

176



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Comparación bioquímica, inmunológica y toxinológica de los venenos de *Loxosceles boneti* y *Loxosceles reclusa*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A :

BLANCA MARGARITA RAMOS CERRILLO



DIRECTOR DE TESIS: DR. ALEJANDRO ALAGÓN



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

2002

FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

Envío a la Dirección General de Bibliotecas y
INAM a difundir en formato electrónico e impreso el
contenido de mi trabajo recepcional
TÍTULO: Blanca Ramos Cerrillo

FECHA: 19. Nov. 2002

PRIMERA: 19. Nov. 2002

M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA

Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunico a usted que hemos revisado el trabajo escrito: Comparación bioquímica, inmunológica y toxinológica de los venenos de Loxosceles boneti y Loxosceles reclusa.

realizado por Blanca Margarita Ramos Cerrillo

con número de cuenta 09538306-6 , quién cubrió los créditos de la carrera de: Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario Dr. Alejandro Alagón Cano

Propietario M. en C. Ricardo Sánchez Pérez

Propietario M. en C. Alejandro Olvera Rodríguez

Suplente Dr. Víctor Manuel Valdés López

Suplente Dr. Luis Felipe Jiménez García

FACULTAD DE CIENCIAS
U. N. A. M.

Consejo Departamental de Biología

M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

Dedicar algo a alguien es dar parte de su vida a algún individuo. Creo que en esta vida todo debe ser recíproco y de alguna manera se debe de justificar la existencia. Quizá esta sea la forma en que me guste justificar la mía, y que mejor inspiración esa persona que me ha brindado 23 años y nueve meses de su vida.

Mamá se que no puedo corresponder a todo lo que me has dado aunque éste pequeño esfuerzo es dedicado a tí.

Gracias Madre por estar conmigo en ésta vida. Gracias por la libertad.

AGRADECIMIENTOS

A el Dr. Alejandro Alagón, por la oportunidad de formar parte de su laboratorio, por la confianza y enseñanza.

Al M. en C. Alejandro Olvera, por el tiempo dedicado, por toda la enseñanza brindada y sobre todo por ser mi Maestro y amigo.

A los Dres. Alejandro Alagón, Luis Felipe Jiménez y Victor Valdés; a los M. en C. Alejandro Olvera y Ricardo Sánchez por sus comentarios y observaciones durante la escritura de la tesis y por fungir como jurado en mi examen profesional.

Al Dr. George Odell por sus acertados comentarios durante la realización de este trabajo.

Al Dr. Fernando Zamudio, por el apoyo técnico en la secuenciación aminoacídica.

Al Biol. Felipe Olvera, Olegaria Benítez y Ricardo Mondragón, por su apoyo técnico en el laboratorio.

A Elizabeth Mata Moreno, Graciela Cabeza Pérez y Sergio González Trujillo, por su apoyo técnico en la unidad de bioferio.

A Angélica Linares, por el apoyo administrativo en el laboratorio.

A todos mis compañeros del labo: Pichón, Felipón, Herlis, Deyanirus, George, Móni, Milis, Andrés, Rick, Roberto, Rosana, Judis, Alejandro, Doña Leo, Angélica, Angeles y Ricardo Mondragón, por aguantar mi mal genio.

A mi Madre por la buena fe.

A toda mi Familia, en especial a mi abuela, al tío Enrique y a la Pitufina por su ejemplo y perseverancia.

A todos **Muchas Gracias.**

Durante mi vida académica hay y hubieron ciertas personas que me dejaron recuerdos inolvidables, y se que sin esas vivencias se nos haría la vida más pesada.

Gracias a todas las personas que hicieron posible la conclusión de mi licenciatura, y aunque a veces la memoria me traiciona, esos recuerdos que quedan grabados en el tiempo.

Bien pues comencemos: A mis amigos "Miembros distinguidos de la Banda": Josue, Pablo, Martha, Victor, Israel, Rafael, Fernando, por los momentos inolvidables y por la gran amistad. A Nora y Sara por lo que compartimos. Muy especialmente a Paty Avalos por ser tan grandiosa y sincera persona. A Jenny y a Hilda. A Ipal, Diego, David T, Italia, Archi, por enseñarme otra cara de la vida. A Letus por ser firme en las decisiones. En estos últimos tiempos quiero agradecer infinitamente a Ergar por su grandiosa amistad y lealtad; a Angel por ser mi mejor compañero y amigo; a la banda "Cuervo": Janet, Ricardo (Cuervo) y David por ser lo que son. A Kari, Tony y Leonardo por empezar conmigo el ritual. A Otero y Orestes por ser tan particulares. A la Chíos y Karla por darme sonrisas sin pedir las. A los Profes que dejaron una huella en mi vida: Ranulfo, Talavera, Roberto, Ma. Elena, Zuazua, Victor Alvarez, M.A. Uriza y Javier Carmona, Ma. Teresa Benítez, L.F. Jiménez y Magda.

Muy especialmente quiero agradecer a Javier por crecer y brincar obstáculos juntos. Muchas gracias por ayudarme a pensar con claridad.

Gracias a la vida por permitirme conocer a todas estas personas y algunas otras.

Sinceramente BLANCA

El presente trabajo fue realizado en el Instituto de Biotecnología, UNAM. En el Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos

Bajo la dirección del
Dr. Alejandro Alagón Cano

Co. Asesor M. en C. Alejandro Olvera Rodríguez

Cuernavaca, Morelos.

Durante la realización de éste trabajo se contó con el apoyo económico de la beca otorgada por *PROBETEL*, y la ayuda de alimentación y hospedaje otorgada por el Instituto de Biotecnología de la UNAM.

	Contenido	Pág.
I.	Resumen	1
II.	Introducción	2
	Generalidades de arañas	2
a)	Taxonomía	2
b)	Anatomía	3
c)	Apareamiento	3
d)	Desarrollo	4
	Género <i>Loxosceles</i>	5
a)	Características corporales	5
b)	Distribución y hábitat	7
c)	Toxinología del veneno	7
	Antecedentes	10
a)	Bioquímica del veneno	10
b)	Variación intraespecífica	15
c)	Comparación entre los venenos de algunas <i>Loxosceles</i>	16
III.	Justificación	17
IV.a.	Objetivo general	17
IV.b.	Objetivos particulares	17
V.	Material y métodos	18
V.1.	Arañas	18
V.2.	Obtención del veneno	18
V.3.	Pruebas bioquímicas	19
a)	Cromatografía de exclusión molecular en gel	19
b)	Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	20
c)	Cromatografía de intercambio iónico (FPLC)	22
d)	Secuenciación por el método de Edman	24
V.4.	Pruebas de actividades enzimáticas	24
a)	Ensayo para determinar actividad de fosfolipasa tipo A ₁ y A ₂	24
b)	Ensayo para detectar la actividad de hialuronidasa	26
V.5.	Ensayos Inmunológicos	27
a)	Inmunización	27
b)	Medición de títulos por ELISA de los sueros y determinación de reacciones cruzadas <i>in vitro</i>	30

	Pp.
c) Pruebas de Western-blot	32
d) Inmunodifusiones	34
V.6. Pruebas toxinológicas	35
a) Dermatonecrosis en conejos	35
VI. Resultados	38
VI.1. Caracterización bioquímica del veneno de <i>L. boneti</i>	38
a) Cromatografía de exclusión molecular en gel	38
b) Caracterización de la Fracción II por Cromatografía de Intercambio iónico o FPLC	40
c) Comparación de las isoformas a nivel de secuencia amino terminal	42
d) Medición de actividad de hialuronidasa	44
e) Medición de la actividad de fosfolipasa tipo A	46
VI.2. Comparación intraespecifica del veneno de <i>L. boneti</i>	46
VI.3. Producción de anticuerpos en conejos contra <i>L. boneti</i> y <i>L. reclusa</i>	47
VI.4. Determinación de reacciones cruzadas	49
a) Pruebas de ELISA	49
b) Pruebas de Western-blot	51
c) Inmunodifusiones	55
VI.5. Toxinología del veneno de <i>L. boneti</i> y <i>L. reclusa</i>	58
a) Dermatonecrosis en conejos	58
VII. Discusión	59
VII.1. Caracterización bioquímica del veneno de <i>L. boneti</i>	59
VII.2. Comparación intraespecifica del veneno de <i>L. boneti</i>	62
VII.3. Producción de anticuerpos en conejos contra <i>L. boneti</i> y <i>L. reclusa</i> y determinación de reacciones cruzadas	62
a) Inoculaciones, pruebas de ELISA y Western-blot	62
b) Inmunodifusiones	64
VII.4. Dermatonecrosis en conejos	65
VIII. Conclusión	66
IX. Perspectivas	66
X. Bibliografía	67

ABREVIATURAS

ATP	adenosin trifosfato
BCA	Ácido binciconínico
ELISA	Inmunoensayos acoplados a enzimas
EDTA	Ácido etilendiamino tetraacético
Ex. glán.	Extracto de glándula
FII	fracción II
FPLC	cromatografía de intercambio iónico
Hemo	Hemolinfa
I ₁	Isoforma uno
I ₂	Isoforma dos
I ₃	Isoforma tres
kDa	kilo Daltons
<i>L.b.</i>	<i>Loxosceles boneti</i>
<i>L.r.</i>	<i>Loxosceles reclusa</i>
mA	miliamperios
µg	microgramos
ml	militros
mM	milimolar
MPM	marcador de peso molecular
nm	Nanómetros
rpm	revoluciones por minuto
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio
Vp	veneno puro

Apéndice de Reactivos y Soluciones

- Acetato de amonio 20 mM pH 4.7
- Acetato de amonio 20 mM pH 4.7 + 2M NaCl

Reactivos para la electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

- Solución de acrilamida (30% acrilamida + 0.8% bis-Acrilamida).
- Buffer separador (1.5 M Tris + 0.4% SDS).
- Buffer concentrador (0.5 M Tris + 0.4% SDS).
- Buffer de corrida (0.25 M Tris + 0.19 M glicina + 0.1% SDS).
- Buffer de carga 2X (10 % glicerol + 2.5% SDS + 50 mM Tris-HCl, pH 6.8 + 5% 2-mercaptoetanol + 0.002 % Azul de bromofenol).
- Persulfato de amonio al 10%. Disolver 0.1 g de persulfato de amonio en 1 ml de agua desionizada.
- Solución de tinción (Azul brillante de Coomassie) (50% metanol + 10% ácido acético + 0.2 % azul de Coomassie G250).
- Solución de destinción (10% metanol + 10% Ácido acético)

Reactivos para Western-blot

- TBST (5 ml Tris-HCl 1M pH 7.5 + 15 ml NaCl 5M + 250µl Tween 20. Aforar a 500 ml)
- Buffer de Transferencia (39 mM de glicina + 48 mM Tris-Base + 0.037% SDS+20% metanol. Aforar con 500 ml)
- Solución de bloqueo (5 gr de leche + 100 ml de TBST 1X + 1 ml de azida de sodio)

Reactivos para ELISA

- Carbonato de Sodio 0.1M pH 7.95
- Solución de lavado (50 mM Tris/HCl pH8 + 150 mM NaCl+40 mM MgSO₄ + 0.05% Tween20)
- Solución de bloqueo (50 mM Tris/HCl pH 8 + 0.5% gelatina + 0.2% Tween 20)
- Solución de reacción (50 mM Tris/HCL pH 8 + 500mM NaCl + 0.1 mg-ml gelatina + 0.05% Tween 20)

Inmunodifusiones

- Solución de lavado PBS pH 7.4
- Solución de tinción negro de amido 5%
- Solución de destinción 70 ml de metanol + 10 ml ác. Acético + 20 ml de agua

Reactivos para evaluar la actividad de fosfolipasas A

- Buffer 0.1M Tris-HCl + 5 mM CaCl_2 + 0.5% de Tritón X-100

Reactivos para evaluar la actividad de hialuronidasa

- Matriz del gel con hialuronato 0.5 mg/ml
- Solución de lavado (5% Tritón X-100 en 0.1 M de fosfato de sodio pH 5.8 + 0.15 M NaCl)
- Solución de lavado (0.05% Tritón X-100 en 0.1 M de fosfato d sodio pH 5.8 + 0.15 M NaCl)
- Solución de lavado (0.1 M de fosfato d sodio pH 5.8 + 0.15 M NaCl)
- Solución de lavado (0.015 M Tris-HCl pH 7.95)
- Stain-all 0.1% en formamida pura. Guardar en oscuro
- Solución de tinción 5 ml stain-all + 5ml de formamida pura + 20 ml de isopropanol + 1.5 ml de Tris-HCl pH 7.95. Aforar a 100 ml.
- Solución de destinción 5% de formamida + 20% de isopropanol + 0.015 Tris-HCl pH 7.95.

I. RESUMEN

De la gran variedad de especies de arañas en el mundo, sólo unas pocas son capaces de producir cuadros severos de envenenamiento en el hombre. Entre ellas se encuentran los géneros *Latrodectus* (viudas negras), *Loxosceles* (arañas violinistas) y *Phoneutria* (araña de los platanares), siendo los dos primeros los que tienen mayor incidencia en accidentes a nivel mundial.

En México, se distribuyen 39 especies del género *Loxosceles*. La sintomatología característica por mordedura de *Loxosceles* es la dermonecrosis, provocada por la actividad de la esfingomielinasa D (necrotoxina de 35 kDa), el componente principal del veneno.

En este trabajo se compararon bioquímica e inmunológicamente los venenos de *Loxosceles boneti* y *Loxosceles reclusa*.

Ensayos bioquímicos e inmunológicos revelaron una gran similitud entre ambos venenos. Estudios de ELISA y Western-blot revelaron reacciones cruzadas significativas con los sueros producidos contra *L. boneti* y *L. reclusa*.

En el veneno de *L. boneti* se encontraron tres isoformas de la necrotoxina, donde las isoformas uno y dos tienen un efecto biológico similar (necrosis), mientras que la tercera resultó inactiva. En el veneno de *L. reclusa* se han reportado cuatro isoformas.

Por otro lado, se secuenciaron y analizaron las secuencias aminoterminales de las isoformas de *L. boneti* y se encontró un alto grado de identidad entre las primeras dos, mientras que la tercera resultó ser divergente con respecto a las primeras. Por los resultados obtenidos se plantea desarrollar un antiveneno genérico para *Loxosceles*.

II. INTRODUCCIÓN

GENERALIDADES DE ARAÑAS

a) Taxonomía

Las arañas pertenecen al Phylum Arthropoda un gran grupo de animales con patas articuladas y con exoesqueleto rígido. La Clase de la que forman parte es la Arachnida la cual comprende organismos con cuatro pares de patas como: arañas, ácaros, opiliones, pseudoescorpiones y alacranes. Las arañas figuran dentro del Orden Aranae que a su vez se divide en los siguientes tres Subórdenes:

- i. Araneomorphae o arañas verdaderas, el cual incluye a los géneros *Latrodictus* y *Loxosceles*
- ii. Mygalomorphae o arañas primitivas, que comprende a las tarántulas
- iii. Mesothelae o arañas segmentadas.

La característica más importante que separa a las Araneomorphae de las Mygalomorphae y Mesothelae, es la orientación de los quelíceros o colmillos. En estos dos últimos Subórdenes los colmillos se encuentran localizados hacia el frente de la cabeza y se mueven hacia delante y abajo, mientras que los quelíceros de las Araneomorphae se encuentran por debajo de la cabeza y se abren lateralmente.

b) Anatomía

El cuerpo de la araña está dividido en dos partes: la parte anterior llamada cefalotórax o prosoma y la parte posterior que es el abdomen u opistosoma. Éstas dos se unen por una cintura estrecha llamada pedículo. El cefalotórax contiene al cerebro, a las glándulas venenosas y al estómago; en esta parte se unen los cuatro pares de patas que posee la araña. En el abdomen se encuentra el corazón, el tracto digestivo, los órganos reproductores, los pulmones, las tráqueas respiratorias y las glándulas de seda (Levi, 1993).

c) Apareamiento

El apareamiento en las arañas es muy particular. Inicialmente el macho sujeta los colmillos de la hembra con las patas delanteras, evitando así la mordedura de ésta. Una vez sujeta la hembra, el macho deposita el esperma con sus pedipalpos en una pequeña cavidad en la parte ventral del prosoma de la hembra. Para que se lleve a cabo la fecundación, la hembra como primer paso deposita los huevecillos en el útero externo, para posteriormente expulsar al esperma sobre éstos, de tal manera que todos los huevos queden fertilizados (Pinkston, 1998).

Particularmente en esta etapa y durante el período de crianza, la hembra es más agresiva que el macho, debido a que ésta se encuentra más susceptible a cualquier estímulo (Ramos, 2000).

d) Desarrollo

El desarrollo de las arañas es relativamente lento y es influenciado por las condiciones climáticas y la disponibilidad del alimento (Pinkston y Maguire, 1998).

La ontogenia de las arañas puede ser dividida en tres períodos o estadios:

- a) Embrionario el cual comprende desde que el huevo es fertilizado hasta que el cuerpo de la araña está parcialmente formado. Los huevos emergen de los 24 a los 36 días después de la puesta.
- b) Después de la eclosión de los huevos, las arañas carecen aún de ciertas características morfológicas, como los canales por donde éstas arrojan el veneno. En estos estadios la araña se alimenta solamente de su propio vitelo.
- c) Juvenil y adulto. En este último periodo todos los órganos y sistemas están completamente formados, además se caracteriza porque la araña comienza a ser autosuficiente. La diferencia básica entre una araña juvenil y un adulto es esencialmente la adquisición de la madurez sexual.

Los estadios que comprenden desde la eclosión de los huevos hasta adulto, son procesos separados por mudas (Foelix, 1996).

Las arañas mudan de exoesqueleto por lo menos de 4 a 12 veces antes de la madurez. Cuando la muda comienza, se incrementa la presión interna facilitando

que el exoesqueleto se desprenda, iniciando por el borde frontal y continuando alrededor del caparazón. En el proceso de la muda se reemplaza alguna extremidad que previamente pudo haber perdido la araña (Levi, 1993).

La concentración y actividad del veneno incrementa simultáneamente con el desarrollo ontogenético. Aunque se pueden presentar variaciones entre especies se ha observado que la forma completamente activa del veneno, aparece en la ninfa que coincide con el desarrollo de habilidades para cazar y predar por sí sola (Goncalves *et al.*, 1999). La manera en que cazará a su presa será clavando los quelíceros e inyectando el veneno con el fin de paralizarla (Moye, 1997; Biagi, 1974). Inmediatamente después arrojará enzimas digestivas para degradar el alimento antes de ingerirlo, ya que ninguna araña es capaz de degradar su alimento después de haberlo tragado (Preston-Mafham, 1996).

GÉNERO *Loxosceles* (Familia Sicariidae)

a) Características corporales

Las arañas que pertenecen a este género son conocidas comúnmente como reclusas o violinistas por poseer una marca en forma de violín con el mástil hacia atrás en la parte antero superior del cefalotórax (Platnick, 2000). La longitud corporal que presentan es de 8 a 13 mm, teniendo patas largas y delgadas con un largo de 2 a 4 cm aproximadamente, y palpos pequeños. La

diferencia entre una hembra y un macho radica en que las patas del macho son más largas y el abdomen es más estrecho (Alvarez del Toro, 1992).

El color de estas arañas es café amarillento, el cual puede variar de tono dependiendo de la especie y el estadio en el que éstas se encuentren. Poseen seis ojos en forma de diadas y microvellosidades a lo largo de todo el cuerpo, llamadas tricobotrias (Alvarez del Toro, 1992).

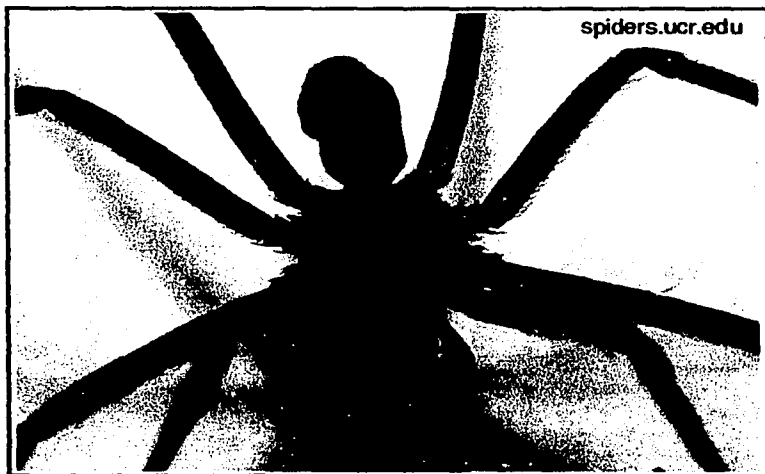


Figura 1. Foto que ilustra las características morfológicas de *Loxosceles reclusa*

b) Distribución y hábitat

Las arañas que están comprendidas en este género son cosmopolitas, generalmente encontrándose en regiones con clima tropical y templado (Ramos, 2000). En nuestro país se pueden encontrar alrededor de 39 especies (Figura 2) (Hoffman, 1976; Gerstch, 1983).

Estas preferentemente habitan en la corteza de árboles, maderas y ladrillos, debajo de piedras, surcos de instalaciones pecuarias y cuevas. Coexistiendo con los humanos pueden encontrarse: debajo de muebles, en los rincones de las paredes, en hendiduras y desperdicios abandonados, etc.

c) Toxinología del veneno

Las arañas usan su veneno para preñar a insectos y alimentarse, aunque también lo utilizan para defenderse cuando se sienten agredidas (Preston-Mafham, 1996). Uno de las principales causas por las que se suscitan accidentes de mordedura por *Loxosceles*, como se mencionó anteriormente, es la constante convivencia con el hombre. La incidencia de estos accidentes ocupa uno de los primeros lugares a nivel mundial (De Root, *et al.* 2002).

El envenenamiento causado por la mordedura de una araña violín se llama **LOXOSCELISMO**. Se ha visto que se presentan diferencias en los efectos de la

mordedura para el caso de las especies norte y centroamericanas con respecto a las especies sudamericanas (Tabla 1) (Catálogo de especies *Loxosceles*, Platnick, 2000). En el primer caso comúnmente dan lugar a lesiones necróticas locales, raramente llegando a causar efectos sistémicos no necrosantes. Para el caso de las especies sudamericanas además de la necrosis local, pueden llegar a producir efectos sistémicos no necrosantes (Ramos, 2000).

Tabla 1. Especies de *Loxosceles* americanas que provocan mayor incidencias de accidentes por mordedura

Especies Norteamericanas	Especies Sudamericanas
<i>Loxosceles boneti</i> (Centro de México)	<i>Loxosceles gaucho</i> (Brasil)
<i>Loxosceles deserta</i> (Sur de Estados Unidos y Norte de México)	<i>Loxosceles laeta</i> (Chile, Perú, Ecuador y Argentina principalmente)
<i>Loxosceles reclusa</i> (Sur de Estados Unidos)	<i>Loxosceles intermedia</i> (Brasil y Argentina)

El grado de necrosis local se relaciona con el estadio en el que se encuentre la araña, la dosis del veneno que inyecte en la mordedura y el estado inmunitario del paciente (Moye de Alba, 1997; Maguire, 1998).

La necrosis es precedida por edema, acumulación de células inflamatorias y vasodilatación, lo cual culmina con una vesícula negra llamada comúnmente "ojo de buey". Ocasionalmente las especies americanas del género *Loxosceles*, pueden además producir hemólisis intravascular asociada a esferocitosis, alteración que persiste durante varios días (Maguire, 1998; Rosse, 1998).

En casos muy graves de loxoscelismo se presenta afectación visceral en el hígado y los riñones, y hemolisis masiva. Generalmente los casos agudos letales

se limitan a niños con padecimientos tales como: hemólisis intravascular, anemia hemolítica, hemoglobinuria, fiebre elevada, insuficiencia renal, edema pulmonar y shock (Moye, 1997; Maguire, 1998; Harwood, 1987).

ANTECEDENTES

a) Bioquímica del veneno

Hasta el momento pocos venenos de arañas se han estudiado con detalle, no obstante se presume que el número de moléculas bioactivas de todas las especies de arañas, pueden alcanzar hasta un millón.

El veneno de *Loxosceles* está compuesto por lo menos de diez a doce proteínas (Russell, 1987), entre las que figuran: esterases, fosfatasa alcalina, hialuronidasa, fosfohidrolasas, lipasas, proteasas y otras enzimas que producen necrosis y hemólisis en los mamíferos (Tabla 2) (Moye, 1997; Blum, 1981).

Tabla 2. Componentes principales reportados en el veneno de algunas arañas *Loxosceles*.

SUSTANCIAS IDENTIFICADAS EN EL VENENO DE DE ARAÑAS *Loxosceles*

- | | |
|-----------------------------|-----------------------|
| 1. Histamina | 7. Hialuronidasas |
| 2. Serotonina | 8. Lipasas |
| 3. Proteasas | 9. Fosfatasa alcalina |
| 4. Poliamina (espermina) | 10. 5'-ribonucleótido |
| 5. Ácido gama aminobutírico | 11. Fosfohidrolasa |
| 6. Esterasas | 12. Esfingomielinasa |

Frecuentemente el veneno está enriquecido con aminas biogénicas, que para el caso de algunos vertebrados e invertebrados son potentes antagonistas de receptores de glutamato (Williams, 1997). Éstas no están consideradas dentro de las fracciones tóxicas, aunque son capaces de producir dolor intenso al ser inoculadas en mamíferos (Ramos, 2000).

La esfingomielinasa es el componente principal en el veneno de *Loxosceles* teniendo una gran importancia en la causa de la necrosis en la piel. Esta enzima se une a las membranas de células (epiteliales, endoteliales del tejido vascular y eritrocitos) hidrolizando a los esfingolípidos para posteriormente liberar ceramida (N-acil-esfingosina) y fosforilcolina (Figura 3) (Gatt, 1978). La hidrólisis induce la quimiotaxis de neutrófilos ocasionando trombosis vascular y una reacción de tipo Arthus (Moye de Alba, 1997; Maguire, 1998; Sánchez, 1993).

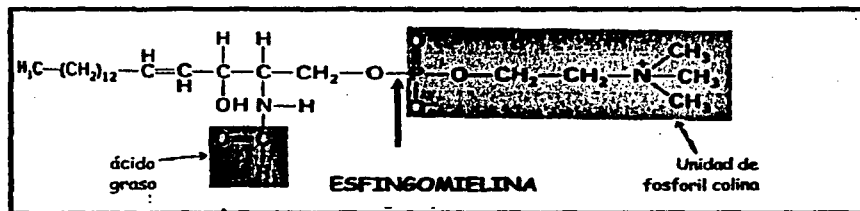


Figura 3. Fórmula de la esfingomielina y productos generados a partir de la hidrólisis por esfingomielinasa. La flecha azul indica el sitio de hidrólisis (Stryer, 1985).

Los posibles mecanismos de producción de lesiones necróticas locales se ilustran en la figura 4 (Tambourgi, 1998).

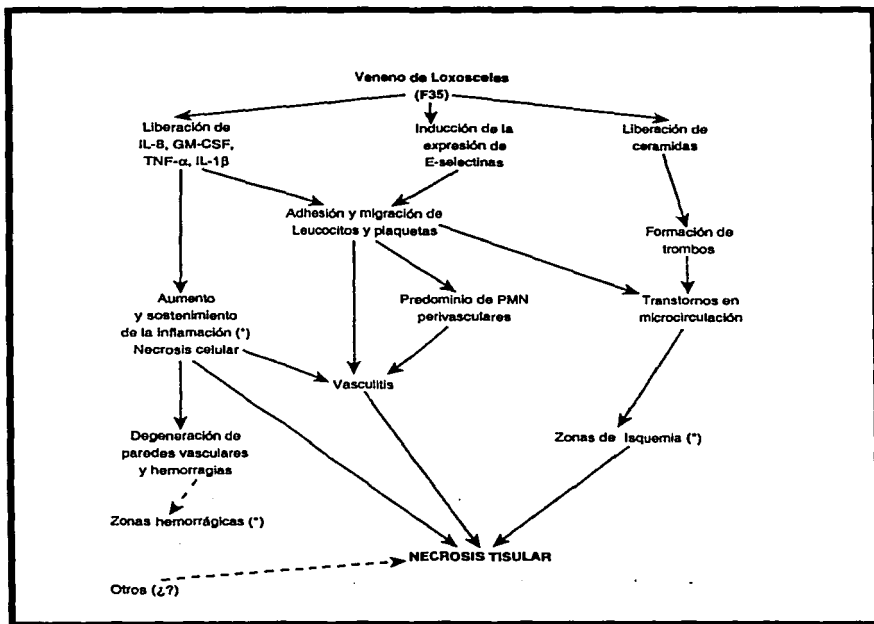


Figura 4. Posibles mecanismos de producción de necrosis locales. Los fenómenos marcados con (*) son aquellos que producirían la lesión típica del loxoscelismo cutáneo: la placa mormórea o livedoide.

Se ha encontrado actividad de esfingomielinasa en los contenidos estomacales de *Baduma insignis* y *Lampona cylindrata*. Esto abre la posibilidad de que *Loxosceles* y estas arañas australianas puedan tener un mecanismo similar para producir dermonecrosis, puesto que el contenido estomacal puede contaminar a

las mordeduras (Young, 2000). Sin embargo, en el caso de las *Loxosceles* las esfingomielinasas son componentes verdaderos del veneno.

Las hialuronidasas, otras enzimas involucradas en el envenenamiento, son comunes en los venenos de casi todas las arañas (Tan y Ponnundurai, 1992). Han sido detectadas en un número considerable de especies (Geren, 1984) incluyendo a *Loxosceles sp.*, aunque en éstas se ha reportado una baja actividad enzimática (Wright *et al.*, 1973).

Las hialuronidasas son enzimas que catalizan la ruptura de enlaces glicosídicos internos de ciertos mucopolisacáridos del tejido conectivo, ácido hialurónico y coindritín sulfatos A y C, componentes esenciales de la matriz extracelular. Las hialuronidasas están consideradas como factores de dispersión del veneno, debido a que la hidrólisis de ácido hialurónico facilita la difusión del resto de los componentes tóxicos dentro de los tejidos de la víctima (Cevallos *et al.*, 1992).

Se han identificado hialuronidasas y proteasas en los venenos de dos arañas australianas: *Baduma insignis* y *Lampona cylindrata*. Estas enzimas por analogía de las estudiadas en *Loxosceles*, pueden estar involucradas en la patogénesis de la ulceración de la piel; las hialuronidasas actúan como factor dispersante y las proteasas se piensa que están implicadas directamente en la dermonecrosis a través de la digestión de las proteínas que componen la matriz extracelular (Young, 2000).

Recientes estudios han identificado dos proteasas, Loxolisina A y Loxolisina B presentes en *L. intermedia*. Loxolisina A es una metaloproteasa de 20-28 kDa con actividad fibrinolítica (degrada fibrinógeno) y fibronectinolítica (degrada fibronectina). Esta proteína está involucrada en los efectos hemorrágicos observados localmente en el sitio de la mordedura y en algunos casos en las hemorragias a nivel sistémico, mientras que Loxolisina B es una proteasa de 32-35 kDa con actividad gelatinolítica, y aunque su función es aún desconocida, posiblemente participa en la degradación de colágena dentro de la matriz extracelular, sugiriendo que puede formar parte de los componentes dermonecróticos presentes en el veneno de *Loxosceles* (Feitosa *et al.*, 1998). Las acciones proteolíticas de la Loxolisina A son bloqueadas por 1,10-fenantrolina y EDTA. (Feitosa *et al.*, 1998).

Estas dos proteasas presentes en el veneno de *L. intermedia* y en analogía con el veneno de las especies estudiadas en este trabajo, quizá puedan contribuir de manera similar en los efectos producidos por la mordedura de la araña (Feitosa *et al.*, 1998).

En *L. intermedia* se encontraron tres isoformas (P1, P2 y P3) de la fracción necrotóxica, las cuales fueron altamente parecidas a nivel bioquímico e inmunológico (Tambourgi, 1998). P1 y P2 solamente están constituidas por una proteína, mientras que P3 la constituyen dos.

En cuanto al efecto necrotóxico de estas isoformas resultó que la P1 y la P2 fueron activas, siendo ésta última la que tiene mayor efecto. Por otro lado la P3 fue completamente inactiva.

El análisis de las secuencias aminoacídicas de las isoformas reveló una alta identidad entre éstas. También se compararon con las secuencias de otras especies de *Loxosceles* anteriormente reportadas, obteniendo un alto grado de similitud (Tambourgi, 1998).

b) Variación intraespecífica en el veneno de *L. intermedia*

Existe variación en los efectos de la mordedura de una hembra con respecto a la de un macho (De Oliveira *et al.*, 1999). El tamaño y el peso mayor de las hembras ha llevado a la conclusión de que éstas tienen una cantidad mayor de veneno con respecto a los machos y por tanto producen un loxoscelismo más grave (De Oliveira *et al.*, 1999).

Esta conclusión se contrapone a la de Smith y Micks (1968) quienes argumentaron que entre *L. reclusa*, *L. laeta* y *L. rufescens* no se presentan diferencias sexuales en términos de cantidad de veneno o efectos *in vivo* en relación a los sexos.

c) Comparación entre los venenos de algunas *Loxosceles*

En 1968 Smith y Micks demostraron que la inyección en conejos del veneno de *L. reclusa*, de *L. laeta* o de *L. rufescens*, producía reacciones necróticas similares. En recientes estudios se compararon las secuencias amino terminal de la esfingomielinasa del veneno de *L. reclusa*, *L. deserta*, *L. gaucho*, *L. intermedia* y *L. laeta* determinándose homología entre ellas (Figura 5) (Barbaro *et al.*, 1996B).

<i>L. reclusa</i>	A-NKRPVWIM	GHMVNAVYQI	DEFVNLGANS	IDTDVS----
<i>L. deserta</i>	A-NKRPVWIM	GHMVNAIYQI	DEFVNLGANS	IETDVS----
<i>L. gaucho</i>	ADNKRPIWVM	GGMVNSLAQI	KEFVGLGLDNSEKDNKWKYKQ	
<i>L. intermedia</i>	AGNKRPIWIM	GAMVNAIKDI	XDFVNLGANN	I---XK---
<i>L. laeta</i>	ADNRRPIWNL	GHMVNALKQI	PTFLXDGANA	-----

Figura 5. Alineación de las secuencias aminoacídicas del veneno de diferentes especies del género *Loxosceles*, partiendo del amino terminal (Tambourgi, D.V. 1998)

III. JUSTIFICACIÓN

- ◆ Hasta la fecha no se han realizado estudios bioquímicos ni toxicológicos de ninguna de las 39 especies del género *Loxosceles* que se encuentran distribuidas en México (Hoffman, 1976 ; Gerstch, 1983), por tanto, el realizar estudios de *Loxosceles boneti* arrojará la posible relación de la actividad tóxica del veneno con otras especies del mismo género. Por otro lado se realizará la comparación entre el veneno de *Loxosceles boneti* y *Loxosceles reclusa*. Ésta última es una especie norteamericana que ya ha sido estudiada.

Finalmente, los resultados obtenidos en esta tesis contribuirán a generar el conocimiento necesario para la producción de un antiveneno que neutralize el efecto del veneno del mayor número de especies de *Loxosceles*.

IV a. OBJETIVO GENERAL

- ◆ Comparar el veneno de *Loxosceles boneti* y *Loxosceles reclusa* a nivel bioquímico, inmunológico y toxicológico.

IV b. OBJETIVOS PARTICULARES

- ◆ La comparación intraespecífica del veneno de *Loxosceles boneti*.
- ◆ La búsqueda de isoformas de la necrotoxina de *Loxosceles boneti*.
- ◆ La comparación de secuencias aminoacídicas de las isoformas encontradas.

- ◆ La caracterización de la actividad dermonecrótica, en conejos, de las isoformas.
- ◆ La obtención de anticuerpos policlonales en conejo contra los venenos de ambas especies de *Loxosceles* y la observación de reacciones cruzadas, *in vitro* entre ambas.

V. MATERIAL Y METODOLOGÍA

V.1. ARAÑAS

Las arañas fueron colectadas por gente capacitada para el reconocimiento del género *Loxosceles*, en las Comunidades de *La Capilla* y *Corral de Toros*, Municipio de Iguala, que se encuentran en la parte centro del Estado de Guerrero. Por la distribución determinada por Hoffman, 1976 y Gerstch, 1983, se propuso que eran *Loxosceles boneti*. Para confirmar esto se mandaron 10 hembras y 10 machos al Museo de Historia Natural de New York con el Dr. Norman Platnick, quién las identificó como tales. Las *Loxosceles reclusa* fueron colectadas en Stillwater, Oklahoma por los Dres. G. Odell y A. Alagón, y el Biólogo Cipriano Balderas.

V.2. OBTENCIÓN DEL VENENO

Las glándulas de las arañas fueron extraídas mecánicamente, jalando los quelíceros para desprenderlas. Estas se colocaron en buffer acetato de amonio 20 mM pH 4.7 y se maceraron con un homogenizador de teflón (50 aparatos

venenosos por ml). Luego se centrifugaron dos minutos a 14,000 rpm con el fin de quitar residuos sólidos y restos celulares no deseados. Se almacenaron a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso. También se obtuvieron cantidades limitadas de veneno puro (diferente al extracto de glándulas descrito). Para ello se aprovechó el hecho de que algunas arañas expulsan, como resultado de la manipulación, pequeñas cantidades de veneno, las cuales fueron colectadas con tubos microcapilares.

V.3. PRUEBAS BIOQUÍMICAS

a) Cromatografía de exclusión molecular en gel

Con el fin de obtener distintas fracciones de la muestra de extracto de glándulas de *L. boneti* se utilizó éste método, el cual separa las proteínas en función de su tamaño. La columna que se utilizó mide 170 cm de largo por 1.4 cm de diámetro. Las moléculas que poseen la actividad dermonecrótica pesan 35 kDa aproximadamente, por lo que la resina seleccionada para empacar la columna fue Sephadex G-75 (SIGMA CHEMICAL CO.) debido a que su límite de exclusión es de 70 kDa. El buffer que de corrida fue acetato de amonio 20 mM, pH 4.7.

Según Scorpes, 1994, menciona que la velocidad de flujo de la columna debe ser entre $15\text{-}25\text{ ml h}^{-1}\text{ cm}^{-2}$. Tomando en cuenta que la columna utilizada tiene 2 cm de diámetro, entonces la velocidad de flujo ideal estará entre 30 y $50\text{ ml h}^{-1}\text{ cm}^{-2}$. La velocidad de flujo en el experimento fue de $48\text{ ml h}^{-1}\text{ cm}^{-2}$.

A la columna se aplicaron 72.56 mg de veneno (3.5 ml), medidos por absorbancia a 280 nm. Se colectaron muestras cada seis minutos de un volumen de 4.5 ml aproximadamente, las que se leyeron en el espectrofotómetro (Beckman DU650i) bajo dos longitudes de onda: 260 nm y 280 nm.

b) Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

El SDS-PAGE es un método para separar proteínas. La separación depende de su tamaño y de la carga eléctrica negativa, dada por el SDS, cuando se colocan en un campo eléctrico (Laemmli, 1970). El principio de la separación radica en que el SDS se une a las proteínas en relación directa a su peso molecular, de tal manera que la migración relativa hacia el ánodo, al estar uniformemente cargadas, es inversamente proporcional a su masa.

La separación de las proteínas de los venenos se realizaron en geles de poliacrilamida al 12.5%, en condiciones reductoras, a corriente constante.

El equipo utilizado para este método fue el Mini Protean III (BIO-RAD). Para cada muestra sometida a electroforesis se utilizaron distintas concentraciones, excepto en la comparación intraespecífica del veneno *Loxosceles boneti* donde se utilizó el criterio de normalización de proteínas llamado el método del ácido binciconínico (BCA, Pierce), colocándose para todas las muestras el mismo volumen y concentración (30 µg).

Para las condiciones reductoras se utilizó 2-betamercaptoetanol a una concentración final de 2.5 %.

Los marcadores de peso molecular preteñidos (BioLabs, Inc.) se usaron como estándares de peso molecular.

La formulación de los geles se hizo de la siguiente manera (la preparación de cada uno de los componentes se menciona en el apéndice anexo).

GEL SEPARADOR AL 12.5 %

- * Solución Amortiguadora de abajo (ml) 1.5
- * Solución de acrilamida (ml) 2.5
- * Agua desionizada (ml) 2.0
- * TEMED (μ l) 5
- * Persulfato de amonio al 10% (μ l) 20

**GEL ESPACIADOR-
CONCENTRADOR 4 %**

- * Solución amortiguadora de Arriba (ml) 0.630
- * Solución de acrilamida (ml) 0.33
- * Agua desionizada (ml) 1.54
- * TEMED (μ l) 2.5
- * Persulfato de amonio al 10 % (μ l) 12.5

Todas las muestras se desnaturalizaron en agua hirviendo durante cinco minutos, incluyendo al marcador de peso molecular. Estas se corrieron a una corriente constante de 15 mA, hasta que el colorante penetró en el gel separador; posteriormente se incrementó a 20-25 mA. Una vez terminada la corrida del gel se procedió a llevar a cabo la tinción con azul Brillante de Coomassie durante una hora y se destiñó con una solución de ácido acético 10% y metanol 25% durante toda la noche con agitación constante.

c) Cromatografía de intercambio iónico (FPLC)

La cromatografía de intercambio iónico o de alta resolución se realiza sobre una matriz de material insoluble que posee grupos cargados y iones móviles de carga contraria. Estos últimos pueden ser intercambiados reversiblemente por otros iones de la misma carga, sin propiciar algún cambio en la matriz insoluble. La columna que se utilizó fue del tipo Mono S HR 5/5 (Pharmacia LKB Biotech) que es un intercambiador catiónico fuerte, basado en resinas hidrofílicas. Ésta columna mide 5 cm de largo por 0.5 cm de diámetro. El tamaño de las partículas de la columna Mono S HR 5/5 es de 10 μm . Los grupos cargados de la resina son metil sulfonatos ($-\text{CH}_2-\text{SO}_3^-$) La capacidad iónica del gel es de 0.14-0.18 mmol/columna. La capacidad de pegado de proteínas está en el rango de 20-50 mg/ml. El flujo utilizado para las corridas fue de 1ml/min. Los buffers utilizados fueron los siguientes.

Fase móvil: Buffer A-Acetato de amonio 20 mM pH 4.7.

Buffer de elución: Buffer B-Acetato de amonio 20 mM pH 4.7 + 2 M cloruro de sodio, filtrado.

Ambos buffers (filtrados con membrana de 0.22 micras) se corrieron para calibrar la columna, de la siguiente manera (según especificaciones del distribuidor):

1. La columna se lavó con 5 volúmenes (5 ml) del buffer A
2. Se cambió al buffer B y se lavó con 10 volúmenes (10 ml).
3. Por último ésta se equilibró con el buffer A, hasta que la línea base se mantuvo estable.

Una vez que la columna estaba equilibrada se procedió a inyectar la muestra. Ésta previamente fue centrifugada durante dos minutos a 14,000 rpm, con el fin de clarificar (quitar residuos y/o precipitados).

La muestra analizada fue la fracción II de extracto de glándulas de *Loxosceles boneti*, obtenida de la cromatografía en gel hecha anteriormente. La concentración total fue de 798 µg en 3.5 ml de acetato de amonio 20 mM pH 4.7. La cromatografía de intercambio iónico se llevo a cabo con el siguiente programa:

0.0	Ualve . Pos	1.1
0.0	Conc % B	0.0
0.0	ml/min	1.0
1.5	Ualve. Pos	1.2
7.5	Conc % B	0.0
7.6	Ualve. Pos	1.1
37.5	Conc % B	25.0
38.5	Conc % B	100
43.5	Conc % B	100
44.5	Conc % B	0
60.0	Conc % B	0

La sensibilidad fue de 0.2 AU, la velocidad de flujo fue de 1ml/min y el gradiente fue de 0 a 2 M cloruro de sodio.

d) Secuenciación por el método de Edman

Los productos obtenidos por cromatografía de intercambio catiónico se secaron por centrifugación en SAVANT. Luego se secuenciaron en un equipo automatizado Beckman LF3000, utilizando la química de Edman (Walsh *et al.* 1981).

V.4. PRUEBAS DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

a) Ensayo para determinar actividad de fosfolipasa tipo A₁ y A₂

El método que se utilizó fue rodamina-yema de huevo incluídos en el gel de agarosa siguiendo el protocolo de Habermann, 1972, con algunas modificaciones.

A continuación se muestran los protocolos que se utilizaron para preparar la placa de rodamina.

SEPARACIÓN DE LA YEMA DE HUEVO PARA LAS PLACAS DE RODAMINA

- * Obtener una yema de huevo lo más limpia posible
- * Se pesa y se diluye en 0.1 M Tris-HCl pH 7.95 con 5 mM cloruro de calcio y 0.5 % de Tritón X-100, para dar una porcentaje final del 20 %
- * Se homogeniza con ayuda de un agitador magnético durante 10 minutos y se centrifuga a baja velocidad (1500 rpm durante cinco minutos)
- * Finalmente se toma el sobrenadante

PREPARACIÓN DE LA PLACA RODAMINA-YEMA DE HUEVO

- * Fundir 0.1 g de agarosa en 10 ml de buffer Tris-HCl 0.2 M a pH 7.95
- * A esto se le agrega 1 ml de cloruro de calcio 10 mM
- * Se preparan 50 ml de rodamina 6G al 0.1%. Se pasa a través de un filtro de 0.22 µm
- * Se adicionan 100 µl de Tritón X-100 para finalmente,
- * Adicionarle 2 ml de "yema de huevo"

Una vez que se llevó a cabo la mezcla indicada, se adicionó en una caja Petri y se esperó a que gelificará para proceder a formar pozos en los que se aplicaron las muestras. Como control positivo se utilizó veneno de *Heloderma horridum horridum* ya que éste es rico en fosfolipasas de tipo A₂ (Alagón, 1982). Para el caso de éste se hicieron cuatro diluciones seriadas (1:2), partiendo de 50 µg. Como control negativo se usó acetato de amonio 20 mM pH 4.7. Las muestras de veneno puro tanto para *Loxosceles boneti* como para *Loxosceles reclusa* fueron estandarizadas a 10 µg por BCA, Pierce (Figura 5).

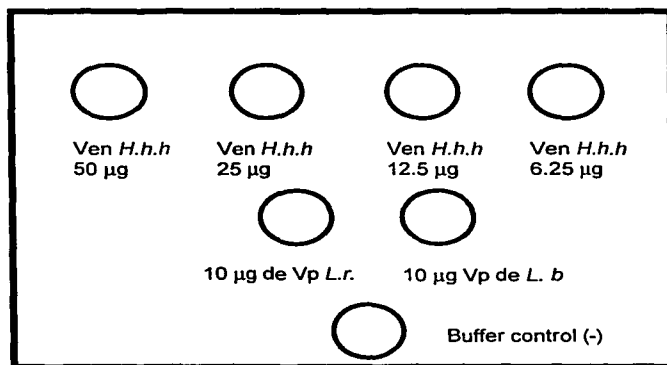


Figura 6. Esquema del ensayo de fosfolipasas. Entiéndase como Ven *H.h.h* veneno de *Heloderma horridum horridum*; Vp *L.r.*, Veneno puro de *L. reclusa*; Vp *L.b.*, Veneno puro de *L. boneti*; Buffer control (-), como acetato de amonio 20 mM pH 4.7.

b) Actividad de hialuronidasa

La actividad de hialuronidasa fue detectada por el método de Cevallos et al. (1992). El método consiste en la separación electroforética del veneno en un gel de poliacrilamida que tiene incluido hialuronato (0.5 mg/ml). Las muestras examinadas para *L. reclusa* fueron: cuatro diluciones seriadas desde 0.5 hasta 10 µg; 1 y 5 µg de extracto de glándulas. Para el caso de *L. boneti* sólo se utilizó extracto de glándulas en las siguientes concentraciones: 1 y 5 µg. Finalmente se usaron 10 µg de hemolinfa de la especie *L. boneti* como control negativo. Todas las muestras fueron mezcladas con buffer de muestra sin reductores y sin calentar.

Una vez que se llevó a cabo la electroforesis, el gel se sometió a varios lavados con el fin de reactivar nuevamente a la enzima:

1. Dos veces en 50 ml de buffer 0.1 M fosfato de sodio a un pH de 5.8 con 0.15 M de cloruro de sodio en presencia de 5 % de Tritón X-100. El tiempo por cada lavado fue de una hora.



2. El siguiente lavado se llevó a cabo una sola vez en 50 ml de buffer 0.1 M fosfato de sodio a un pH de 5.8 con 0.15 M de cloruro de sodio en presencia de 0.05 % de Tritón X-100. El tiempo estimado de lavado fue de una hora.



3. Finalmente se lavó en 50 ml de buffer 0.1 M fosfato de sodio a un pH de 5.8 con 0.15 M de cloruro de sodio, durante diez minutos.

Después del último lavado se dejó en una cámara húmeda cerrada durante dos horas. Posterior a la incubación el gel se tiñó de la siguiente manera:

Se lavó dos veces en 50 ml de buffer 0.015 M Tris-HCl, pH 7.95, durante 15 minutos



Una vez concluidos los lavados se procedió a teñir el gel con una solución de Stain -all (la preparación de esta solución se encuentra en el apéndice anexo de soluciones), durante toda la noche sin exposición a la luz



Después el gel se destiñó con la solución correspondiente (mostrada en el apéndice anexo de soluciones) hasta que las bandas claras fueron vistas

V.5. ENSAYOS INMUNOLÓGICOS

a) Inmunización

Dentro de la metodología inmunológica, se inmunizaron a cuatro conejos:

a) dos con extracto de glándulas de *Loxosceles boneti* y b) dos de *Loxosceles reclusa*.

a) Grupo de conejos correspondientes a *L. boneti*.

Se llevaron a cabo 13 inmunizaciones. En las diez primeras se administró extracto de glándulas de *L. boneti*, en las inoculaciones restantes se administró la fracción II, obtenida de la cromatografía de exclusión molecular en gel.

En la Tabla 3 se ilustra el esquema de inmunización para el grupo de conejos correspondientes a *L. boneti*.

Tabla 3. Esquema de Inmunización administrado al grupo de conejos correspondientes a *L. boneti*.

No. DE INMUNIZACIÓN	FECHA	No. DE CONEJOS	CANTIDAD DE VENENO (μ g)	PBS (ml)	ADYUVANTE (ml-tipo)
1	17-I-2001	DOS	20 μ g del ex. de glándula	1	1.1-completo
2	24-I-2001	DOS	20 μ g del ex. de glándula	1	1.1-incompleto
3	01-II-2001	DOS	30 μ g del ex. de glándula	1	1.1-incompleto
4	07-II-2001	DOS	50 μ g del ex. de glándula	1	1.1-incompleto
5	14-II-2001	DOS	100 μ g del ex. de glándula	1	1.1-incompleto
6	21-II-2001	DOS	100 μ g del ex. de glándula	1	1.1-incompleto
7	02-III-2001	DOS	150 μ g del ex. de glándula	1	1.1-incompleto
8	08-III-2001	DOS	250 μ g del ex. de glándula	1	1.1-incompleto
9	20-III-2001	DOS	250 μ g del ex. de glándula	1	1.1-incompleto
10	05-IV-2001	DOS	60 μ g de la Fil del veneno de <i>L. boneti</i> que equivalen a 300 μ g del ex. de glándula	1	1.1-incompleto
11	20-IV-2001	DOS	80 μ g de la Fil del veneno de <i>L. boneti</i> que equivalen a 400 μ g del ex. de glándula	1	1.1-incompleto
12	08-V-2001	DOS	100 μ g de la Fil del veneno de <i>L. boneti</i> que equivalen a 500 μ g del ex. de glándula	1	1.1-incompleto
13	24-V-2001	DOS	100 μ g de la Fil del veneno de <i>L. boneti</i> que a 500 μ g del ex. de glándula	1	1.1-incompleto

b) Grupo de conejos correspondientes a *L. reclusa*

Se llevaron a cabo 13 inmunizaciones con veneno puro de *L. reclusa*. En el esquema de inmunización (Tabla 4) se muestran las cantidades administradas.

Tabla 4. Esquema de inmunización administrado al grupo de conejos correspondientes a *L. boneti*.

No. DE INOCULACIÓN	FECHA	No. DE CONEJOS	CANTIDAD DE VENENO (μg)	PBS (ml)	ADYUVANTE (ml-tipo)
1	17-I-2001	DOS	20 μg de veneno puro	1	1.1-completo
2	24-I-2001	DOS	20 μg de veneno puro	1	1.1-incompleto
3	01-II-2001	DOS	30 μg de veneno puro	1	1.1-incompleto
4	07-II-2001	DOS	50 μg de veneno puro	1	1.1-incompleto
5	14-II-2001	DOS	100 μg de veneno puro	1	1.1-incompleto
6	21-II-2001	DOS	100 μg de veneno puro	1	1.1-incompleto
7	02-III-2001	DOS	150 μg de veneno puro	1	1.1-incompleto
8	08-III-2001	DOS (muerte de un conejo)	250 μg de veneno puro	1	1.1-incompleto
9	20-III-2001	UNO	250 μg de veneno puro	1	1.1-incompleto
10	05-IV-2001	UNO	60 μg de necrotoxina que corresponden a 88.2 μg de veneno puro de <i>L. reclusa</i>	1	1.1-incompleto
11	20-IV-2001	UNO	80 μg de necrotoxina que corresponden a 117.6 μg de veneno puro de <i>L. reclusa</i>	1	1.1-incompleto
12	08-V-2001	UNO	100 μg de necrotoxina que corresponden a 147 μg de veneno puro de <i>L. reclusa</i>	1	1.1-incompleto
13	24-V-2001	UNO	100 μg de necrotoxina que corresponden a 147 μg de veneno puro de <i>L. reclusa</i>	1	1.1-incompleto

Para inocular la misma cantidad de necrotoxina tanto de *L. boneti* como de *L. reclusa* se llevaron a cabo cálculos correspondientes para obtener las equivalencias de esfingomielinasas presentes en el veneno.

En la primera inoculación se inyectó con adyuvante completo de Freund (Rockland) para desarrollar la respuesta inmunológica del conejo; las siguientes fueron con adyuvante incompleto. Los volúmenes de inoculaciones fueron:

cantidad de veneno (μg) en 1 ml de PBS. La relación de PBS con el adyuvante es 1:1.

b) Medición de títulos por ELISA de los sueros y determinación de reacciones cruzadas *in vitro*

La titulación de los anticuerpos a partir de sueros se llevó a cabo por Inmunoensayos enzimáticos (ELISA de sus siglas inglés Enzyme Linked Immuno Assay). Éste ensayo también fue utilizado para observar posibles reacciones cruzadas.

La técnica se basa en la interacción antígeno-anticuerpo. La interacción es detectada por un conjugado compuesto de un anticuerpo unido covalentemente a una enzima que permite generar una señal colorida (Roitt, 2001). Los títulos fueron definidos como la dilución del suero hiperinmune en la cual se encuentra la mitad de la absorbancia máxima.

La prueba de ELISA según González, 1997 consistió en:

1. Sensibilizar placas de 96 pozos para ELISA (NUNCTM Brand products) con una solución de antígeno a una concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, reconstituída en 100 mM carbonato/bicarbonato pH 9.5.

Por cada pozo se colocaron 100 μl hasta la columna 11, ya que el carril 12 fungió como control negativo. La placa se incubó toda la noche a 4 °C.

2. Una vez concluida la incubación, se lavó tres veces con 200 μ l de solución de lavado. Se tuvo que repetir este proceso cada vez que se pasaba al siguiente paso a lo largo de toda la técnica.
3. Posteriormente se bloquearon las uniones inespecíficas con 200 μ l de solución de bloqueo, durante 2 horas a 37 °C.
4. Repetición del paso 2.
5. Se hicieron diluciones seriadas de los sueros con una dilución inicial de 1:30 en buffer de reacción para ELISA (señalada en el apéndice correspondiente). En cada pozo se adicionaron 100 μ l de la solución de reacción para ELISA y se mezclaron 50 μ l/pozo de la dilución del veneno en la columna 1, para proceder a las diluciones seriadas hasta la columna 10 dejando la 11 y 12 como controles. Se incubó por una hora a temperatura ambiente.
6. Se repite el paso 2.
7. Después se incubó el segundo anticuerpo anticonejo conjugado a la enzima peroxidasa diluido 1:1000 en solución de reacción para ELISA, poniendo 100 μ l/pozo. El tiempo de incubación fue de 1 hora a temperatura ambiente.
8. La reacción se reveló con 100 μ l/pozo de sustrato ABTS (Boehringer), incubándose por 5 minutos a temperatura ambiente. Después de cinco minutos la reacción se detuvo con 25 μ l de ácido fluorhídrico (Aldrich) y se

procedió a leer la placa en un lector de ELISA (modelo BIO-RAD 550) a 405 nm.

NOTA: Todas las soluciones utilizadas para este ensayo se encuentra en el apéndice de reactivos.

Para determinar los títulos de las lecturas obtenidas, las curvas sigmoideas fueron generadas con el programa GraphPad Prism (Versión 2; GraphPad Software, Inc, San Diego, CA). El punto de inflexión se calculó ajustando los datos experimentales para cada veneno y cada antiveneno por regresión no-lineal de las curvas sigmoides .

c) Pruebas de Western-blot.

Esta es una técnica que se utiliza para identificar en una mezcla a proteínas o fragmentos de éstas, que reaccionan con un determinado anticuerpo.

Los Western-Blot se hicieron según el protocolo de Mathews y Holde (1998).

Se prepararon geles de poliacrilamida al 12.5% que se corrieron de manera acostumbrada para separar los componentes proteicos de los venenos de *L. boneti* y *L. reclusa*. La cantidad de veneno utilizada para cada ensayo fue de 30 µg por carril. Una vez terminada la corrida de los geles se realizó la transferencia durante una hora a corriente constante (400 mA) a una membrana de nitrocelulosa (soporte sólido). Para ésto se utilizó una cámara de transferencia bajo condición semihúmeda (OWL). Una vez terminada la transferencia la membrana se bloqueo durante toda la noche con agitación

constante a temperatura ambiente en una solución al 5 % de leche descremada/TBST, para impedir el pegado inespecífico de los anticuerpos. Pasado este tiempo se procedió a lavar las membranas tres veces con TBST 1X (diez minutos cada lavado). Posteriormente se incubó con el primer anticuerpo en 0.1% de leche descremada en polvo (Carnation o Svelty/TBST) con agitación constante a temperatura ambiente por una hora (se diluyó de acuerdo al título del anticuerpo). Las diluciones utilizadas en este ensayo fueron tres como se refiere la Tabla 5.

Tabla 5. Diluciones utilizadas para las pruebas de Western-blots

Fuente	Sueros de conejos contra Veneno puro de <i>Loxosceles reclusa</i> o Extracto de glándulas o Fil de <i>Loxosceles boneti</i>	Dilución utilizada del primer anticuerpo
Conejo/C42	Veneno puro de <i>L. reclusa</i>	1:1000, 1:2500 y 1:5000
Conejo/C44	Extra. de glánd de <i>L. boneti</i>	1:1000, 1:2500 y 1:5000
Conejo/C45	Extra. de glánd de <i>L. boneti</i>	1:1000, 1:2500 y 1:5000

Concluida la incubación se continuó con tres lavados de diez minutos con TBST 1X cada uno. Se procedió a incubar una hora a temperatura ambiente y con agitación constante con el segundo anticuerpo en 0.1% de leche descremada/TBST. Se utilizó un anticuerpo anti-conejo acoplado a fosfatasa alcalina (ZYMED).

Pasada la hora de incubación, se lavó tres veces por diez minutos con TBST, se eliminó el TBST del último lavado y se agregó el buffer de reacción NTB-BCIP el cual se dejó reaccionar durante cinco minutos.

d) Inmunodifusiones

La técnica consiste en observar una reacción de precipitación de uno o varios antígenos con un anticuerpo determinado en un soporte de agarosa (Roitt, 2001).

En la técnica de inmunodifusiones doble se vertió agarosa sobre la superficie de una lámina de acetato dejándose solidificar. A continuación se hicieron pocillos sobre la lámina guardando la misma distancia entre cada uno. A determinado pozo se le añadió un anticuerpo (Ab) y a los demás pozos un antígeno (Ag). Se incubaron toda la noche a temperatura ambiente y pasando este tiempo se procedió a remover el exceso de proteínas secando y lavando la placa tres veces de la manera siguiente (la solución de lavado viene indicada en el apéndice de soluciones): sobre la placa de inmunodifusión se colocaron en el siguiente orden: papel filtro, toalla, un vidrio y algo pesado que haga presión sobre la placa; se dejó secándose durante 10 minutos. Una vez transcurrido el tiempo, la placa se sumergió en solución de lavado durante diez minutos. La operación se repitió tres veces. Después, se dejó la placa de inmunodifusión a temperatura ambiente hasta que la agarosa adquiría una apariencia translúcida y se tñió con negro de amido.

Los muestras a examinar fueron las siguientes:

Sueros: 42 vs *L. reclusa* 10 µg
 44 vs *L. boneti* 10 µg
 45 vs *L. boneti* 10 µg

Isoenzimas: I \equiv 10 μ g
II \equiv 10 μ g
III \equiv 10 μ g

Venenos: puro *L. reclusa* (VL.r.) : \equiv 10 μ g
extracto de glándulas *L. reclusa* (E L.r.) \equiv 10 μ g
extracto de glándulas *L. boneti* (E. L.b.) \equiv 10 μ g
hemolinfa *L. boneti* (Hemo) \equiv 10 μ g

Los volúmenes aplicados para cada muestra fueron 10 μ l.

V.6. PRUEBAS TOXINOLÓGICAS

a) Dermatonecrosis en conejos

La actividad dermonecrotica fue evaluada en conejos y fue determinada como la describió Furlanetto *et al.* (1962a, b).

Se utilizaron distintas concentraciones del veneno que se diluyeron en 0.2 ml de buffer PBS pH 7.4 o en 0.2 ml de acetato de amonio 20 mM pH 4.7. Éstas se inyectaron intradérmicamente en el lomo de dos conejos (Figura 7).

También se hicieron estas mismas pruebas con las isoformas que se obtuvieron por FPLC. Para cada isoforma encontrada se aplicaron distintas concentraciones (Figura 8).

El peso del conejo 1 fue de 3.2 kg y el del conejo 2 fue de 3.5 kg.

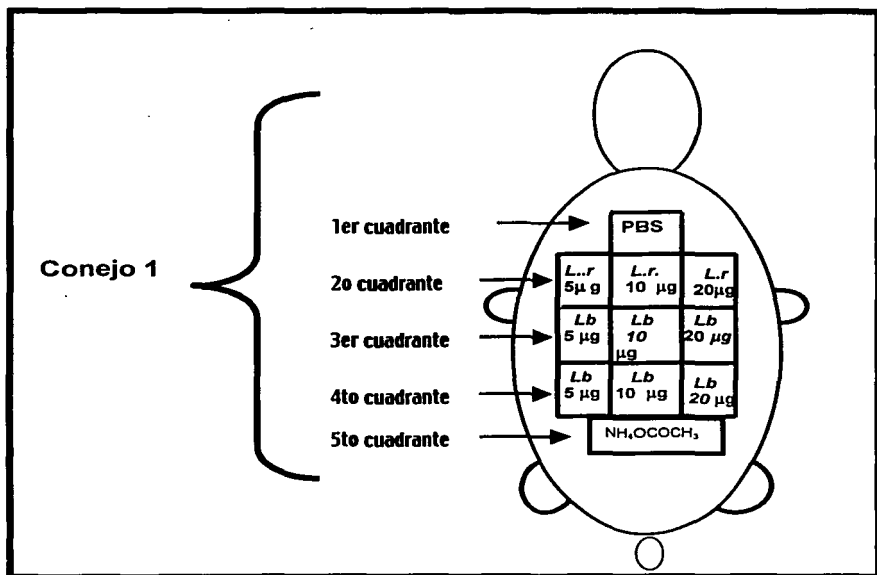


Figura 7. Dosis administradas para la prueba de dermonecrosis. El conejo pesó 3.2 kg aproximadamente. En el primer cuadrante se administró PBS (control negativo), en el segundo cuadrante Veneno puro de *L. reclusa*: 5, 10 y 20 µg en acetato de amonio 20 mM pH 4.7, en el tercer cuadrante Veneno puro de *L. boneti*: 5, 10 y 20 µg en acetato de amonio 20 mM pH 4.7. Para el caso del cuarto cuadrante se administró Veneno puro de *Loxosceles boneti*: 5, 10 y 20 µg en PBS pH 7.4. Finalmente en el quinto cuadrante se inyectó acetato de amonio 20 mM pH 4.7 (control negativo). En todos los casos el volumen administrado fue de 200 µl.

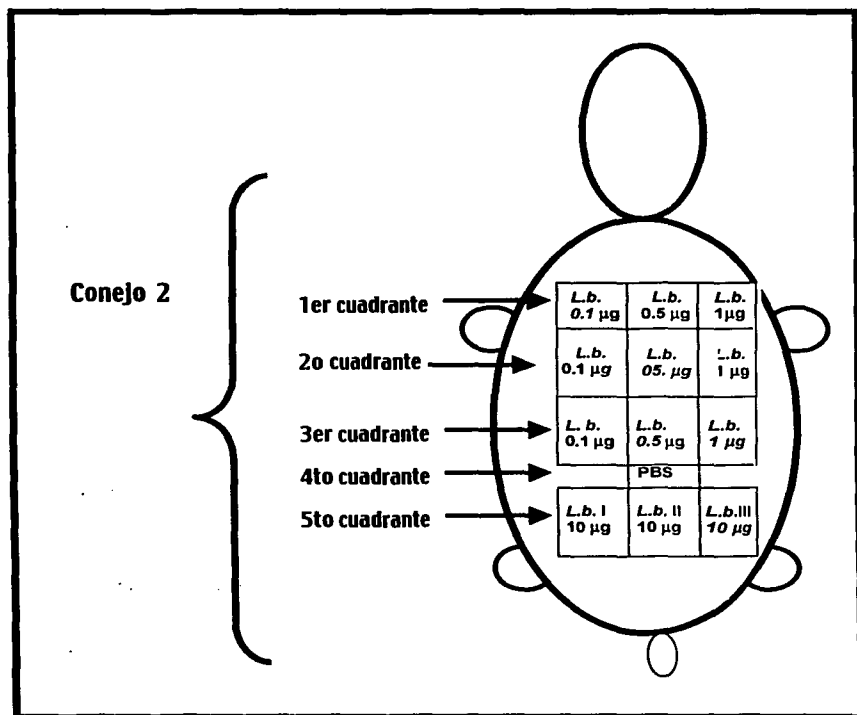


Figura 8. Dosis administradas para la prueba de demonecrosis. El conejo pesó 3.5 kg. En el primer cuadrante se administró la isoforma I de *L. boneti*: 0.1, 0.5 y 1 μ g; en el segundo cuadrante se administró la isoforma II de *L. boneti*: 0.1, 0.5 y 1 μ g en el tercer cuadrante correspondió a la Isoforma III de *L. boneti*: 0.1, 0.5 y 1 μ g. En el cuarto cuadrante se administró PBS pH 7.4 como control negativo. Por último se administraron 10 μ g de cada isoforma en un cuadrante correspondiente. El buffer para cada muestra fue PBS pH 7.4 y el volumen de 200 μ l.

El seguimiento se hizo durante tres semanas.

VI. RESULTADOS

VI.1. Caracterización bioquímica del veneno de *L. boneti*

a) Cromatografía de exclusión molecular en gel

El extracto de 500 glándulas de *L. boneti* equivalente a 72.56 mg (medidos por absorbancia a 280 nm) fueron liofilizados y reconstituídos en acetato de amonio 20 mM pH 4.7. Al reconstituir la muestra se observó un precipitado, por lo que ésta se centrifugó a 14,000 rpm por dos minutos. El **pellet** obtenido al igual que el sobrenadante fueron analizados por SDS-PAGE en condiciones reductoras (Figura 10). El sobrenadante fue separado mediante cromatografía de exclusión molecular en gel. Cada muestra colectada contenía un volumen de 4.5 ml aproximadamente y éstas se leyeron a una absorbancia de 260 nm y 280 nm. Debido al patrón obtenido se decidió separar las muestras en cuatro fracciones principales las cuales se indican en el cromatograma de la Figura 9.

Para cada una de las fracciones obtenidas de la filtración de exclusión molecular en gel se hizo un pool. Éstas se analizaron en un gel de poliacrilamida al 12.5% bajo condiciones reductoras (Figura 10), con el objetivo de determinar que componentes constituían a cada fracción.

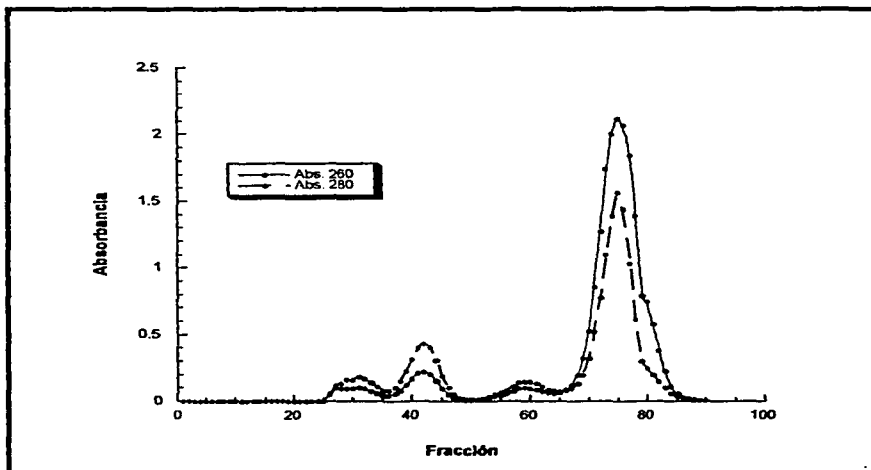


Figura 9. Cromatograma de la filtración de exclusión molecular en gel (Sephadex G-75) del extracto de glándulas de *L. boneti*. Los números romanos corresponden a las distintas fracciones obtenidas. La línea roja corresponde a la absorbancia a 260 nm y la azul a 280 nm.

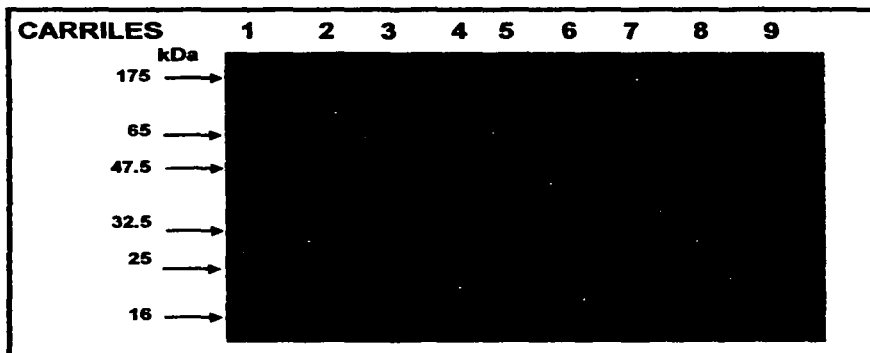


Figura 10. Análisis mediante SDS-PAGE de las fracciones obtenidas por cromatografía en gel. 1) MPM. 2) Fracción I (2.24 μg). 3) Fracción II (3.84 μg). 4) Fracción III (1.44 μg). 5) Fracción IV (8 μg). 6) Sobrenadante de extracto después de liofilizar (28 μg). 7 y 8) Pellet de extracto después de liofilizar (10 y 15 μl respectivamente). 9) Extracto de glándulas antes de liofilizar (8.1 μg).

Se observó que la fracción II contenía a la proteína de aproximadamente 35 kDa que pudiera corresponder a la necrotoxina de *L. boneti*.

b) Caracterización de la Fracción II por Cromatografía de Intercambio iónico o FPLC

Basándonos en lo reportado anteriormente, donde se proponen cuatro isoformas de la necrotóxina para el caso de *L. reclusa* (Ownby, 1990) al igual que tres isoformas para el caso de *Loxosceles intermedia* (Tambourgi, 1998), se decidió buscar las posibles isoformas de la necrotóxina del veneno de *L. boneti*. Para ésto, la fracción II del extracto de glándulas de *L. boneti* obtenida de la filtración de exclusión molecular en gel se cromatografió por intercambio catiónico; se disolvieron 798 µg en 3.5 ml de acetato de amonio 20 mM pH 4.7 y éstos se inyectaron a una columna Mono S (5 cm x 0.5 cm). Se obtuvieron tres picos mayoritarios, como se puede observar en la Figura 11, que correspondieron a las isoformas. También se presentan dos picos minoritarios de baja resolución (indicados con flechas).

Se leyó la absorbancia de cada pico a 280 nm .

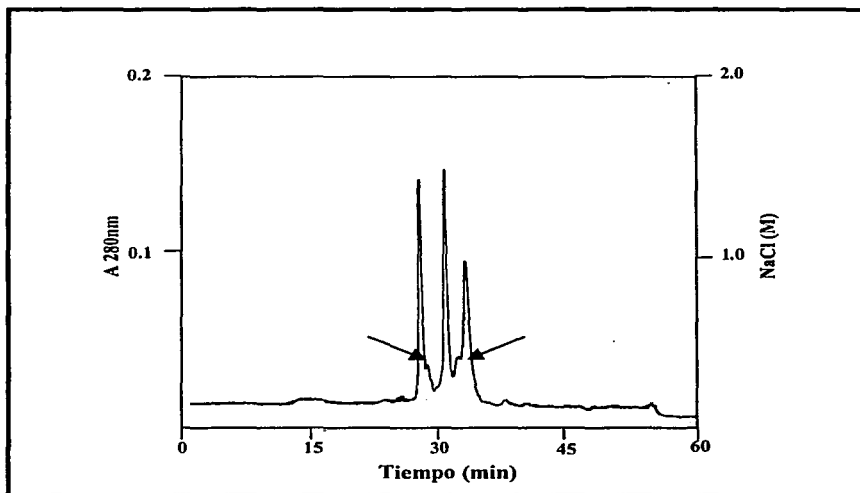


Figura 11. Resultado de la Cromatografía de Intercambio catiónico de la FII de *L. boneti*. Cada pico representa una isoforma. Las flechas señalan otras posibles isoformas que se encuentran en menor cantidad dentro de la fracción II. La columna fue de tipo Mono S. La columna midió 5 cm de largo por 0.5 cm de diámetro. La velocidad de flujo fue de 1ml/min. La sensibilidad fue 0.2 AU. El buffer utilizado fue acetato de amonio 20 mM pH 4.7, utilizando un gradiente de 0-2 M NaCl. La velocidad de graficación fue de 15cm/hr.

Una vez que se obtuvieron los picos purificados, se corrieron en un gel de poliacrilamida al 12.5% en condiciones reductoras y no reductoras.

En condiciones reductoras la distancia migrada de mayor a menor fue III, II y I sin embargo en ausencia de 2-betamerceptoetanol la distancia migrada de mayor a menor fue II, I y III (Figura 12).

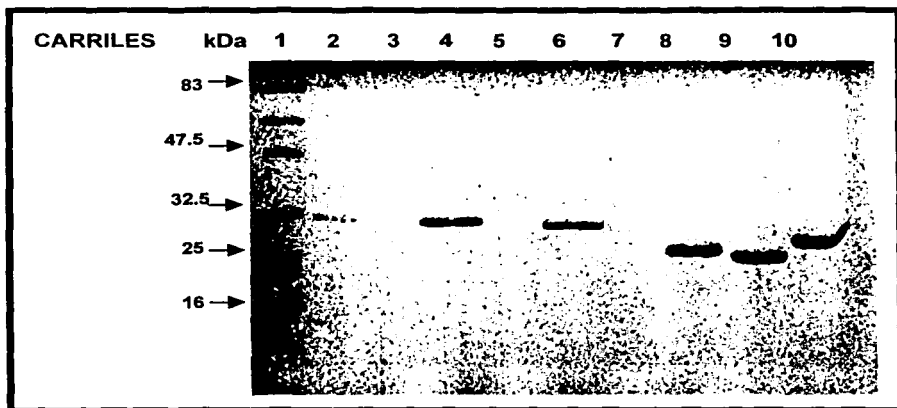


Figura 12. Análisis electroforético de las distintas isoformas encontradas en la FII de *L. boneti*. 1) MPM. 2) Isoenzima I. 4) Isoenzima II. 6) Isoenzima III. 8) Isoenzima I. 9) Isoenzima II. 10) Isoenzima III. Del carril 2 al 6 la electroforesis se llevo a cabo bajo condiciones reductoras y del carril 8 al 10 la electroforesis se llevo a cabo en condiciones no reductoras.

c) Comparación de las isoformas a nivel de secuencia amino terminal.

La secuenciación fue realizada por el Dr. Fernando Zamudio en el laboratorio del Dr. Lourival Posanni en el Instituto de Biotecnología, UNAM.

Cuando se obtuvieron los primeros 33 aminoácidos del extremo amino terminal de las isoformas I y II se procedió a hacer la alineación, incluyéndose las secuencias ya reportadas de otras *Loxosceles* norteamericanas. De la isoforma III sólo se pudo secuenciar hasta el aminoácido 23, y ésta también se incluyó en el alineamiento.

		% de similitud <i>Loxosceles</i>			
		<i>deserta</i>	<i>boneti</i> I	<i>reclusa</i>	<i>boneti</i> II
% de identidad	L. <i>deserta</i>	----	100.0	100.0	94.3
	L. <i>boneti</i> I	94.3	----	100.0	94.3
	L. <i>reclusa</i>	91.4	91.4	----	94.3
	L. <i>boneti</i> II	88.9	94.6	91.7	----

Figura 14. Matriz de distancia de las *Loxosceles* norteamericanas

d) Medición de actividad de hialuronidasa

Para determinar la actividad enzimática de hialuronidasa se probaron cuatro muestras, en varias cantidades, integradas por: extracto de glándulas de *L. boneti*, hemolinfa de *L. boneti*, extracto de glándulas de *L. reclusa* y veneno puro de *L. reclusa* (Figura 15-panel A).

Como control positivo se utilizó veneno de tarántula *Brachypelma vagans* porque se sabe que es rica en esta actividad (Savel-Niemann, 1989). La actividad de la enzima de ésta araña se ha detectado desde 0.06 µg, hasta 2 µg (Cevallos, *et al.*, 1992). Se administraron 0.14 µg de veneno de *B. vagans* en diluciones seriadas 1:2. La banda de digestión se observó a los 47.5 kDa aproximadamente, lo cual corresponde al peso molecular de las hialuronidasas (Figura 15-panel B).

El control positivo no se incluye en el panel A.

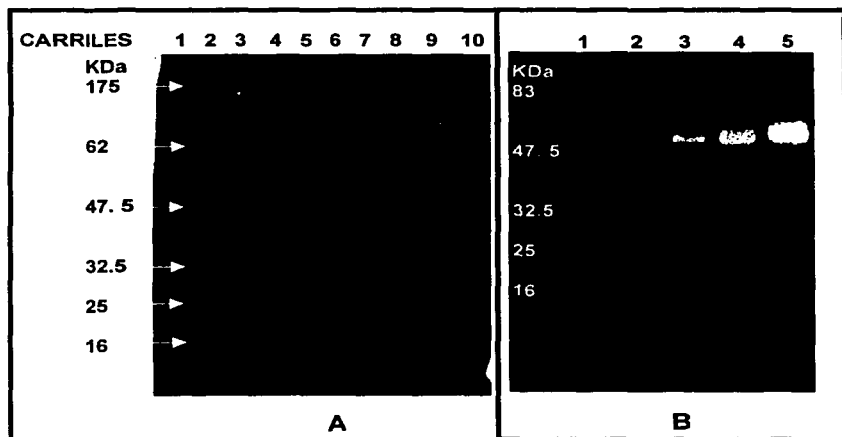


Figura 15. La actividad de hialuronidasas fue detectada mediante SDS-PAGE, utilizando como sustrato la matriz del gel. **A:** 1)MPM 2) Veneno puro de *L. reclusa* 10 μ g. 3) Veneno puro de *L. reclusa* 5 μ g. 4) Veneno puro de *L. reclusa* 1 μ g. 5) Veneno puro de *L. reclusa* 0.5 μ g. 6) Extracto de glándulas de *L. reclusa* 5 μ g. 7) Extracto de glándulas de *L. reclusa* 1 μ g. 8) Extracto de glándulas de *L. boneti* 5 μ g. 9) Extracto de glándulas de *L. boneti* 1 μ g. 10) Hemolinfa 10 μ g. **B:** 1)MPM 2) 0.017 μ g de veneno puro de *B. vagans* 3) 0.035 μ g de veneno puro de *B. vagans* 4) 0.07 μ g de veneno puro de *B. vagans* 5) 0.14 μ g de veneno puro de *B. vagans*

El ensayo no mostró la banda de digestión esperada para la actividad de hialuronidasa.

e) Medición de la actividad de fosfolipasa tipo A

Se sabe que la necrotoxina del veneno de *Loxosceles* es una fosfolipasa de tipo D (Ownby, 1990). Para evaluar si estaban presentes otro tipo de fosfolipasas, como la A_1 y A_2 , en el veneno de *Loxosceles*, se recurrió al ensayo de rodamina-yema de huevo el cual detecta la actividad de fosfolipasas de tipo A (Habermann, 1972). Con las cantidades utilizadas de veneno puro de ambas especies no se observó actividad de fosfolipasa tipo A.

VI.2. Comparación intraespecífica del veneno de *Loxosceles boneti*

El objetivo de éste experimento fue determinar si variaba, a nivel cualitativo, el veneno de *L. boneti* entre hembra y macho. Como se puede observar en el gel (Figura 16) no se observó ninguna diferencia, al menos cualitativamente, en el patrón protéico entre hembras y machos de esta especie.

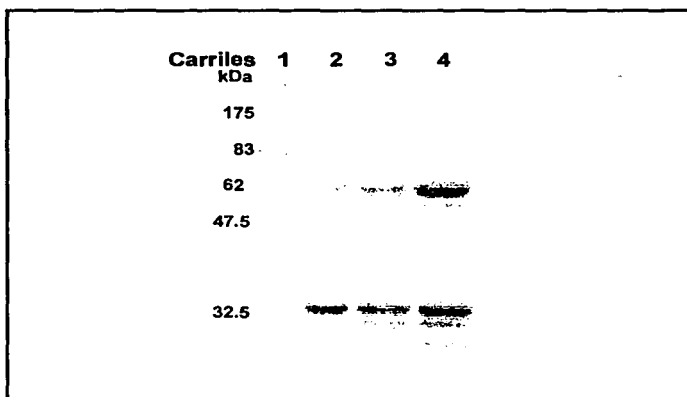


Figura 16. Comparación intraespecífica del extracto de glándulas de *Loxosceles boneti*. 1. MPM. 2. Extracto de glándulas de hembra de *L. boneti*. 3. Extracto de glándulas de macho de *L. boneti*. 4. Extracto de glándulas hembra/macho de *L. boneti*. Por cada muestra analizada se cargo un total de 30 μ g.

VI.3. Producción de anticuerpos en conejos contra *Loxosceles boneti* y *Loxosceles reclusa*

La medición de anticuerpos en los sueros de los conejos fue determinada mediante el método de ELISA (Clement, 2000). Los resultados se muestran en Figura 17. Como se puede observar, para el caso del conejo 45 el título máximo se obtuvo a la tercer sangría para posteriormente disminuir.

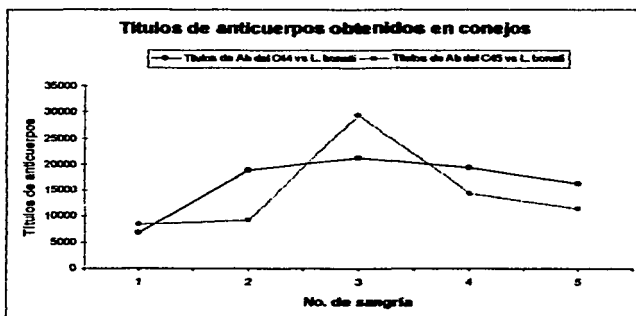


Figura 17. Respuesta inmune contra fracción II de *L. boneti*. Los conejos 44 y 45 fueron inmunizados con la fracción II del veneno de *L. boneti*, haciéndose en total cinco sangrías.

El conejo 42 fue inmunizado con veneno puro de *Loxosceles reclusa*. Los resultados se presentan en la Figura 18.

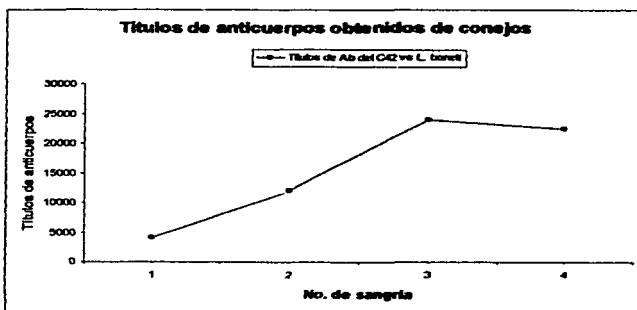


Figura 18. Respuesta inmune contra veneno puro de *L. reclusa*. El conejo 42 fue inmunizado con la fracción II del veneno de *L. reclusa*, haciéndose en total de cuatro sangrías.

Los datos obtenidos indican que para todos los conejos los títulos más altos se obtuvieron en la tercera sangría.

VI.4. Determinación de reacciones cruzadas

Para determinar reacciones cruzadas se hicieron tanto pruebas de ELISA como de Western-blot. En el primer caso se detectan epítomos conformacionales, mientras que el segundo caso detecta epítomos lineales, así como el componente específicamente involucrado. Por otro lado, para confirmar lo encontrado a nivel de secuencia aminoterminal de las isoformas, se hicieron inmunodifusiones. Éstas permitieron observar la interacción de uno o varios antígenos con los anticuerpos generados en conejos; al mismo tiempo estos ensayos determinaron la relación entre diversos antígenos (isoformas) con los anticuerpos, es decir, se pudo evaluar la identidad que se presentó entre los antígenos.

a) Pruebas de ELISA

Las pruebas de ELISA mostraron reacciones cruzadas de los sueros de conejos inmunizados contra *L. boneti* y *L. reclusa*. Los sueros de conejos inmunizados con el veneno puro de *L. reclusa* reconocieron al veneno de *L. boneti* y visceversa (Figura 19 y 20).

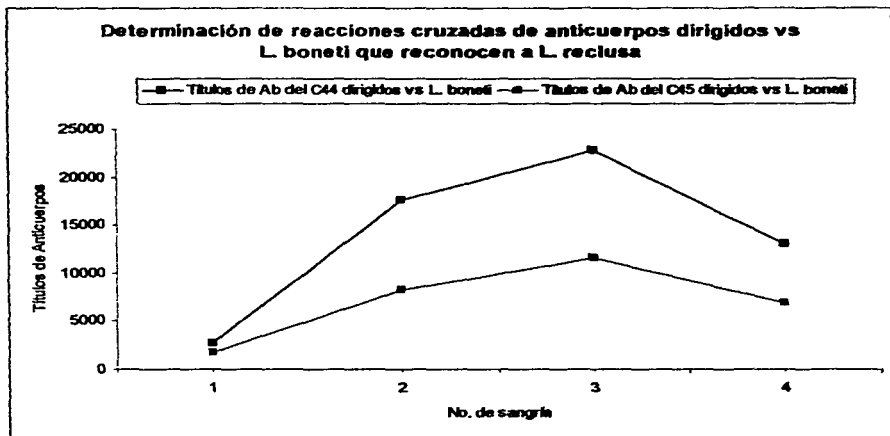


Figura 19. Respuesta inmune contra veneno puro de *L. reclusa*. Los conejos 44 y 45 fueron inmunizados contra la fracción II del veneno de *L. boneti*, haciéndose en total cuatro sangrías.

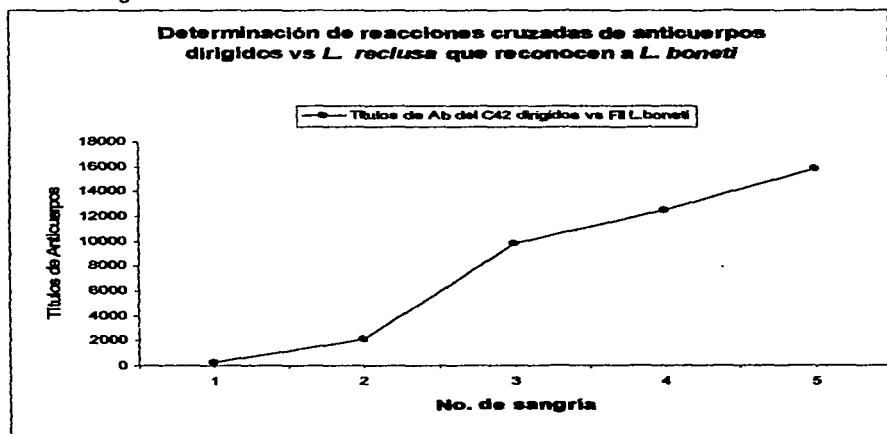


Figura 20. Respuesta inmune contra la fracción II del veneno de *L. boneti*. El conejo 42 fue inmunizado contra veneno puro de *L. reclusa*, haciéndose en total cuatro sangrías.

b) Pruebas de Western-blot

Con el objetivo de observar si los sueros de ambos grupos de conejos reconocían a la necrotoxina (peso molecular: 35.5 kDa) específicamente, se realizaron ensayos de Western-blot. Al mismo tiempo estos ensayos identificarían las posibles reacciones cruzadas de los sueros que se observaron en las pruebas de ELISA.

Como se muestra en la Figura 21 panel A, los anticuerpos de conejos inmunizados con veneno puro de *L. reclusa* reconocen esencialmente a la necrotoxina. También se determinó que estos anticuerpos reconocían a la necrotoxina del veneno de *L. boneti* (Figura 21 panel B).

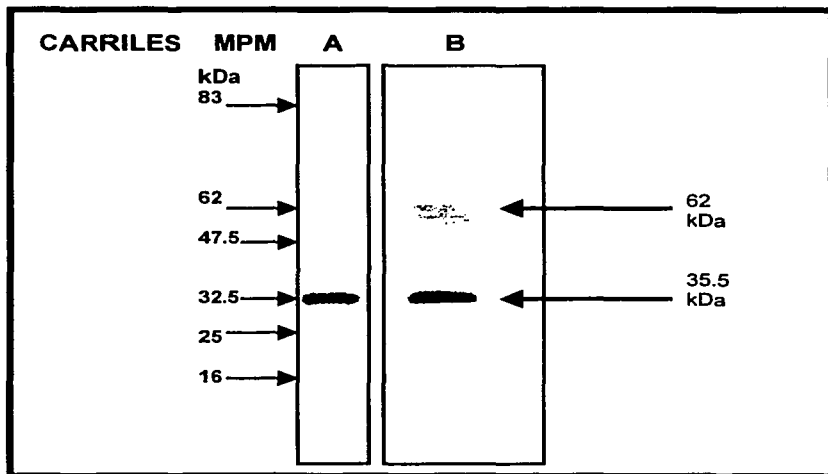


Figura 21. Venenos fraccionados por SDS-PAGE, revelados por Western-blot con anticuerpos dirigidos contra el veneno de *L. reclusa*. A: veneno puro de *L. reclusa*; B: extracto de glándulas de *L. boneti*. El total de proteína cargada en cada muestra fue de 30 µg. La dilución del primer anticuerpo fue 1:5000

Para el caso de los sueros obtenidos de conejos inmunizados con el extracto de glándulas de *L. boneti* se observó, también, que estos reconocían esencialmente a la necrotoxina de *L. boneti* y daban reacción cruzada con la necrotoxina de *L. reclusa* (Figura 22 Panel B y Panel A, respectivamente).

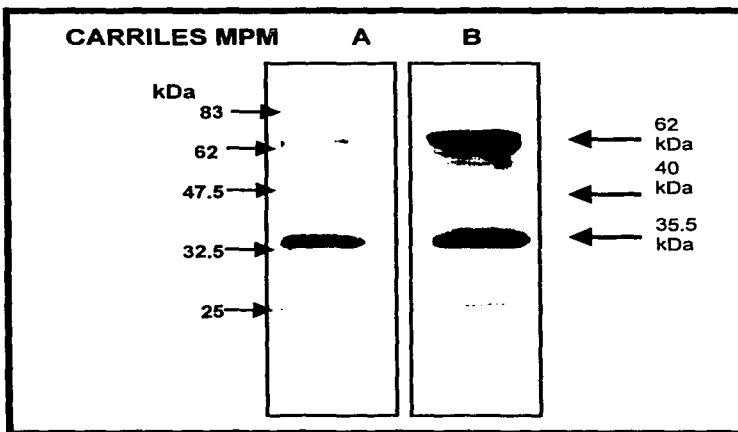


Figura 22. Venenos fraccionados por SDS-PAGE, revelados por Western-blot con anticuerpos dirigidos contra *L. boneti*. A: Veneno puro de *L. reclusa*; B: extracto de glándulas de *L. boneti*. El total de cargado para cada muestra fue de 30 µg. La dilución del primer anticuerpo fue 1:5000.

Una vez que se habían determinado reacciones cruzadas entre las *Loxosceles* norteamericanas, se decidió probar sueros producidos con *Loxosceles* sudamericanas (*L. laeta*) para observar si éstos también presentaban reacciones cruzadas.

En ésta ocasión se utilizó suero de caballo contra *Loxosceles laeta* (proporcionado por Adolfo de Roodt del Instituto Nacional de Producción de Biológicos A.N.L.I.S. "Dr. Carlos G. Malbrán", Ministerio de Salud y Acción Social, Buenos Aires, Argentina). Para este caso la dilución del primer

anticuerpo fue: 1:200. Como se muestra en la Figura 23 el suero fue capaz de reconocer a la necrotoxina tanto de *L. reclusa* como de *L. boneti* (Panel A y B respectivamente).

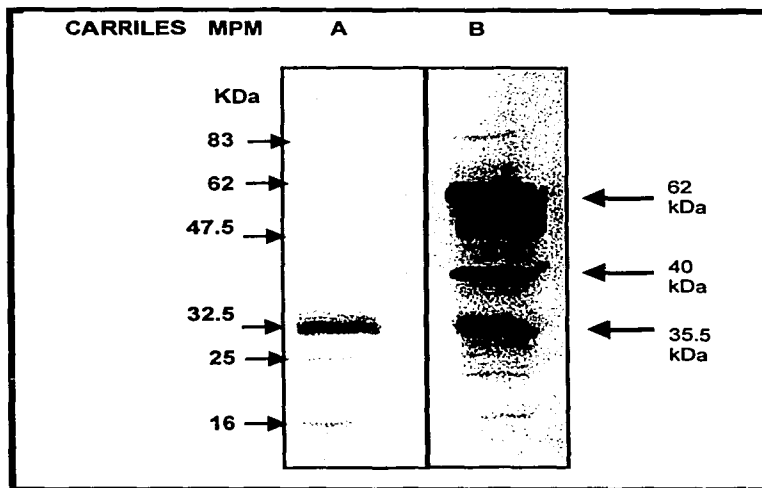


Figura 23. Venenos fraccionados por SDS-PAGE, revelados por Western-blot con anticuerpos dirigidos contra extracto de glándulas de *L. laeta*. A: Veneno puro de *L. reclusa*; B: extracto de glándulas de *L. boneti*. El total de cargado para cada muestra fue de 30 µg. La dilución del primer anticuerpo fue 1:200.

Estos experimentos muestran las reacciones cruzadas que presentan los sueros con los venenos de *L. boneti* y de *L. reclusa* y al tiempo que sugieren que el veneno de *L. laeta* también tiene similitud con los anteriores.

c) Inmunodifusiones

Se llevaron a cabo inmunodifusiones (Figura 24) confrontando varios antígenos, entre ellos las tres isoformas purificadas del veneno de *L. boneti*, con los anticuerpos de conejo producidos en el laboratorio. Se pudo observar identidad total o parcial o de varios antígenos, según el caso.

Los datos obtenidos de estas inmunodifusiones se resumen en la Tabla 6.

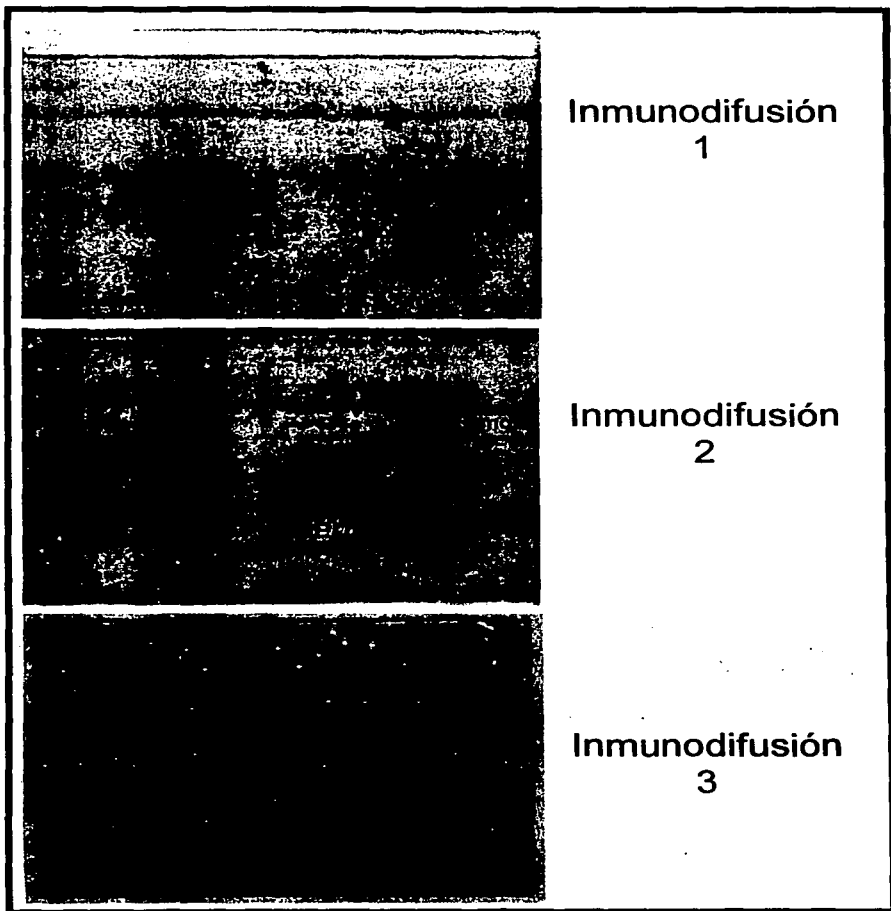


Figura 24. Inmunodifusiones en las cuales se observan identidades totales y/o parciales del antígeno con el anticuerpo. Entiéndase como: 1) Isoforma I de *L. boneti*. 2) Isoforma II de *L. boneti*. 3) Isoforma III de *L. boneti*. ELb) Extracto de glándulas de *L. boneti*. ELr) Extracto de glándulas de *L. reclusa*. Hemo Lb) Hemolinfa de *L. boneti*. VLr) Veneno puro de *L. reclusa*.

Tabla 6. Resumen de las inmunodifusiones, destacando el tipo de reconocimiento por parte del anticuerpo con su antígeno correspondiente

Anticuerpo	Antígeno	Identidad
42 vs <i>L. reclusa</i>	Isoforma I	Total
42 vs <i>L. reclusa</i>	Isoforma II	Total
42 vs <i>L. reclusa</i>	Isoforma III	Parcial
44 vs <i>L. boneti</i>	Isoforma I	Total
44 vs <i>L. boneti</i>	Isoforma II	Total
44 vs <i>L. boneti</i>	Isoforma III	Parcial
45 vs <i>L. boneti</i>	Isoforma I	Total
45 vs <i>L. boneti</i>	Isoforma II	Total
45 vs <i>L. boneti</i>	Isoforma III	Parcial

Se llevaron a cabo unas segundas inmunodifusiones encontrando varios tipos de identidades. Esto se resume en la Tabla 7.

Tabla 7. Resumen de las segundas inmunodifusiones, destacando el tipo de reconocimiento por parte del anticuerpo con su antígeno correspondiente

Anticuerpo	Antígeno	Identidad
C42 vs <i>L. reclusa</i>	Veneno puro <i>L. reclusa</i>	Total
C44 vs <i>L. boneti</i>	Veneno puro <i>L. reclusa</i>	Parcial
C45 vs <i>L. boneti</i>	Veneno puro <i>L. reclusa</i>	Parcial
C42 vs <i>L. reclusa</i>	Ext. glánd <i>L. reclusa</i>	Varios antígenos
C44 vs <i>L. boneti</i>	Ext. glánd <i>L. reclusa</i>	Varios antígenos
C45 vs <i>L. boneti</i>	Ext. glánd <i>L. reclusa</i>	Total
C42 vs <i>L. reclusa</i>	Ext. glánd <i>L. boneti</i>	Varios antígenos
C44 vs <i>L. boneti</i>	Ext. glánd <i>L. boneti</i>	Varios antígenos
C45 vs <i>L. boneti</i>	Ext. glánd <i>L. boneti</i>	Varios antígenos
42 vs <i>L. reclusa</i>	Hemolinfa <i>L. boneti</i>	-
44 vs <i>L. boneti</i>	Hemolinfa <i>L. boneti</i>	-
45 vs <i>L. boneti</i>	Hemolinfa <i>L. boneti</i>	-

VI.5. Toxinología del veneno de *Loxosceles boneti* y *Loxosceles reclusa*.

a) Dermatonecrosis en conejos

En ésta prueba se evaluó la capacidad de inducir necrosis cutánea. Los inductores de la necrosis fueron: veneno puro de *L. boneti*, veneno puro de *L. reclusa* y finalmente las isoformas de la fracción necrotóxica de *L. boneti*.

Los venenos de ambas especies, provocaron áreas necróticas a 5, 10 y 20 μg . Las áreas necróticas se incrementaron de acuerdo a la cantidad del veneno inyectado subcutáneamente (Figura 24). Las zonas inyectadas con el vehículo no presentaron necrosis.

Las isoforma I, II y III no provocaron áreas necróticas a 0.1, 0.5 y 1 μg , mientras que en inoculaciones con 10 μg las isoformas I y II produjeron necrosis, no así la III. Una situación similar ocurre con *L. intermedia* (Tambourgi, 1998).



Figura 24. Foto que ilustra la necrosis en la piel de conejo. Las dosis administradas fueron de izquierda a derecha: 5, 10 y 20 μg de veneno puro de *L. boneti*. El buffer en el que se encontraba el veneno era: acetato de amonio 20 mM pH 4.7. La foto fue tomada 48 horas post-inoculación. El conejo tenía un peso de 3.5 kg.

VII. DISCUSIÓN

El envenenamiento por arañas del género *Loxosceles* causa lesiones dermonecróticas. Igualmente puede desencadenar problemas sistémicos, que en algunos casos, pueden llevar a la muerte. Estudios anteriormente realizados, han demostrado que el causante principal de la dermonecrosis es una proteína de 35 kDa (esfingomielinasa D) la cual ha sido estudiada en especies no mexicanas (Ownby, 1990. Tambourgi, 1998).

VII.1. Caracterización bioquímica del veneno de *Loxosceles boneti*.

En este trabajo se separaron los distintos componentes del extracto de glándulas de *Loxosceles boneti*, por cromatografía de exclusión molecular en gel, demostrando que uno de los componentes mayoritarios en el veneno es la proteína de 35 kDa. Existen otros componentes en el extracto de glándulas como: hemocianina, péptidos, ATP, ácidos nucleicos, etc., que pudieron purificarse por este método y que posteriormente se analizaron por SDS-PAGE. Al parecer éstos no participan en la actividad dermonecrótica, esto se sustenta por el hecho de que en los ensayos de dermonecrosis se pudo ver que la proteína purificada producía lesiones necróticas.

La fracción II (necrotoxina) obtenida de la cromatografía de exclusión molecular en gel fue resuelta en tres picos principales contiguos por cromatografía de intercambio catiónico a los cuales se les llamo: isoforma I (I_1), isoforma II (I_2) e isoforma III (I_3), lo cual concuerda con lo ya reportado para otras especies. (Tambourgi, 1998). En el perfil cromatográfico se observaron dos picos

en menor proporción y se cree que pudieran corresponder a otras isoformas minoritarias, aunque aún no se analizan.

La I₁, I₂ y la I₃ se analizaron por SDS-PAGE bajo condiciones reductoras y no reductoras. Si bien su movilidad relativa cambió en uno y otro caso, los resultados mostraron fracciones homogéneas distinguibles entre sí. La secuencia aminoterminal de las tres isoformas mostró que son productos génicos distintos. La I₁ y la I₂ difieren entre sí en dos aminoácidos de los primeros 33, mientras que en la I₃ posee trece variaciones de aminoácidos. Dentro de estas variaciones caben resaltar tres: en la posición 8 cambia una isoleucina por un aspartato, en la 15 cambia una alanina por un aspartato y en la 17 cambia una alanina por glutamato. Estos tres cambios son importantes debido a que pasan de hidrofóbicos a aminoácidos cargados negativamente o ácidos, lo que puede ocasionar una alteración en las propiedades fisicoquímicas de la proteína. Además las secuencias amino terminales de las isoformas I₁ e I₂ tienen una alta identidad con las secuencias de las arañas norteamericanas previamente reportadas de *L. deserta* y *L. reclusa* (88.6%) (Tambourgi, 1998).

En cuanto a las pruebas enzimáticas, no se detectó actividad de hialuronidasa por el método utilizado. Reportes anteriores mostraron actividad de hialuronidasa en la especie *Loxosceles rufescens*, la cual fue muy baja (Young, 2000). En este reporte utilizaron el mismo método de detección, la única variación radicó en el buffer donde resuspendían el veneno, el cual fue PBS pH 7.4. En contraste, en éste trabajo se utilizó buffer acetato de amonio 20mM pH

4.7. Esto es importante porque al utilizar ésta solución quizá se pierda la actividad enzimática, debido al pH ácido, y ya no se recupere. Por otro lado, durante el almacenamiento del veneno, éste llega a precipitar, por lo que si posee una poca cantidad de hialuronidasa, quizá ésta se pierda con el precipitado.

La sensibilidad del ensayo de detección de actividad de hialuronidasa va desde 0.06 µg-2 µg (Cevallos, 1992). El control positivo para éste ensayo fue de 0.017 µg-0.14 µg, por lo que al evaluar en varias diluciones el veneno de *L. reclusa* (10 µg-0.5 µg) debería estar dentro de los valores del control positivo. Entonces, se puede decir que, al menos por este método, no se detectó actividad de la enzima. Los datos obtenidos en éste trabajo son consistentes con lo reportado, dónde argumentan que en el veneno de *Loxosceles* existe muy poca actividad de hialuronidasas o mejor dicho, la actividad es nula (Wright, 1973).

La actividad de fosfolipasas tipo A₁ y A₂ también fue negativa; este tipo de actividad participa en la citotoxicidad de otros venenos (Rosso, 1996). Como control positivo se utilizó veneno de *Heloderma horridum horridum* que se sabe que es rico en esta enzima (4.5%) (Alagón, 1982). Las diluciones utilizadas fueron desde 50 µg-6.25 µg, por lo que nuestras muestras evaluadas deberían caer en el rango del control positivo. Entonces, al menos por éste método, no se detectó actividad de fosfolipasas tipo A. Al igual que para el caso de las hialuronidasas, si se encuentran éste tipo de fosfolipasas en muy poca cantidad,

en el procesamiento de almacenamiento cabe la posibilidad que la actividad o la enzima se pierda por precipitación.

Parece ser que en el género *Loxosceles* la actividad dominante es la esfingomielinasa D (Ownby, 1990).

VII.2. Comparación intraespecífica del veneno de *Loxosceles boneti*

Uno de los objetivos iniciales de éste trabajo contemplaba hacer la comparación intraespecífica del veneno de la especie *L. boneti* a nivel cualitativo, y de acuerdo con los resultados presentados por SDS-PAGE se puede decir que al menos a nivel del perfil protéico no existen diferencias importantes en los componentes del veneno entre hembra y macho de esta especie. Ésto no concuerda con lo reportado por De Oliveira *et al*, 1999 para la especie *L. intermedia*. Quizá esto suceda porque la hembra en ésta especie es de mayor tamaño y además en el perfil proteico de SDS-PAGE, entre hembras y machos, existen diferencias cualitativas (proteínas de bajo peso molecular).

VII.3. Producción de anticuerpos en conejos contra *L. boneti* y *L. reclusa* y determinación de reacciones cruzadas

a) Inoculaciones, pruebas de ELISA y Western-blot

Mediante la medición de títulos por ELISA se pudo evaluar la presencia de anticuerpos contra componentes de los venenos. Éstos fueron igualmente inmunogénicos para ambos casos, ya que los títulos de los anticuerpos

producidos en el laboratorio presentaron valores similares. En general los títulos más altos de anticuerpos que se obtuvieron fue en la tercera sangría y lo que se observa es que en sangrías posteriores se presenta una caída. Esto se pudo dar porque se generó el fenómeno de tolerancia, es decir, un estado en que no se producen respuestas frente a un antígeno específico; ésta es inducida por la exposición previa de dicho antígeno (Roitt, 2001).

Por otro lado en ELISA se pudieron observar reacciones cruzada de los sueros con las toxinas de ambas especies *Loxosceles*.

Para determinar si los sueros producidos en conejo reconocían específicamente a la necrotoxina (35.5 kDa) se utilizaron pruebas de Western-blot resultando que los anticuerpos de los conejos dirigidos contra el veneno puro de *L. reclusa* reconocen a la necrotoxina de ésta especie. Lo mismo se presentó para el caso de *L. boneti*.

Por otra parte en ésta misma prueba se evaluaron las reacciones cruzadas observadas por ELISA, resultando que la reacción cruzada de los sueros con los venenos de *L. boneti*, *L. reclusa* y *L. laeta* esencialmente era dada por la proteína dermonecrótica: la esfingomielinas D.

Estos experimentos confirman las reacciones cruzadas que presentan los sueros con los venenos de las especies evaluadas y al tiempo sugieren que el veneno de *L. laeta* también tiene similitud con los anteriores, ya que el antisuero anti *Loxosceles laeta* mostró también capacidad de reconocimiento heterólogo, lo cual es muy importante para la realización de un antiveneno que neutralice el

mayor número de venenos de las diferentes especies del género *Loxosceles*. Lo anterior concuerda con lo ya reportado para especies de *Loxosceles* sudamericanas (Barbaro, 1994).

En los ensayos de Western-blot se detectaron otras bandas, una de 40 kDa aproximadamente y otra por debajo de 65 kDa. Cabe mencionar que se pudo haber presentado algún tipo de contaminación debido al macerado de glándulas (proteínas de glándula que no aparecen en el veneno) y tal vez por eso se esté presentando esta señal. Esto se sustenta porque al hacer el análisis por SDS-PAGE del veneno puro en ambas especies, no aparecen éstas bandas.

b) Inmunodifusiones

Se llevaron a cabo ensayos de inmunodifusión estos ensayos determinaron la relación entre diversos antígenos (isoformas) con los anticuerpos, es decir, se pudo evaluar la identidad que se presentó entre los antígenos. Al mismo tiempo estos ensayos confirmarían lo encontrado en las secuencias aminoterminal de las isoformas de *L. boneti*.

Se encontro que tanto para la I_1 como para la I_2 hay una identidad total con los anticuerpos dirigidos contra el veneno de *L. reclusa* y *L. boneti*, pero con la I_3 sólo hay una identidad parcial para ambos casos. Esta última isoforma comparte epítomos de la I_1 y de la I_2 y también posee otro epítomo que el anticuerpo es capaz de diferenciar. Esto es importante ya que se sabe que la isoforma tres no es capaz de inducir dermonecrosis, por lo que podría ser el inmunógeno por excelencia,

siempre y cuando los anticuerpos que produzca, sean capaces de neutralizar el efecto necrozante.

Se llevaron a cabo unas segundas inmunodifusiones en donde el experimento no fue exitoso con la hemolinfa. La hemolinfa precipitó y se clarificó por centrifugación. El precipitado corresponde al peso molecular de la hemocianina (datos no mostrados). Cuando se llevaron a cabo las inmunodifusiones se le habían hecho varias clarificaciones a la muestra de hemolinfa, por lo que se cree que se perdió gran porcentaje de ésta. Otra cosa que pudo haber sucedido es que como en estos ensayos no se utiliza un campo eléctrico, la hemolinfa pudo haber precipitado en el pozo, y por tanto no difundió en la placa de agarosa, por lo que no se pudo observar ningún tipo de interacción antígeno anticuerpo.

VII.4. Dermatonecrosis en conejos

El último experimento realizado en este trabajo fue la actividad dermonecrótica realizada en conejos, en la cual se aplicaron distintas concentraciones de veneno puro de *L. boneti*, al igual que veneno puro *L. reclusa*. La actividad de ambos fue muy parecida; este resultado es muy significativo ya que el veneno de *L. reclusa* es dermonecrótico por excelencia (Geren, 1976).

El ensayo mostró un área necrótica ascendente de acuerdo a los μg inoculados en el conejo (5, 10 y 20 μg). La cantidad de veneno que inyecta una *Loxosceles*, está entre 15-20 μg .

También se realizó éste ensayo utilizando las tres isoformas de la necrotoxina, donde se observó que la I₁ y la I₂ tienen actividad dermonecrótica, mientras que la I₃ no ocasiona lesiones en la piel. Ésto concuerda con lo ya reportado para *Loxosceles intermedia* (Tambourgi, 1998).

VIII. CONCLUSIÓN

Se puede concluir que la proteína encargada de la dermonecrosis en el veneno del género *Loxosceles* es la esfingomielinasa D (35 kDa) ya que en ausencia de actividades enzimáticas de fosfolipasas tipo A₁ y A₂ y de hialuronidasa, es capaz de causar lesiones en la piel. Esto es sustentado por la evaluación necrótica de las isoformas encontradas en la fracción II de *L. boneti*, en donde al menos dos de ellas son capaces de desencadenar efectos necróticos en la piel. A nivel de secuencia aminoacídica las isoformas comparten un alto grado de identidad siendo la I₃ la más divergente.

IX. PERSPECTIVAS

- a) Probar la capacidad neutralizante de necrosis de los antisueros en conejos, así como la neutralización de la letalidad en ratones.
- b) Montar un ensayo de actividad enzimática para esfingomielinasa D.
- c) Clonar los genes de las distintas isoformas de esfingomielinasas D.
- d) Expresar las necrotoxinas recombinantes y probar su capacidad para inducir la producción de anticuerpos neutralizantes.

BIBLIOGRAFÍA

ALAGÓN, A.C. Maldonado A. M.E., Julia, J.Z., Sánchez, C.R. & Possani L.D. 1982. Venom from two sub-species of *Heloderma horridum* (mexican beaded lizard): general characterization and purification of *N-benzoyl-L-aminine ethyl ester hydrolase*. *Toxicon* 20(2) 463-475 pp.

ALVAREZ DEL TORO, M. 1992. Arañas de Chiapas, Editado por la Univesidad Autónoma de Chiapas, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. 1ª. Edición, 297 pp.

ATKINSON, R.K., Wright, L.G.. 1992. The involvement of collagenase in the necrosis induced by the bites of some spiders. *Comp. Biochem. Physiol.* 102C (1), 125-128 pp.

BARBARO, K.C., Ferreira, M.L., Cardoso, D.F., Eickstedt, V.R.D., Mota, I., 1996^a. Identification and neutralization of biological activities in the venoms of *Loxosceles* spiders. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 29(11) 1491-1497 pp.

BARBARO, K.C., Sousa M.V., Morhy, L., Eickstedt, V.R.D., Mota, I. 1996^b. Compared chemical properties of dermonecrotic and lethal toxins from spiders of the genus *Loxosceles* (Araneae). *Journal Prtoein Chemical.* 15 (4), 337-343 pp.

BARBARO, K.C., Eickstedt, V.R.D. y Mota, I. Antigenic Cross-reactivity of venoms from medically important *Loxosceles* (Araneae) especies in Brazil. *Toxicon*, Vol 32 (1) 113-120 pp.

BIAGI, F. 1974. Enfermedades Parasitarias. México: Manual Moderno.

BLUM, M.S. 1981. Chemical Defenses of Arthropods, USA: Academic Press

CEVALLOS, M.A., C. Navarro-Duque, M. Varela-Julia and A. C. Alagón. 1992. Molecular mass determination and assay of venom hyaluronidases by sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis. *Toxicon* 30(8), 925-930 pp.

CLEMENT, C.H., 2000. Reacciones inmunológicas cruzadas entre venenos de viperidos mexicanos y sudamericanos. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas, UAEM.

De OLIVEIRA, K.C., Goncalves de A. M., Giusti, A.L. da Silva W.D., Tambourgi D.V., 1998. Sex-linked variation of *Loxosceles intermedia* spider venoms. *Toxicon* 37 (1999) 217-221 pp.

DE ROODT, A.R., Salomón, O.D., Lloveras, C.S. y Orduna, A.T. 2002. Envenenamiento por arañas del Género *Loxosceles*. Artículo Especial, Medicina (Buenos Aires) 62:83-94pp.

DINIZ, C.R. 1971. Venoms Animals and their venoms. Vol. III. New York: Academic Press,

FEITOSA, L. Gremski, W., Veiga, S.S., Elias, M.C.Q.B., Graner, E., Mangili, O.C., Brentani, R.R., 1998. Detection and characterization of metalloproteinases with gelatinolytic, fibronectinolytic and fibrigenolytic activities in brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. *Toxicon* 36 (7), 1039-1051 pp.

FORRESTER, L.J., Barnest, Campbel B.J. 1987. Red blood cells lysis induced by the venom of the brown recluse spider, the role of sphingomielina D. *Arch Biochem Biophys*: 187. 355-406pp.

FOELIX, R.F., 1996. Biology of Spiders. Oxford Thieme. USA. 330 pp.

FURLANETTO, R.S., Santos, N.P., Navas, J., 1962^a. Preparacao, purificacao e doseamento do soro antiloxoscélico. *Ciencia e Cultura* 14, 254.

FURLANETTO, R.S., Bucherl, W., Rosa, R.R., Saliba, F., Navas, J., 1962^b. Observacao dos efeitos do veneno loxoscélico e avaliacao de sua atividade. *Ciencia e Cultura* 14, 254.

FUTRELL, J.M. 1992. Loxoscelism. *Am. J. Med. Sci.* 304 (4), 261-267 pp.

GATICA, M.R., Trejo, P.L. 1991. Aracnoidismo necrótico y sistémico. Informe de un caso y revisión de la literatura. *Bol. Med hosp Infant Mex*, 738-741 pp.

GATT, S., Dinur, T., Barenhořz, Y., 1978. A spectrophotometric method for determination of sphingomyelinase. *Biochim. Biophys. Acta* 530, 503-507 pp.

GEREN, C.R., Chan, T.K., Howell, D.E. y Odell G.V. 1976. Isolation and Characterization of Toxins from Brown Recluse Spider Venom (*Loxosceles reclusa*). *Archives of Biochemistry and Biophysics* 174, 90-99 pp.

GEREN, C.R., Odell G.V. 1984. The biochemistry of spider venoms. In Tu, A.T. (Ed.), *Insect Poisons, Allergens, and Other Invertebrate Venoms*, Vol. 2. Marcel Dekker, New York, 441-481 pp.

GERSTCH, W.J., Ennik, F. 1983. The spider Genus *Loxosceles* in North America, Central America and the West Indie (Araneae, Loxoscelidae). *Bull. Amer. Mus. Nat. Hist. USA* 175(3): 264-360 pp.

GONCALVES DE A., R.T., De Oliveira C., K., Giusti A. L., Dias Da Silva W., Tambourgi, D.V. 1999. Ontogenic development of *Loxosceles intermedia* spider venom. *Toxicon* 37 (1999) 627-632 pp.

GÓNZALES-JUÁREZ, C.A. 1997. Desarrollo de una prueba diagn3stica para la detecci3n de hipotiroidismo cong3nito empleando anticuerpos monoclonales. Tesis de Maestría en Biotecnología, UACPyP-UNAM.

HARWOOD, R.F., James, M.T. 1987. *Entomología Médica y Veterinaria*. México. Editorial Limusa.

HABERMANN, E., Hardt, K.L. 1972. *Phospholipase assay by egg yolk plate test*. *Anal. Biochem.*, 50 (163).

HOFFMANN, A. 1976. Relaci3n bibliográfica de las arañas de México (Arachnida: Araneae). Instituto de Biología, UNAM. Publicaciones especiales. 3: 21-23 pp.

JONG, Y.S., Norment, B.R. Hitz, J.R. 1979. Separation and characterization of venoms componentes in *Loxosceles reclusa*-II. Protease enzyme activity. *Toxicon* 17(6), 529-537 pp.

KURPIEWSKI, G., Forrester, L.J., Barrett, J.T., Campbell, B.J. 1981. Platelet aggregation and sphingomyelinase D activity of a purified toxin from the venom of *Loxosceles reclusa*. *Biochim. Biophys. Acta* 678 (3), 467-476 pp.

LAEMMLI, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685 pp.

LEVI, H.W., 1993. *Arácnidos y otros artópodos*. Trillas.México. 168 pp.

MAGUIRE, J.H., Spielman A. Infestaciones por ectoparásitos y mordeduras y picaduras de artrópodos. En: Fauci A.S., Braunwald E., Isseibacher K.J., Wilson J.D., Martin J.B., Kasper D.L., Hauser S.L., Longo D.L., eds. 1998. *Principios de Medicina Interna*. Vol. II España: McGraw Hill-Interamericana:2906.

MATHEWS, C. y Holde, K. 1998. *Bioquímica segunda edición*, Editorial McGrawHill Interamericana, España.

MOYE DE ALBA, C.E. Picaduras y mordeduras . En Aguilar C.S., Chevolle R.J., Saucedo J, Kaplan, S.M., Díaz A.; Eraña, G.J., eds. 1997. *Manual de Terapéutica Médica y Procedimientos de Urgencias*. México: Mc Graw Hill-Interamericana;2835 pp.

OWNBY, C.L.1990. Locally acting agents: Myotoxins Hemorrhagic toxins and dermonecrotic factors en *Handbook of toxinology*. Dekker. 602-648 pp.

PINKSTON, K., Wright, R. 1998. *Spiders: Brown Recluse, Black Widow, and other Common Spiders*. Oklahoma State University.

PLATNICK, N.I. 2000 *The World of Spider Catalag*. The American Museum of Natural History. <http://research.amnh.org/entomology/spiders/>

PRESTON-MAFHAM, R., Preston-Mafham, K., 1996. *The Natural history of spiders*. The Crowood Press. 160pp.

RAMOS, R.H., Vázquez R.I. 2000. Arañismo ocasionado por especies del Género *Loxosceles*, dentro del apartado Urgencias Médico-quirúrgicas. Revista Educativa para la Salud. 25-34 pp.

ROITT, I., Brostoff, J., Male, D. 2001. Inmunología. Harcourt.423 pp.

ROSSE, W., Flankin, B.H. Anemias hemolíticas y por pérdida aguda de sangre. En: Fauci AS, Braunwald E., Isselbacher, K.J., Wilson J.D., Martín, J.B., Kasper, D.L., Hauser, S.L., Longo D.L., eds. Principios de Medicina Interna. Vol. 1, España: Mc Graw Hill-Interamericana, 1998. 764 pp.

ROSSO, J-P., Rosso, O.V., Gutiérrez, J.M., Rochat, H. y Bougis, E. 1996. Characterization of α -neurotoxin and phospholipase A₂ activities from *Micrurus* venoms. Determination of the amino acid sequence and receptor-binding ability of the major α -nerotoxin from *Micrurus nigrocinctus nigrocinctus*. Eur. J. Biochem. 238, 231-239pp.

RUSSELL, F.E. 1987. Mordeduras y picaduras venenosas. En : Berkow R., Fletcher A, eds. El Manual Merck. España: Ediciones Doyma, 2835

SÁNCHEZ J. 1993. A cien Años de la Zoología Médica. México. Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado

SAVEL-NIEMAN, A. 1989. Tarantula (*Eurypelma californicum*) venom a multicomponente system. Biol. Chem. Hope Seyler. 370 (5): 485-498 pp.

SCORPES, R.K.1994. Protein purification, principles and Practice. Springer. USA. 380 pp

SMITH, C.W. Micks, D.W. 1968. A comparative study of the venom and other components of three species of *Loxosceles*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 17(4), 651-656 pp.

SMITH, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Porvenciano, M.D., Fujimoto, E.K., Goetze, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal. Biochem. 150, 76-85 pp.

TAMBOURGI, D.V. Petrieceovich, V.L., Magnoli, F.C., Assaf, S.L., Jancar, S. & Dias da Silva, W. 1998. Endotoxemin-like shock induced by *L. intermedia* spider venom: Pathological changes and putative cytokine mediators. *Toxicon* 36, 391-403 pp.

TAMBOURGI, D.V., Magnoli, F.C. van den Berg, C.W., Morgan, B.P., de Araujo, P.S., Alves, E.W., Dias Da Silva, W. 1998. Sphingomyelinases in the venom of the spider *Loxosceles intermedia* responsible for both dermonecrosis and complement-depent hemolysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 251 (1), 366-373 pp.

TAN, N.H., Ponnundurai, G., 1992. Comparative study of the enzymativ, hemorrhagic, procoagulant an anticoagulant activities of some animal venoms. *Comp. Biochem. Physiol.* 103C (2), 299-302 pp.

VÁZQUEZ, O.V. 1992. Mordeduras de Arañas Venenosas, síntomas y tratamiento. En Alvarez del Toro M, ed. Arañas de Chiapas. México: Universidad Autónoma de Chiapas, 209 y 263.

WALSH, K.A., L.H. Ericsson, D.C. Parmelle y K. Titani. 1981. Advances in protein sequencing. *Ann. Rev. Biochem.* 50: 261-284pp.

WILLIAMS, K. 1997, Interactions of polyamines with ion channels, Rev article. *Biochemical Journal*, 325, 289-297pp.

WRIGHT, R.P. 1973. Enzymatic characterization of brown recluse spider venom. *Bull. Mo Acad. Sci. Supplement* 2, 1-94 pp.

YOUNG, A.R., S.J. Pincus. 2000. Comparision of enzymatic activity from three species of necrotising arachnids in Australia: *Loxosceles rufescens*, *Badumna insignis* and *lampona cylindrata*. *Toxicon* 39(2001), 391-400 pp.