterisation of protein families in spider digestive fluids and their role in extra-oral digestion. *BMC Gen*, 18, 600.
- Wang, X., & Wang, G. (2016). Insights into antimicrobial peptides from spiders and scorpions. *Protein and peptide letters*, 23(8), 707-721.
- Wang, Y., Hong, J., Liu, X., Yang, H., Liu, R., Wu, J., & Lai, R. (2008). Snake cathelicidin from *Bungarus fasciatus* is a potent peptide antibiotics. *Plos One*, 3(9), e3217.
- WHO. (31 de 06 de 2020). *World Health Organization*. Recuperado el 2020 de 08 de 21, de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los->

antibi%C3%B3ticos#:~:text=La%20resistencia%20a%20los%20antibi%C3%B3ticos%20se%20produce%20cuando%20las%20bacterias,vuelven%20resistentes%20a%20los%20antibi%C3%B3ticos.

- Wirkner, C. S., & Huckstorf, K. (2013). The circulatory system of spiders. En W. Nentwig (Ed.), *Spider Ecophysiology* (págs. 15-27). Heidelberg., Berlin: Springer.
- World Spider Catalog. (22 de 03 de 2019). <https://wsc.nmbe.ch/>. (N. H. Bern, Ed.) Recuperado el 04 de 08 de 2020, de Taxon details: <https://wsc.nmbe.ch/species/37469>
- World Spider Catalog. (07 de 04 de 2020). *World Spider Catalog*, Version 21.5. (Natural History Museum Bern, Editor) Recuperado el 08 de 04 de 2020, de <http://wsc.nmbe.ch>.
- Wright, S., & Goodacre, S. L. (2012). Evidence for antimicrobial activity associated with common house spider. *BMC Res Notes*.5(1), 326.
- Wu, J., Gao, B., & Zhu, S. (2014). The fungal defensin family enlarged. *Pharmaceuticals*, 866-880.
- Wyatt, G. R. (1961). The Biochemistry of Insect Hemolymph. *Annu. Rev. Entomol.* 6(1), 75–102.
- Xu, X., Liu, F., Cheng, R. C., Chen, J., Xu, X., Zhang, Z., & Kuntner, M. (2015). Extant primitively segmented spiders have recently diversified from an ancient lineage. . *Proc. R. Soc. B*, 282(1808), 20142486.
- Yan, L., & Adams, M. E. (1998). Lycotoxins, Antimicrobial Peptides from Venom of the Wolf Spider (*Lycosa carolinensis*). *JOC*, 2059–2066.
- Yi, H. Y., Chowdhury, M., Huang, Y. D., & Yu, X. Q. (2014). Insect antimicrobial peptides and their applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98(13), 5807-5822.
- Zaman, S. B., Hussain, M. A., Nye, R., Mehta, V., Mamun, K. T., & Hossain, N. (2017). A review on antibiotic resistance: alarm bells are ringing. *Cureus*, 9(6).
- Zasloff, M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 415(6870), 389–395.

- Zhao, A., Zhao, T., SiMa, Y., Zhang, Y., & Nakagaki, M. (2005). Unique molecular architecture of egg case silk protein in a spider, *Nephila clavata*. *J. Biochem.* 138(5), 593–604.
- Zhao, H., Kong, Y., Wang, H, H., Yan, T., Feng, F., Bian, J., & Yu, H. (2011). A defensin-like antimicrobial peptide from the venoms of spider, *Ornithoctonus hainana*. *J. Pept. Sci.* 17(7), 540-544.
- Zhou, J., Liao, M., Ueda, M., Gong, H., Xuan, X., & Fujisaki, K. (2007). Sequence characterization and expression patterns of two defensin-like antimicrobial peptides from the tick *Haemaphysalis longicornis*. *Peptides*, 28(6), 1304-1310.
- Zubieta O, G. G.-A., Cartagena-Sotres, E. J., Peña-Vilchis, V. I., Garzón-Muvdi, J., & Robledo-Ogazón, F. (2016). Uso de antibióticos preoperatorios y postoperatorios en el departamento de cirugía general de un hospital privado y comparación con las guías actuales de manejo antimicrobiano. *Acta Medica; Grupo Angeles*, 14(1), 12-18.