

EFFECTO COAGULANTE DE TELA DE LA ARAÑA *Scytodes longipes*

APLICADA EN MUESTRAS DE SANGRE HUMANA

Autor: Shamila Angélica del Rosario Pastor Yataco, Cirujano dentista, Docente de Ciencia Ambiente y Salud del CEBA San Pablo shamilapyataco@gmail.com

RESUMEN

Introducción: Tradicionalmente se ha reportado el uso de la telaraña como hemostático. Sin embargo, aún no se reporta un estudio que lo corrobore experimentalmente. Siendo los trastornos hemorrágicos un problema de interés odontológico, el uso de telaraña como apósito tópico sería beneficioso pues no alteraría la medicación que reciben estos pacientes. **Objetivo** fue evaluar el efecto coagulante de la tela de la araña *Scytodes longipes* aplicada en muestra de sangre humana mediante la medición del Tiempo de Coagulación (TC) y el Tiempo de Protrombina (TP). La telaraña fue producida por un grupo de arañas criadas en semicautiverio (1 año). La tela se repartió en los grupos: Peso1 (3-4 mg); Peso2 (5-6 mg) y Peso3 (7-8 mg) esterilizados posteriormente. Las muestras de sangre fueron obtenidas de un paciente sano. Se colocó 1mL de sangre y plasma en cada tubo control y en los tubos experimentales que contenían previamente telaraña de 3-4mg, 5-6mg y 7-8mg para cada análisis respectivo por triplicado. Los TC fueron: para el grupo control (5,34min), el grupo Peso1 (4,30min), grupo Peso2 (3,83min) y grupo Peso3 (3,69min). Los TP fueron: para el grupo control (14,33seg), grupo Peso1 (11,33seg), grupo Peso2 (10,33seg) y grupo Peso3 (8,66seg). Se usó la prueba de Bonferroni para determinar entre qué grupos de estudio había diferencias significativas. Se concluye que la tela de la araña *Sc.longipes* posee efecto coagulante mostrando una reducción significativa del TC y TP ($P < 0.05$). En el TP, se encontró que a mayor peso, el efecto coagulante mejora significativamente ($P < 0.05$).

Palabras clave: tela de araña, efecto coagulante, *Scytodes longipes*

INTRODUCCIÓN

Durante décadas, la tela de araña ha suscitado el interés de los investigadores por sus peculiares propiedades mecánicas y su carácter biocompatible.

Países como España reportan bibliográficamente los remedios caseros hechos a base de esta tela. Inclusive algunos autores ^{1, 2,3}, mencionan su uso por los soldados en las batallas.

Actualmente se ha desarrollado un amplio estudio sobre la estructura molecular de la tela de araña.⁴La proteína base se llama espidroína. Además se están estudiando los genes responsables de la producción de tela de araña y la aplicación de ésta en la ingeniería de tejidos. Estudios en cultivos celulares corroboran la biocompatibilidad y biodegradabilidad de este biomaterial.^{5, 6,7,8,9,10} Tradicionalmente se ha reportado el uso de la tela de araña como hemostático. Sin embargo, aún no se reporta un estudio que corrobore experimentalmente la actividad coagulante de la tela de araña. Por otra parte, siendo los trastornos hemorrágicos un problema de interés odontológico, el uso de tela de araña como apósito usado tópicamente sería de gran beneficio pues no alteraría la medicación anticoagulante que reciben generalmente este grupo de pacientes.

En tal sentido, se diseñó el siguiente estudio *in vitro* aplicado en muestras de sangre humana, con el objetivo de evaluar el efecto coagulante de la tela de la araña *Scytodes longipes* mediante la medición del Tiempo de Coagulación y el Tiempo de Protrombina.

Los objetivos de la investigación es evaluar el efecto coagulante de la tela de la araña *Scytodes longipes* aplicado en muestras de sangre a partir de un paciente joven, sinodo los objetivos específicos

- Comparar el tiempo de coagulación con y sin el uso de la tela de araña *Scytodes Longipes*.
- Comparar el Tiempo de coagulación de la tela de la araña *Scytodes longipes* en 3 proporciones distintas aplicado en muestras de sangre humana.
- Comparar el Tiempo de Protrombina con y sin el uso de la tela de araña *Scytodes Longipes*.

- Comparar el Tiempo de Protrombina de la tela de la araña *Scytodes longipes* en 3 proporciones distintas aplicado en muestras de sangre humana.

MATERIAL Y MÉTODOS

Tipo de Estudio: El Tipo de Estudio fue experimental, transversal e in vitro.

Universo y muestra: El universo fue la sangre de un donante sano. La muestra fue Probabilística de tipo aleatoria simple porque todas las muestras de sangre tienen las mismas probabilidades de ser elegidas. Se estima extraer 42 ml de sangre para ambas determinaciones (TC y TP), de un sujeto donante que cumpla con los criterios de inclusión y exclusión.

Métodos, procedimientos, técnicas:

Obtención de la tela de la araña *Scytodes Longipes*

Se cazó 8 arañas **Scytodes Longipes** que fueron trasladadas a una habitación semidesocupada (solo con muebles de madera apolillados), deshabitada y limpia, las cuales fueron colocadas detrás de los muebles de madera y se inspeccionaron cada 10 días para controlar la producción de tela de araña.

Aproximadamente en 8 meses se obtuvo una cantidad moderada de tela.

1.1. Protocolo de desinfección y esterilización de la telaraña

La telaraña obtenida tuvo cierta cantidad de polvo adherida y en algunos casos restos alimenticios de la araña, por lo que se sometió a una desinfección y posteriormente esterilización siguiendo los siguientes pasos:

- Limpieza mecánica con la ayuda de un estereoscopio.
- Lavado con hipoclorito de sodio diluido en suero en una proporción de 1:10.
- Secado a 37° C en incubadora.
- Empaquetado y esterilización por calor húmedo.
- Se repartió la tela de araña en pesos crecientes en tubos de ensayo según el esquema que se muestra en anexos (3-4mg; 5-6 mg; 7-8 mg)

1.2. Método de recolección de datos

Luego de la selección del paciente muestra (teniendo en cuenta criterios de inclusión y exclusión), se procedió a recolectar datos:

Instrumentos de recolección de datos:

Ficha clínica: Que constó de las siguientes partes: Datos de filiación y antecedentes de salud

Ficha de registro de datos y control: Que constó de 2 cuadros; uno para registrar el Tiempo de Coagulación y otro para el Tiempo de protrombina.

1.3. Evaluación del TIEMPO DE COAGULACIÓN de la tela de la araña frente a las muestras de sangre.

Se empleó una muestra: 12mL de sangre humana fresca de un paciente cuyo Tiempo de protrombina (TP) y tromboplastina parcial (TPT) se encuentre en un rango normal.

A) OBTENCION DE LA SANGRE:

- Se colocó el torniquete en el brazo. Para producir la ingurgitación de la vena.
- Una vez seleccionada la vena mediana cubital se procedió a limpiar el sitio de la punción.
- Se pinchó la piel y posteriormente la vena en dirección contraria al flujo sanguíneo. Con un ángulo de 15° respecto al brazo y con el bisel de la aguja hacia arriba.
- Se utilizó el sistema Vacutainer utilizando 4 tubos al vacío, el 1er tubo para el control y los otros 3 experimentales con pesos crecientes de telaraña previamente colocada.
- Todas las muestras fueron tomadas por triplicado y extraídas en el mismo momento.

b) MEDICIÓN DEL TIEMPO DE COAGULACIÓN

Se realizó de la siguiente manera:

- a. Inmediatamente ingresada la sangre al tubo de ensayo se procedió a moverlo para homogeneizar la muestra y se colocó en baño María de 37°C.
- b. Cada tubo se inclinó 45 ° aproximadamente cada 15 segundos, para comprobar que la sangre ha coagulado.
- c. El intervalo de tiempo comprendido entre el ingreso de sangre a la jeringa y el cambio de un estado fluido a otro coloidal se ha interpretado como el "Tiempo de coagulación".

d. El mismo método se aplicó en la medición del tiempo de coagulación en todos tubos.

1.4. Evaluación del TIEMPO DE PROTROMBINA de la tela de la araña frente a las muestras de plasma.

Se empleó una muestra 30 mL de sangre humana.

A) OBTENCION DEL PLASMA:

- Se colocó el torniquete en el brazo para producir la ingurgitación de la vena.
- Una vez seleccionada la vena mediana cubital se procedió a limpiar el sitio de la punción.
- Se pinchó la piel y posteriormente la vena en dirección contraria al flujo sanguíneo. Con un ángulo de 15° respecto al brazo y con el bisel de la aguja hacia arriba.
- Se utilizó el sistema Vacutainer utilizando 6 tubos al vacío con citrato de sodio, el 1er tubo para el control, otros 3 experimentales (tela de araña en pesos crecientes).
- Después se llevó a centrifugar la sangre y se separó el plasma que fue alicuotado y mantenido en congelación para su posterior uso.
- Todas las muestras fueron tomadas por triplicado y extraídas en el mismo momento.

B) MEDICIÓN DEL TIEMPO DE PROTROMBINA

- Como el reactivo de TP viene liofilizado, es decir en polvo, para utilizarlo se colocó 2 mL de agua destilada, se agitó suavemente hasta que se disolvió completamente y se lo dejó incubar por 15 minutos.
- Se colocó en un tubo de ensayo el plasma ya separado.
- En otro tubo se colocó el reactivo de TP.
- Estos tubos se los lleva a baño María a 37 C de 3 a 5 minutos
- Transcurrido este tiempo, en los tubos rotulados previamente, se añadió el plasma (200uL) y luego el reactivo (200 µL), se activó el cronometro y se procedió a mezclar sin sacar del baño María.
- Pasado unos segundos aproximadamente luego de ver activado el cronómetro se sacó el tubo hasta observar que se forme la red de fibrina.

- El intervalo de tiempo transcurrido desde que se añade el plasma hasta que se formen los filamentos de fibrina, será interpretado como el "Tiempo de Protrombina".
- El mismo método se aplicó en todos los tubos.

RESULTADOS

Se utilizó la prueba de Shapiro Wilk para evaluar la distribución de los datos respecto a su normalidad. Se utilizó la técnica del análisis de varianza para comparar los tiempos de coagulación entre los grupos de estudio tanto para las muestras de sangre como en plasma. Al encontrar diferencias entre dos o más grupos se utilizó la prueba de Bonferroni (prueba *post-hoc*) para determinar entre qué grupos de estudio había diferencias significativas. El nivel de significancia con el que se trabajó fue de 0.05. El procesamiento y análisis de los datos se realizó con el programa estadístico Stata v12. Se observa diferencias significativas al comparar el Tiempo de Coagulación con y sin el uso de la Tela de la araña *Scytodes longipes*.

TABLA 1: Tiempo de coagulación promedio en sangre por grupo de estudio

Grupo de estudio	N°	media	D.S.	Mediana	min	max
Control	3	5.343	0.221	5.40	5.10	5.53
Peso 1 (3-4mg)	3	4.307	0.040	4.30	4.27	4.35
Peso 2 (4-6mg)	3	3.837	0.535	4.12	3.22	4.17
Peso 3 (7-8mg)	3	3.690	0.287	3.55	3.50	4.02
Total	12	4.294	0.730	4.22	3.22	5.53

GRÁFICO 1: Tiempo de coagulación promedio en sangre por grupo de estudio



TABLA 2: Comparación del tiempo de coagulación en sangre con y sin el uso de la tela de la araña *scytodes longipes*

Grupos	Diferencia de medias	P
Control y peso 1	1.037	0.026
Control y peso 2	1.507	0.003
Control y peso 3	1.653	0.001

Se utiliza la técnica del análisis de varianza y la prueba de Bonferroni posterior para comparar entre pares de grupos. Siendo $P < 0.05$ demuestra que Sí hay diferencia en al menos dos grupos en el tiempo de coagulación promedio en muestra de sangre.

Al utilizar la prueba de Bonferroni, se encuentra diferencias significativas entre:

Control y Peso 1 -Control y Peso 2 - Control y Peso 3

El $P < 0.05$ indica que Sí hay diferencias significativas entre el grupo control y cada grupo de peso.

TABLA 3: Comparación del tiempo de coagulación en sangre en tres proporciones distintas de la tela de la araña *scytodes longipes*

Grupos	Diferencia de medias	P
Peso 1 y Peso 2	0.47	0.678
Peso1 y Peso 3	0.616667	0.287
Peso 2 y Peso 3	0.146667	1.000

Siendo el valor de P mayor que 0.04 NO se encontró diferencias significativas entre los grupos de peso.

TABLA 4: Tiempo de protrombina promedio en plasma por grupo de estudio

Grupo de estudio	N°	media	D.S.	min	max
Control	3	14,333	0,577	14	15
Peso 1 (3-4mg)	3	11,333	0,577	11	12
Peso 2 (4-6mg)	3	10,333	0,577	10	11
Peso 3 (7-8mg)	3	8,667	0,577	8	9
Total	12	11,167	2,209	8	9

GRÁFICO 2: Tiempo de protrombina promedio en plasma por grupo de estudio

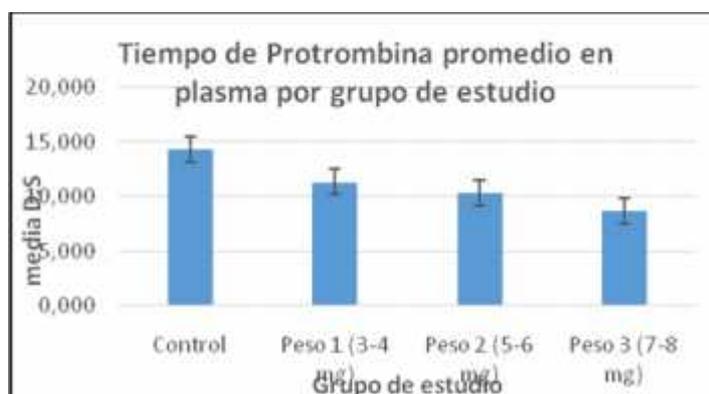


TABLA 5: Comparación del tiempo de protrombina en plasma con y sin el uso de la tela de la araña *scytodes longipes*

Grupos	Diferencia de medias	P
Control y peso 1	3.000	0.001
Control y peso 2	4.000	0.000
Control y peso 3	5.667	0.000

Comparación del tiempo de Protrombina en plasma entre el grupo control con cada grupo de peso utilizando la técnica del análisis de varianza y la prueba de bonferroni posterior para comparar entre pares de grupos. Siendo $P < 0.05$, indica que SI hay diferencia en al menos dos grupos en el tiempo de Protrombina promedio en muestra de plasma.

Al utilizar la prueba de Bonferroni, se encuentra diferencias significativas entre:

Control y Peso 1 - Control y Peso 2 - Control y Peso 3

El $P < 0.05$ indica que SI hay diferencias significativas entre el grupo control y cada grupo de peso.

TABLA 3: Comparación del tiempo de protrombina en plasma en tres proporciones distintas de la tela de la araña *scytodes longipes*

Grupos	Diferencia de medias	P
Peso 1 y Peso 2	1	0.4
Peso1 y Peso 3	2.66667	0.003
Peso 2 y Peso 3	1.66667	0.046

de especie *Scytodes longipes*, también conocida como la "araña de jardín". Esta posee quelíceros pequeños y gracias a esta característica anatómica no representan una amenaza para el ser humano pues no pueden traspasar el epitelio e inocular su veneno.¹⁴

No se reporta un estudio experimental que demuestre el poder hemostático de la tela de araña, sin embargo esta característica se describe en estudios sobre sus propiedades como lo señala Elices¹⁰ en sus investigaciones de revisión, además de otras propiedades terapéuticas de la tela.¹⁵ Según Altman y col (2003) Los hilos de seda procedentes del gusano de seda tienen el inconveniente de que pueden provocar reacciones alérgicas¹⁶ y de que al ser porosas no deben utilizarse en heridas donde exista un gran riesgo de infección.¹⁰ Elices (2009) describe como causa de la reacción alérgica de la seda de gusano a la goma de sericina que recubre los dos filamentos de fibroína que conforman esta seda. A diferencia de lo mencionado anteriormente, la seda de araña se compone principalmente de una proteína llamada espidroína y no posee sericina lo cual lo convierte en un mejor biomaterial.

El propósito del presente trabajo fue evaluar el efecto coagulante de la tela de araña, para de esta forma ampliar la investigación y poder usarlo como biomaterial en cirugías diversas entre ellas las odontológicas. Teniendo esto en cuenta, se necesitaba esterilizar la tela de araña recolectada, además para evitar que algún otro agente pueda interferir con la propiedad coagulante. Según autores¹⁰, se han probado las propiedades a distintas temperaturas y se ha observado que las conservan hasta los 150 °C, lo que sugiere que las fibras se pueden esterilizar por calor antes de usarlas en cirugías. En tal sentido, se eligió como protocolo de esterilización, una limpieza previa mecánica / química (usando hipoclorito de sodio) y una esterilización por calor húmedo.

Muchos autores^{3,12,10,16} describen a la seda de araña como un biomaterial biocompatible con el ser humano; en el año 2006,¹⁶ Allmeling realiza un estudio experimental *in vitro* cultivando células de Schwan en las fibras de seda de araña obteniendo como resultado células que proliferaron y se adhirieron exitosamente envainando las fibras de seda.¹⁷ G Yong, por su parte, describe las diversas aplicaciones de la seda como biomaterial y en la ingeniería tisular en varios formatos

(películas, fibras, redes mallas, membranas, hilos) para la elaboración de tejido óseo, ligamentos y cartílago.

Además de una buena biocompatibilidad, ¹⁸Wang (2008) destaca la biodegradabilidad de la tela de araña. La tela de araña se halla recubierta por hongos que contienen antibióticos para evitar que otros microorganismos se alimenten de la tela de araña rica en proteínas, lo cual puede justificar un poder antibiótico de tela aunque no se conoce la efectividad de la misma. ^{10,20}En el presente estudio se evaluó la actividad pro coagulante de la tela de araña *in vitro* obteniendo resultados positivos, pues se halló diferencias significativas entre el tiempo de coagulación / tiempo de protrombina con y sin el uso de tela de araña; siendo menor el tiempo de coagulación con el uso de tela de araña. Sin embargo, no se encontró diferencias significativas usando distintas proporciones de tela. La tela de araña, dentro del organismo de la araña se halla en estado líquido, y cambia de estado a sólido por acción de la espidroína frente al cambio de pH.¹⁹

CONCLUSIONES

1. El presente estudio determinó que la tela de la araña *Scytodes longipes* Sí posee efecto coagulante aplicada en muestras de sangre humana, ya que se presentó una reducción significativa en el tiempo de coagulación ($P < 0.05$).
2. El Tiempo de Coagulación con el uso de tela de la araña *Scytodes longipes* redujo significativamente ($P < 0.05$) encontrándose diferencia entre el grupo control y el grupo de peso (3-8 mg).
3. Al comparar el Tiempo de Coagulación de la tela de la araña *Scytodes longipes* en 3 proporciones distintas (3-4 mg; 5-6 mg; 7-8mg), NO se encontró diferencia significativa entre los grupos de peso 1, 2 y 3.
4. El Tiempo de Protrombina en plasma con el uso de tela de la araña *Scytodes longipes* redujo significativamente ($P < 0.05$) encontrándose diferencia entre el grupo control y el grupo de peso (3-8 mg).
5. Al comparar el Tiempo de Protrombina de la tela de la araña *Scytodes longipes*, Sí se encontró diferencias significativas entre el grupo de peso 1 (3-4mg) con el grupo de peso 3 (7-8 mg).

6. Al comparar el Tiempo de Protrombina de la tela de la araña *Scytodes longipes*, Síse encontró diferencias significativas entre el grupo de peso 2 (5-6mg) con el grupo de peso 3 (7-8 mg).
7. Al comparar el Tiempo de Protrombina de la tela de la araña *Scytodes longipes*, NO se encontró diferencias significativas entre el grupo de peso 1(3-4mg) con el grupo de peso 2 (5-6 mg).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CANTÓ, J. Plinio, Historia Natural (2ª edición). Ediciones Cátedra, Madrid. 2007
2. HAMBDEN C.T. Shakespeare's son-in-law John Hall, man and physician. Archon Books, 1964
3. GONZALES y col. Las telarañas en la medicina popular española: historia reciente, vigencia y distribución geográfica de un recurso terapéutico. *Revista Ibérica de Aracnología*, nº 21 (31/12/2012): 169 174.
4. FLORENCE et al. Silkworms transformed with chimeric silkworm/spider silk genes spin composite silk fibers with improved mechanical properties. *PNAS*. (2012); 109 (3): 923 – 928.
5. KAPLAN, D., ADAMS. *Silk Polymers*. Washington, DC: American Chemical Society. (1994). 370pp.7
6. COLORADO, A.C.. Análisis de biomateriales para uso en ingeniería de tejido de piel: *Revista Ingeniería Biomédica* ISSN 1909-9762 / Volumen 7 / Número 14 / Julio-Diciembre de 2013 / pp.11-23 10
7. WONG PO FOO. Genetic engineering of fibrous proteins: spider dragline silk and collagen. *Advanced drug delivery reviews*, (2002); 54(8), 1131–43
8. KON'KOV A. S. Biocompatible materials from regenerated silk for tissue engineering and medicinal therapy. *Applied Biochemistry and Microbiology* (2010);46(8), 739–7
9. MARTÍNEZ-MURILLO. Mecanismos de activación de la coagulación. *MG Rev Med Inst Mex Seguro Soc* 2006; 44 (Supl 2): 51-58
10. ELICES CALAFAT, M. "Las arañas y sus telas. Un paradigma multidisciplinar" Discurso de ingreso pronunciado en acto de su toma de posesión como Académico de Número de la Real Academia de Doctores de España. Contestación del Excmo. Sr. Doctor D. Pedro García Barreno (2009)
11. RIVELINO. A teia de aranha. *Ciencias das origens*. (2003) 6:1 – 8
12. ELICES CALAFAT, M. "Materiales biológicos y biomateriales" II Programa de Promoción de la Cultura Científica y Tecnológica. *Horizontes Culturales. Las Fronteras de la Ciencia*, pp.(1999) 113-125. Real Academia de Ciencias-España
13. GRANADOS, José. Arañas: "Arañas: Devoradoras de insectos mediante ingenios de seda." *Foresta* 46 (2009): 94-107.
14. PLINIO SEGUNDO, CAYO. *Historia natural. Obra completa*. Madrid: editorial gredos. ISBN 978-84-249-1684-8
15. ALTMAN, DIAZ et al. Silk based biomaterials. *Biomateriales*. Volume 24, Issue 3, February 2001, pages 401 -418
16. ALLMELING. Use of spider silk fibres as an innovative material in a biocompatible artificial nerve conduit. *J Cell Mol Med* (2006);10 (3): 770
17. YONGZHONG. Stem cell – based tissue engineering with silk biomaterials. *Biomateriales*. (2006) Vol. 27, Issue 36: 6064 - 6082
18. WANG. Recent progres son silk fibroin as tissue engineering biomaterials. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wain Ke Za Zhi*. (2008); 22(2) 192

19. LANDREH, ASKARIEH et al. A pH dependent dimer lock in Spider Silk Protein. Journal of Molecular Biology. Volume 404, Issue 2, November 2010. Pages 328 – 336
20. ELICES CALAFAT, M. y col. (2011). Usos Médicos de la Seda. Investigación y Ciencia. 2011; 28-35.