



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES BIOLÓGICAS DE
UNA ESFINGOMIELINASA D FLUORESCENTE
QUIMÉRICA: rGFP-Lb1N

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A :

FRANCIA GARCÍA GARCÍA

DIRECTORA DE TESIS: DRA. ROSANA SÁNCHEZ LÓPEZ

2007





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

LA PRESENTE TESIS FUE REALIZADA EN:

EL LABORATORIO DEL DR. ALEJANDRO ALAGÓN CANO EN EL
DEPARTAMENTO DE MEDICINA MOLECULAR Y BIOPROCESOS
DEL INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, DE LA UNIVERSIDAD
NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
CUERNAVACA, MORELOS.

BAJO LA DIRECCIÓN DE LA
DRA. ROSANA SÁNCHEZ LÓPEZ

ESTE PROYECTO FUE REALIZADO CON APOYO DEL DONATIVO
DGAPA IN-226906.

DURANTE LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO RECIBÍ APOYO
ECONÓMICO DE LA BECA DE ALIMENTACIÓN Y HOSPEDAJE DEL
IBT Y DEL INSTITUTO SILANES.

Agradecimientos

Quiero agradecer especialmente el apoyo técnico y asesoría de: la Dra. Rosana Sánchez López, la M. en B. Herlinda Catalina Clement Carretero y el Dr. Alejandro Alagón Cano, brindados durante el manejo de equipo y materiales utilizados a lo largo de este trabajo.

Agradezco el apoyo técnico de: la M en C. Blanca Margarita Ramos Cerrillo, la M. en C. Laura Patricia Olguín Pérez, el M. en C. Alejandro Olvera Rodríguez, el M. en C. Alejandro Carbajal Saucedo, el Biol. Felipe Olvera Rodríguez y el Biól. Héctor Miguel Cardoso Torres.

Agradezco los apoyos técnicos y administrativos brindados por: la Sra. Olegaria Benítez Villanueva, Angélica Linares Labastida, y Ricardo Mondragón Cortés.

A mis sinodales: el M. en Ing. Eduardo Rodríguez Bustamante, el M en C Alfonso José Vilchis Peluyera, el Dr. Luis Felipe Jiménez García y la Dr. Patricia Ramos Morales, por sus valiosos comentarios y el tiempo que se tomaron para la revisión de este escrito.

Agradecimientos muy personales

Dedico esta tesis a mi familia y amigos, especialmente a Enriqueta, Rafael, Grecia y Roma por brindarme su apoyo y confianza. GRACIAS.

A la Dra. Rosana Sánchez López por su paciencia, asesoría y por preocuparse en mi desarrollo académico. Gracias por permitirme crecer a su lado.

Al Dr. Alejandro Alagón Cano por su apoyo incondicional y por los momentos amenos que nos hace pasar en el laboratorio.

A mis grandiosos y viejos amigos que siempre me han acompañado Pilar, Maricela, Víctor, Azucena, Adriana y Jessica.

A las grandes personas que encontré en la universidad y conocí en Cuernavaca Karla, Candy e Iván.

A todos los integrantes y amigos del laboratorio que siempre me han apoyado Ariana, Claudia, Mabel, Alejandro Olvera “Pichón”, Alejandro Carvajal “Sauce”, Laura “Lauracha”, Héctor Cardoso “Gigio”, Felipe “Felipón”, Herlinda “Herli”, Blanca, Doña Leo, Angélica, Ricardo Mondragón, Héctor González “El Concen” y Gerardo Corzo.

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno

García
García
Francia
56 34 84 43
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
300033229

2. Datos del asesor

Dra.
Rosana
Sánchez
López

3. Datos del sinodal 1

Dr.
Luis Felipe
Jiménez
García

4. Datos del sinodal 2

Dra.
Patricia
Ramos
Morales

5. Datos del sinodal 3

M. en Ing.
Eduardo
Rodríguez
Bustamante

6. Datos del sinodal 4

M. en C.
Alfonso José
Vilchis
Pelayera

7. Datos del trabajo escrito

Determinación de las propiedades biológicas de una esfingomielinasa D fluorescente
quimérica: rGFP-Lb1
60 p.
2007

Índice general

Abreviaturas	V
Lista de Figuras y Tablas	VII
Resumen	1
1. Introducción	3
1.1 ¿Qué son las arañas?	3
1.1.1 Morfología	3
1.1.2 Taxonomía	5
1.2 Género <i>Loxosceles</i>	6
1.2.1 Distribución	7
1.2.2 Epidemiología	8
1.2.3 Loxoscelismo	9
1.3 El veneno de las arañas del género <i>Loxosceles</i>	10
1.3.1 Mecanismos de acción del veneno	11
1.3.2 Componentes del veneno	12
1.3.3 Esfingomielinasa D	13
1.4 Toxina recombinante de <i>L. boneti</i>	15
1.4.1 Purificación de la esfingomielinasa D de <i>L. boneti</i>	15
1.4.2 Expresión y purificación de la toxina recombinante de <i>L. boneti</i>	16
1.5 Características de la proteína verde fluorescente (GFP)	17
2. Antecedentes	18
3. Justificación y objetivos	19
3.1 Justificación	19
3.2 Objetivos	19
3.2.1 General	19
3.2.2 Particulares	19
4. Estrategia experimental	20
5. Materiales y métodos	21
5.1 Materiales	21
5.1.1 Soluciones y buffers generales	21
5.1.2 Buffers para cromatografía en sistema FPLC	22
5.1.3 Soluciones para la purificación por cromatografía de afinidad a níquel (Ni-NTA)	22
5.1.4 Soluciones para electroforesis de proteínas (SDS-PAGE)	22

5.1.5	Soluciones para medir la actividad de SMD	23
5.1.6	Vector de expresión, clonas, cepas bacterianas y medio de cultivo	24
5.1.7	Animales utilizados	26
5.2	Metodologías	26
5.2.1	Inducción de la expresión de proteínas recombinantes	26
5.2.2	Purificación por cromatografía de afinidad a níquel	26
5.2.3	Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	27
5.2.4	Diálisis	28
5.2.5	Purificación de proteínas por cromatografía de intercambio aniónico (FPLC)	29
5.2.6	Determinación de la concentración de proteínas (método Micro BCA, Pierce)	31
5.2.7	Determinación de la actividad de esfingomielinasa D	32
5.2.8	Espectrofotometría	34
5.2.9	Espectrofluorimetría	34
5.2.10	Determinación de la dosis letal media (DL ₅₀) en ratón	35
5.2.11	Dermonecrosis en conejos	35
6.	Resultados y discusión	36
6.1	Purificación de proteínas recombinantes (~27 y ~60 kDa) por cromatografía de afinidad a Ni-NTA	36
6.2	Cromatografía de intercambio iónico (FPLC)	37
6.3	Evaluación de la actividad de esfingomielinasa D (SMD) de las proteínas de 29 y 57 kDa	40
6.4	Caracterización de la proteína quimera rGFP-Lb1 (57 kDa)	42
6.4.1	Espectrofotometría	42
6.4.2	Espectrofluorimetría	43
6.5	Determinación de la actividad específica de SMD de rGFP-Lb1	45
6.6	Pruebas de letalidad en ratón	48
6.7	Pruebas de dermonecrosis en conejos	49
7.	Conclusiones	52
8.	Perspectivas	53
	Referencias	54
	Anexos	57

Abreviaturas

aa's	Aminoácidos
ADPH	Amplex™ Red (10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazina) (Molecular Probes)
AFP's	Proteínas autofluorescentes
APS	Persulfato de amonio
AU	Unidades de absorbancia
BCA	Ácido bicinconínico
C	Vía del Complemento
ChOx	Colina oxidasa (<u>C</u> holine <u>O</u> xidase)
DL ₅₀	Dosis letal media
DMSO anhidro	Dimetil sulfóxido anhidro
DO	Densidad óptica
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético, sal disódica dihidratada
FPLC	Cromatografía líquida de rápida resolución (<u>F</u> ast <u>P</u> rotein <u>L</u> iquid <u>C</u> hromatography)
g	Gramos
h	Horas
HCl	Ácido clorhídrico
His _{6x}	Serie de seis histidinas
HRP	Peroxidasa de rábano (Horseradish peroxidase)
IPTG	Isopropil-1- β-D-galactopiranósido
kDa	Kilodaltones
kg	Kilogramo
KU	Kilounidades
LB	Luria Bertani (medio de cultivo de <i>E. coli</i>)
Lb	<i>Loxosceles boneti</i>
Lb1	Esfingomielinasa D de <i>Loxosceles boneti</i> isoforma 1
LPA	Ácido lisofosfatídico
M	Molaridad
μl	Microlitro

ml	Mililitro
mM	Milimolar
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
mU	Miliunidades
MW	Masa molecular
MWM	Marcador de peso molecular
N	Normalidad
NaCl	Cloruro de sodio
Ni-NTA	Ácido nitrilotriacético conjugado a níquel
nm	Nanómetros
PBS	Buffer salino de fosfatos
pH	Potencial de iones hidronio
pI	Punto isoeléctrico
rGFP	Proteína verde fluorescente recombinante (<u>G</u> reen <u>F</u> luorescent <u>P</u> rotein) con una etiqueta His _{6x} en el extremo N-terminal.
rGFP-Lb1	Esfingomielinasa recombinante de <i>L. boneti</i> fusionada a GFP
rLb1C	Esfingomielinasa D recombinante isoforma 1 con una etiqueta de seis histidinas en el extremo carboxilo terminal
rLb1N	Esfingomielinasa D recombinante isoforma 1 con una etiqueta de seis histidinas en el extremo amino terminal
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SM	Esfingomielina
SMD	Esfingomielinasa D
SDS-PAGE	Gel de electroforesis de poliacrilamida (Polyacrylamide Gel Electrophoresis) SDS
TEMED	N,N,N',-tetrametil-etilen-diamina
Tris-base	Tris-(hidroxil)-aminometano base
U	Unidades
V	Volts o Voltios

Lista de Figuras y Tablas

I. Figuras

Figura 1. Morfología de las arañas.	4
Figura 2. Morfología de los quelíceros.	6
Figura 3. <i>Loxosceles boneti</i> Guerrero, México.	7
Figura 4. Mapa de distribución del género <i>Loxosceles</i> .	8
Figura 5. Propuestas de mecanismos de acción del veneno de <i>Loxosceles</i> en humano, con opciones de tratamiento.	11
Figura 6. Mecanismo de acción de la esfingomielinasa D.	14
Figura 7. Análisis del veneno de <i>L. boneti</i> .	16
Figura 8. Estructura terciaria de GFP.	17
Figura 9. Esquema de la estructura primaria de las proteínas rGFP-Lb1, rGFP y rLb1N.	18
Figura 10. Procedimiento para determinar la actividad de esfingomielinasa basado en el ensayo comercial (o kit) Amplex™ Red Sphingomyelinase Assay Kit; Molecular Probes.	33
Figura 11. Análisis electroforético en gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) de las fracciones obtenidas por cromatografía de afinidad a Ni-NTA.	37
Figura 12. Análisis por intercambio aniónico (FPLC) de la mezcla con las proteínas de 29 y 57 kDa obtenidas por Ni-NTA.	39
Figura 13. Análisis preliminar de actividad enzimática de las proteínas de 29 y 57 kDa.	41
Figura 14. Análisis espectrofotométrico de las proteínas rGFP, rLb1C y rGFP-Lb1.	43
Figura 15. Espectros de fluorescencia relativa de rLb1N, rGFP y rGFP-Lb1.	44
Figura 16. Actividad SMD de rGFP-Lb1, rLb1N y rGFP.	46
Figura 17. Cinética enzimática de SMD de rGFP-Lb1, rLb1N y rGFP.	47
Figura 18. Modelo de curva sigmoide dosis-respuesta para determinar la DL_{50} de rGFP-Lb1 en ratón.	48
Figura 19. Esquema de inoculación de rGFP-Lb1 en conejos.	49
Figura 20. Dermonecrosis en conejos.	51

II. Lista de Tablas

Tabla 1. Rendimiento en la purificación de las proteínas de 29 y 57 kDa.	38
Tabla 2. Longitud de onda de los picos de máxima excitación y emisión de diferentes versiones comerciales de GFP y de las proteínas analizadas en este trabajo.	45
Tabla 3. Comparación de las actividades específicas (SMD) de rLb1N y rGFP-Lb1.	47
Tabla 4. DL ₅₀ de rGFP-Lb1 y rLb1N en ratones.	48

Resumen

De las 34,000 especies de arañas descritas hasta el momento, sólo pocas son consideradas como peligrosas para los humanos; tal es el caso de los géneros *Latrodectus*, *Loxosceles*, *Atrax*, entre otros. Las arañas del género *Loxosceles*, mejor conocidas como violinistas (por la silueta en forma de violín en la parte dorsal de su cefalotórax), son capaces de producir un grado de envenenamiento severo conocido como loxoscelismo. La relevancia de este género radica en su amplia distribución, pudiéndose encontrar en casi cualquier tipo de hábitat. En México se estiman alrededor de 40 especies de *Loxosceles*, de las 100 descritas a nivel mundial.

En los humanos el veneno de las arañas violinistas puede provocar daños a nivel cutáneo (lesiones necróticas en la piel y tejido subcutáneo) o, en menor proporción, lesiones víscero-cutáneas (coagulación intravascular diseminada y fallas renales). Actualmente se sabe que el componente mayoritario del veneno de las violinistas es la esfingomielinasa D (SMD), enzima responsable de desencadenar las reacciones que conducen a las lesiones cutáneas y, posiblemente, a las víscero-cutáneas. Sin embargo, aún falta identificar el sustrato sobre el cuál actúa la SMD *in vivo*.

Con el propósito de estudiar la posible interacción SMD-células en el loxoscelismo, se generó una proteína recombinante quimérica, rGFP-Lb1, correspondiente a la SMD isoforma 1 de *L. boneti* (Lb1) fusionada a un marcador fluorescente tipo GFP (green fluorescent protein). Dicha quimera pudiera ser una valiosa herramienta para estudios histopatológicos del loxoscelismo. Por lo cual, en el presente trabajo se evaluó la expresión, purificación y caracterización de la quimera rGFP-Lb1.

La proteína rGFP-Lb1, cuyo extremo N-terminal incluye una serie de 6 histidinas, fue expresada en *E. coli* y purificada por cromatografía de afinidad a níquel. El análisis de las fracciones cromatográficas mostró la co-purificación de dos proteínas: una de 57 kDa que corresponde al tamaño esperado para la quimera rGFP-Lb1 y otra de 29 kDa. Una segunda etapa de purificación por FPLC de intercambio aniónico permitió la separación de las proteínas. Los análisis por espectrofotometría y espectrofluorimetría demostraron que ambas proteínas presentan propiedades semejantes a las de la proteína rGFP utilizada en este estudio. Sin embargo, sólo la proteína de 57 kDa (rGFP-Lb1) presentó una actividad de SMD, estequiométricamente comparable a la de la proteína recombinante de la isoforma 1

de *L. boneti* (rLb1N). De igual manera, rGFP-Lb1, tiene la misma capacidad, en términos estequiométricos que rLb1N para causar dermonecrosis en conejos y letalidad en ratón.

Cabe mencionar que la toxina quimérica presenta una gran desventaja en cuanto a su estabilidad, ya que si bien no pierde su actividad enzimática, la proteína tiende a degradarse dependiendo de los lotes. Esto ha frenado la evaluación del potencial de rGFP-Lb1 en estudios histopatológicos del loxoscelismo. En efecto, se realizaron experimentos preliminares, en los cuales células en cultivo fueron incubadas en presencia de la toxina quimérica. La asociación de la rGFP-Lb1 a las células se valoró por análisis de microscopía confocal o epifluorescente, respaldados con ensayos de Western blot. Los resultados obtenidos en esta etapa no han sido satisfactorios ni reproducibles. Su interpretación es más complicada, especialmente cuando es difícil evaluar los niveles de degradación de rGFP-Lb1 en presencia de células en cultivo. Por lo anterior, estos resultados no fueron incluidos en este manuscrito.

Capítulo 1. Introducción

1.1 ¿Qué son las arañas?

Las arañas, los escorpiones, las garrapatas y los ácaros son artrópodos pertenecientes a la clase Arachnida; se pueden encontrar en casi cualquier hábitat del mundo, desde los acuáticos hasta los terrestres. Forman una de las clases más numerosas del reino animal con alrededor de 60,000 especies; 34,000 de las cuales constituyen al orden Araneae, conformado por las arañas [1, 2]. Todas las arañas son venenosas, pero sólo pocas pueden causar un envenenamiento severo en los humanos y animales; tal es el caso de los géneros *Latrodectus*, *Loxosceles*, *Atrax*, *Phoneutria* y *Lycosa*. Los géneros *Latrodectus* y *Loxosceles* ocupan los primeros lugares en cuanto a número de accidentes y peligrosidad a nivel mundial [3].

Las arañas no son agresivas de forma natural pero atacan cuando se sienten agredidas o cuando necesitan alimentarse. Las arañas son carnívoras y se alimentan de presas vivas, principalmente de insectos. Una vez que capturan la presa, le inyectan veneno y enzimas digestivas a través de sus colmillos. El veneno le causa parálisis a la presa y las enzimas empiezan su digestión [2].

La mordedura de las arañas grandes (como las tarántulas) en los humanos puede ser dolorosa, a diferencia de las ocasionadas por arañas pequeñas, cuya mordedura no logra atravesar la piel de los humanos. Sin embargo, son las especies pequeñas las consideradas como peligrosas para el humano, ya que su veneno es capaz de actuar sobre la dermis o las terminales nerviosas, produciendo lesiones necróticas, dolor intenso, entre otras complicaciones.

1.1.1 Morfología

Morfológicamente el cuerpo de las arañas está dividido en dos partes principales, una porción anterior llamada prosoma o cefalotórax y una porción posterior, conocida como opistosoma o abdomen, tal como se ilustra en la Figura 1 [1, 4]. Ambas partes se unen por una cintura estrecha denominada pedicelo, la cual brinda flexibilidad a las arañas

para hacer uso de la seda secretada por las hileras [2, 5]. Las hileras o hilanderas son apéndices posteriores localizadas en el abdomen de las arañas y están unidas a una glándula productora de seda [2].

Algunas de las funciones del cefalotórax son la locomoción, la alimentación y la integración de los nervios. Mientras que el abdomen realiza las funciones vegetativas como la digestión, la circulación, la respiración, la reproducción, la producción de seda y la excreción (principalmente de cristales de guanina) [1]. Cada araña presenta en el cefalotórax cuatro pares de patas locomotoras, un par de quelíceros, dos pedipalpos y, generalmente, cuatro pares de ojos simples denominados ocelos (aunque algunas arañas pueden contar solamente con tres pares) [1, 2]. Los quelíceros son colmillos modificados asociados a las glándulas de veneno; mientras que los pedipalpos son modificaciones de patas a palpos, los cuales funcionan como apéndices sensoriales para romper y masticar a las presas. Los ocelos son capaces de detectar la luz, sin llegar a formar imágenes [2]. En las arañas cazadoras los ocelos tienden a ser de mayor tamaño, a diferencia de las que tejen telarañas elaboradas cuyos ocelos son de menor tamaño.

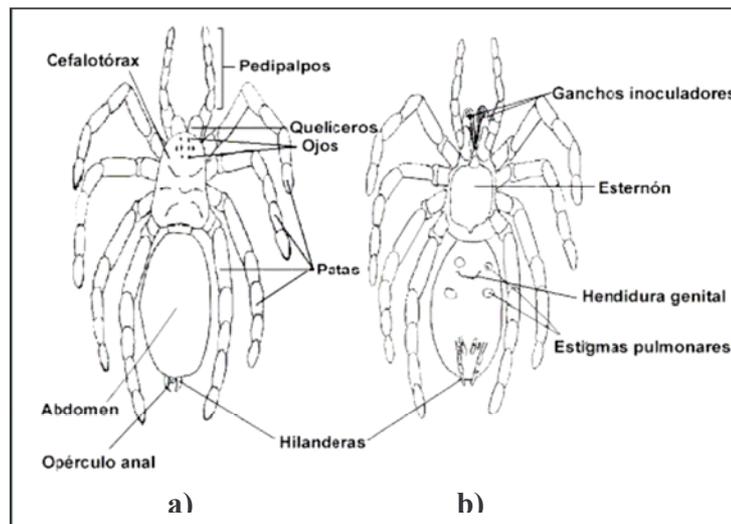


Figura 1. Morfología de las arañas. a) vista dorsal y b) vista ventral.

Tomado de Quintana y Patiño, 2002 [6].

1.1.2 Taxonomía

Al igual que los insectos, las arañas pertenecen al phylum Arthropoda. Los insectos están incluidos en el subphylum Urinamia, mientras que las arañas pertenecen al subphylum Chelicerata [7]. A continuación se muestra la clasificación taxonómica de las arañas de acuerdo a Quintana, J. C. y Patiño, R. O. publicada en el 2002 [6]:

Reino:	Animalia
Phylum:	Arthropoda
Subphylum:	Chelicerata
Clase:	Arachnida
Orden:	Araneae
Suborden:	Mesothelae
Suborden:	Labidognatha
	Infraorden: Araneomorphae
Suborden:	Orthognatha
	Infraorden: Mygalomorphae

El orden Araneae se divide en tres subórdenes. El suborden Mesothelae representa a las arañas más antiguas filogenéticamente y una de sus principales características es su abdomen claramente segmentado [1]; la única familia en este suborden es Liphistiidae, propia del sudeste asiático [8].

El suborden Labidognatha, infraorden Araneomorphae, incluye más del 90% de todas las especies descritas y son consideradas como las arañas verdaderas. Este suborden incluye a los géneros considerados como los de mayor relevancia médica [1]. Sus quelíceros se encuentran en el extremo anterior del cefalotórax y al morder a la presa se mueven horizontalmente como un par de tenazas (Figura 2a). Su glándula venenosa se localiza entre el cefalotórax y el quelíceros [1]. De las 100 familias de arañas conocidas, 90 pertenecen al infraorden Araneomorphae [4], entre las que se incluyen la familia Sicariidae, Theridiidae y Salticidae.

En el suborden Orthognatha, infraorden Mygalomorphae, se encuentran las arañas conocidas como tarántulas. A diferencia de las arañas verdaderas, las tarántulas clavan sus quelíceros verticalmente sobre la presa con un movimiento antero-posterior (Figura 2b); además de que sus glándulas de veneno se encuentra totalmente en los quelíceros [1,7]. Las dos familias que representan este suborden son: Theraphosidae y Ctenizidae [8].

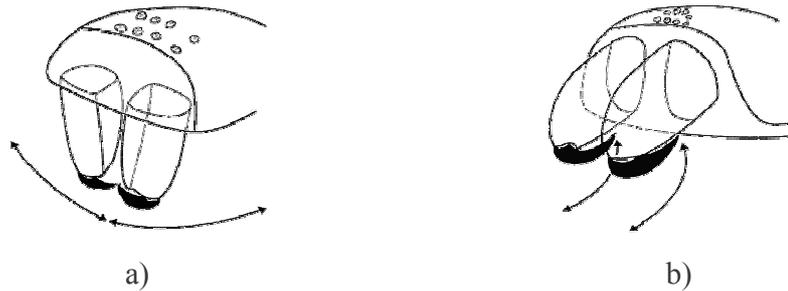


Figura 2. Morfología de los quelíceros. Características físicas y el movimiento de los quelíceros de los subórdenes Labidognatha (a) y Orthognatha (b). Tomado de Foelix, 1996 [1].

1.2 Género *Loxosceles*

La palabra *Loxosceles* proviene del griego λοξος: curvas y κελος: patas; dicho término se le dio a este género por el aspecto curvo de las patas que tienen estas arañas [3]. El género *Loxosceles*, perteneciente a la familia Sicariidae (Labidognatha: Araneomorpha), incluye las especies de arañas conocidas con diferentes nombres, tales como: arañas marrón, del rincón o violinistas [5]. El nombre de violinistas se les ha dado por la silueta en forma de violín localizada en la parte dorsal de su cefalotórax. Mientras que, el nombre de arañas del rincón les fue asignado porque es muy común encontrarlas detrás de los muebles, entre la ropa y en los lugares oscuros de las viviendas.

La longitud corporal de estas arañas varía entre 8 y 13 milímetros; sin embargo, el hecho de que sus patas sean largas y delgadas implica que la longitud total de la araña pueda alcanzar hasta cuatro centímetros [5]. Estas arañas cuentan con seis ojos, dispuestos en tres díadas. Su coloración es generalmente marrón (Figura 3), aunque pueden tener tonalidades desde café hasta amarillo pálido [5, 8].



Figura 3. *Loxosceles boneti* Guerrero, México. Fotografía Alejandro Alagón.

Las arañas del género *Loxosceles* tienen un hábitat principalmente rural pero han logrado adaptarse a la vida urbana. Se les puede hallar bajo piedras, hojarasca, en el interior y exterior de las casas o edificios, etc., particularmente en lugares oscuros. En condiciones de hábitat adecuado estas arañas son capaces de colonizar nuevos sitios, siendo transportadas pasivamente en bultos u objetos acarreados por el mismo ser humano [9].

1.2.1 Distribución

Las arañas *Loxosceles* tienen una distribución cosmopolita, habitan principalmente las zonas templadas y tropicales de América, Oceanía, Asia, África y Europa [5, 10]. Actualmente se han descrito 100 especies de *Loxosceles* alrededor del mundo, 50 de las cuales se distribuyen en América. En México, se han reportado 39 especies distribuidas a lo largo del país [3, 4], siendo *L. boneti* una de las más abundantes en el centro y suroeste del país [4].

En Argentina, el género se encuentra representado principalmente por *L. laeta*, aunque también se ha reportado la presencia de *L. hirsuta* en Buenos Aires [3]. En Brasil, las especies predominantes de *Loxosceles* son *L. gaucho*, *L. laeta* y *L. intermedia*. Mientras que en Chile y Perú puede encontrarse principalmente a *L. laeta*, aunque esta especie también se ha encontrado en Australia, Finlandia, Rusia, Estados Unidos y la costa del

Mediterráneo [5]. Por su parte *L. rufescens* está ampliamente distribuida en varias partes del mundo como: Estados Unidos, Europa y África. Esta especie ha sido introducida accidentalmente en Australia, ver Figura 4 [5].

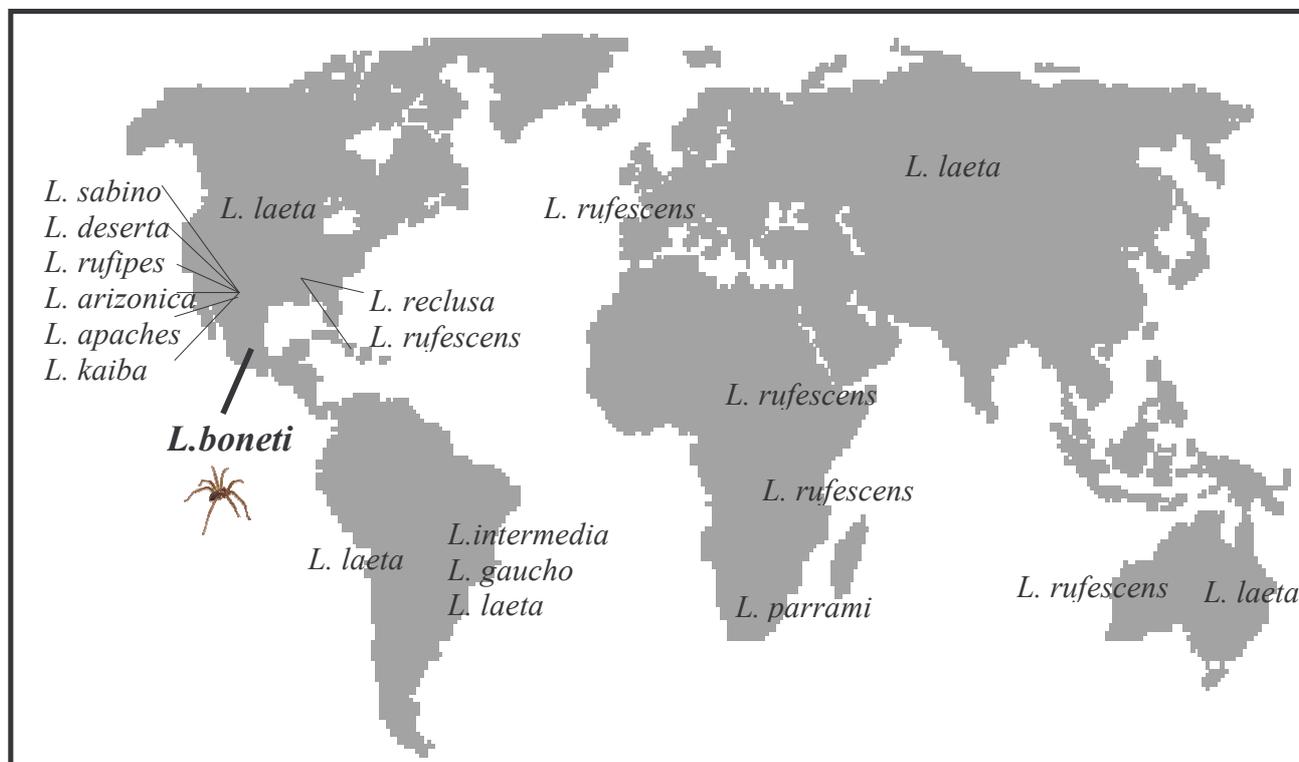


Figura 4. Mapa de distribución del género *Loxosceles*. Se muestran 13 de las 100 especies de *Loxosceles* identificadas a nivel mundial. Modificado de Hogan, *et al.*, 2004 [5].

1.2.2 Epidemiología

El loxoscelismo tiene relevancia médica por la cantidad de accidentes anuales reportados a nivel mundial. En el 2001 se reportaron 10,000 casos de mordeduras de arañas en Estados Unidos, de los cuales 2,566 fueron provocados por arañas del género *Loxosceles* [5]. En este país los envenenamientos ocurren generalmente en la región sureste, en Tennessee, Arkansas, Missouri y Kansas, siendo *L. reclusa* y *L. laeta* las especies responsables de la mayoría de las mordeduras [5]. En Brasil, durante el 2002, se reportaron 3,453 casos de mordeduras de *Loxosceles*, siendo *L. gaucho* y *L. intermedia* las especies con mayor incidencia [12].

En Chile y Perú, los casos que se presentan están asociados principalmente a *L. laeta* [12]. En Argentina, el loxoscelismo (generalmente provocado por *L. laeta* y *L. intermedia*) representa el 4% del total de accidentes provocados por animales venenosos, ocupando el segundo lugar de incidentes causados por arañas [3, 12].

En el caso de México los estudios epidemiológicos del loxoscelismo son muy recientes y reportan que la mayoría de los envenenamientos son causados por *L. boneti* y *L. deserta* en el centro y norte del país, respectivamente [12]. En el 2000, se reportaron 3,545 casos de envenenamiento por arañas del género *Loxosceles*; sin embargo, no se reportó ningún fallecimiento [4].

1.2.3 Loxoscelismo

La relevancia de este género de arañas es, principalmente, de tipo clínico, ya que su mordedura es capaz de provocar un envenenamiento tan severo en los humanos que puede culminar en la muerte [3]. Los accidentes producidos por arañas *Loxosceles* pueden ser de diagnóstico difícil dado que en ocasiones la araña o su mordedura pasan inadvertidas; la aparición de síntomas no es inmediata y algunos de los mismos son inespecíficos [3].

El primer caso documentado de envenenamiento por mordedura de *Loxosceles* se reportó en 1879 en Tennessee, donde el paciente desarrolló fiebre, ictericia y hematuria [5]. 50 años más tarde, en Chile, se describieron por primera vez las lesiones necróticas causadas en la piel por la mordedura de arañas *Loxosceles*. Estos datos fueron seguidos por reportes de casos en Brasil y Estados Unidos [5].

El loxoscelismo es la condición clínica causada por el envenenamiento de las arañas *Loxosceles* [10]. La mordedura de una *Loxosceles* puede provocar lesiones dermonecroticas (loxoscelismo cutáneo), y en algunos casos se pueden presentar lesiones víscero-cutáneas graves que pueden desencadenar en coma y muerte (loxoscelismo víscero-cutáneo).

Loxoscelismo cutáneo

Es la manifestación más frecuente (85–97% de los casos reportados) de envenenamiento por mordedura de arañas *Loxosceles* [6]. Si bien, la mordedura normalmente pasa desapercibida, en algunos casos y pocas horas después del accidente, el

paciente comienza a sentir dolor, siendo en ocasiones muy intenso. En torno al área de la mordedura se produce un edema severo y eritema. Entre 12 a 48 horas después aparece una ampolla rodeada de una zona endurecida. La zona afectada cambia de color, pasa del rojo al negro. En días subsecuentes, la zona dermonecrotica es muy evidente y puede variar de dos a treinta centímetros de diámetro. Siete días después de la mordedura aparece una costra y bajo ésta hay un área de ulceración. El proceso de regeneración y cicatrización del tejido dañado es muy lento, pudiendo tomar entre 4 a 8 semanas [3, 6]. Para el tratamiento de la lesión se puede requerir, en algunos casos, injertos de piel.

La histología de la lesión confirma el edema y reporta acumulación de células inflamatorias, vasodilatación, coagulación intravascular, hemorragia, adelgazamiento y degeneración del endotelio vascular, desorganización y destrucción de las fibras de la matriz extracelular. Todos estos fenómenos contribuyen a la producción de la necrosis tisular [3, 6, 11].

Loxoscelismo viscero-cutáneo

Este grado de envenenamiento es una forma de loxoscelismo poco común, que representa entre el 2-15% de los casos [3]. Los signos sistémicos se observan en las primeras 24 horas y se deben principalmente a las alteraciones hematológicas (coagulación intravascular diseminada, desfibrinación, anemia e ictericia) y fallas renales (hemoglobinuria e insuficiencia renal aguda), que pueden conducir a la muerte del paciente [6].

Estudios de biopsias renales han mostrado que al inocular el veneno en ratones, ocurren alteraciones tales como: elevados niveles de urea en sangre, presencia de eritrocitos en el espacio de Bowman, colapso glomerular, edema intersticial, deposición de material eosinofílico en el lumen del túbulo, entre otros; ver Figura 5 [13].

1.3 El veneno de las arañas del género *Loxosceles*

Las glándulas productoras de veneno son de secreción apócrina, disgregables y producen muy poco veneno, en comparación con otras arañas. Se sabe que por estimulación

eléctrica (1.5 V) se produce alrededor de 100 µg de veneno por araña [6], en un volumen de 0.15-0.45 µl [3].

1.3.1 Mecanismos propuestos de acción del veneno

Uno de los mecanismos de acción del veneno de *Loxosceles*, propuesto por Hogan y colaboradores en 2004, sostiene que las lesiones dermonecroticas resultan del efecto de la interacción inicial del veneno con el tejido. Esto lleva a reacciones como: activación del complemento, migración de neutrófilos polimórficos, liberación de enzimas proteolíticas, liberación de citocinas y quimiocinas, agregación de plaquetas y alteraciones en los flujos sanguíneo y linfático resultando en edema e isquemia, con desarrollo de necrosis como se indica en la Figura 5 [5].

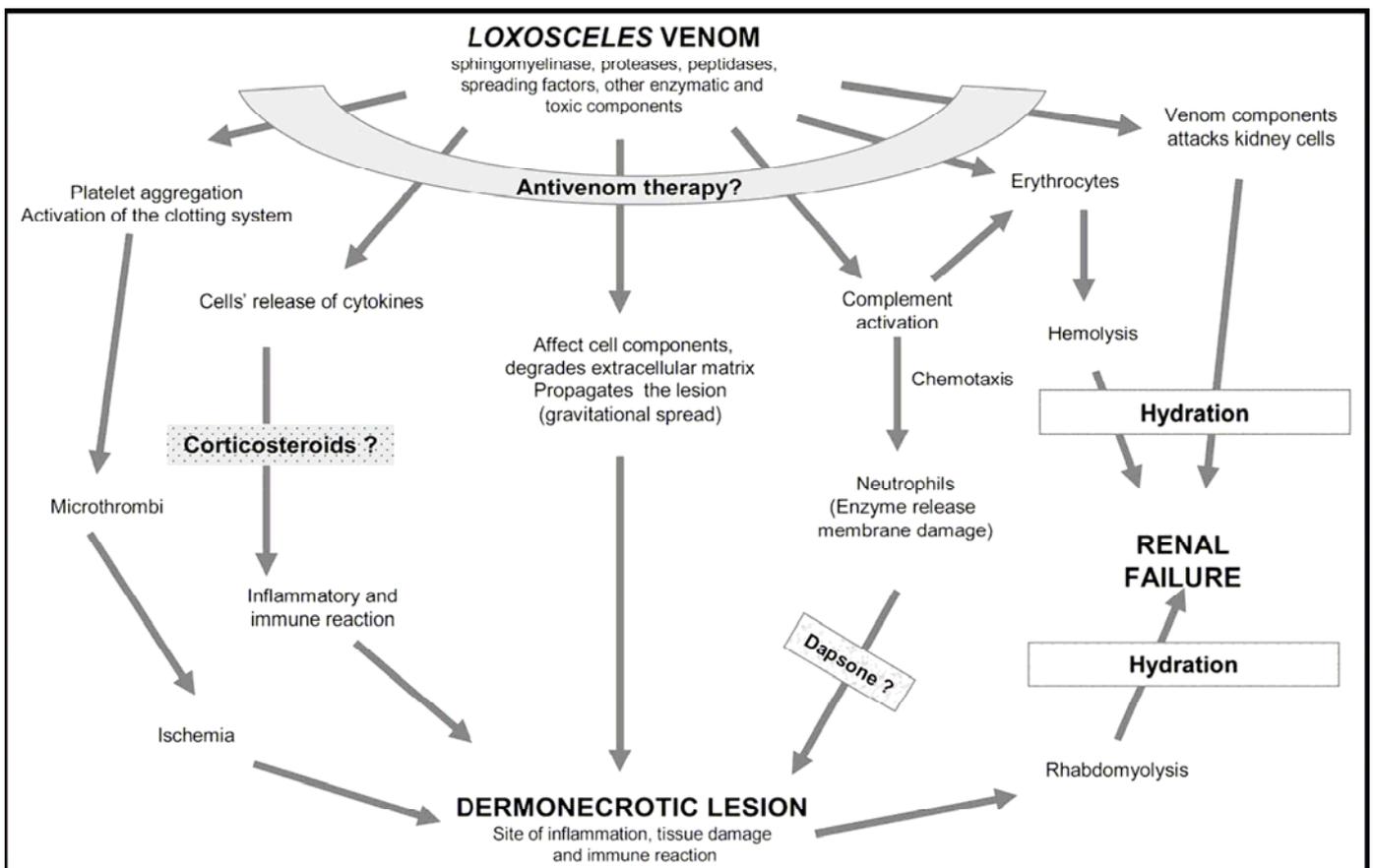


Figura 5. Propuestas de mecanismos de acción del veneno de *Loxosceles* en humano, con opciones de tratamiento. Tomado de Hogan, *et al.*, 2004 [5].

Investigaciones con eritrocitos incubados en presencia de SMD muestran inducción de la activación de metaloproteinasas unidas a la membrana [14]. Además SMD aumenta la susceptibilidad de activación de la ruta alternativa del complemento (C), ya que las metaloproteinasas inducen el corte de glicoporinas (importantes reguladores para la activación de C), ver Figura 5. La activación de la ruta clásica de C en los eritrocitos, por la acción de SMD, induce la pérdida de la asimetría de la membrana, lo que contribuye a la inducción de hemólisis [14]. Otros estudios muestran que SMD activa las células polimorfonucleares y a las plaquetas; ver Figura 5 [5].

1.3.2 Componentes del veneno

El veneno de las arañas *Loxosceles* está formado por tres grupos de proteínas: las de bajo peso molecular (5 a 10 kDa), las proteínas dermonecroticas (30 a 40 kDa) y las metaloproteasas, proteínas de alto peso molecular (60 a 90 kDa) [1]. Entre los componentes de bajo peso molecular identificados en el veneno de las *Loxosceles* figuran: histaminas, poliaminas (espermina), serotonina y ácido gama aminobutírico. Mientras que los de mayor peso molecular incluyen a las enzimas esterasas, hialuronidasas, fosfatasa alcalina, fosfohidrolasa, esfingomielinasa D, ribonucleasa y desoxiribonucleasa [5, 12]. Algunas de estas toxinas proteicas han sido descritas biológica y bioquímicamente.

A continuación se resumen algunas características asociadas a algunos de los componentes del veneno:

Componentes enzimáticos

1. Esfingomielinasa D. Es el principal componente proteico del veneno y el responsable de causar dermonecrosis en los humanos [12].
2. Proteasas. Se considera que hidrolizan proteínas de la matriz extracelular [15]. El veneno de *L. intermedia* contiene dos metaloproteasas, la loxolisina A (con actividad fibrinogenolítica y fibronectinolítica) y la loxolisina B (con actividad gelatinolítica) [12].
3. Hialuronidasas. Se considera que actúan como agentes de dispersión del veneno, pues degradan la estructura de la matriz extracelular [15].

Componentes no proteicos

1. Las histaminas (amina biogénica), en general, funcionan como vasodilatadores [16]. Sin embargo, en el caso de las histaminas de algunos vertebrados e invertebrados son potentes antagonistas de receptores de glutamato y, si bien no son consideradas toxinas, pueden producir dolor intenso al ser inoculadas en mamíferos [12].
2. Las poliaminas pueden metabolizarse a peróxido de hidrógeno, amonio y acroleína, productos tóxicos para la célula, actuando como toxinas urémicas que conducen a fallas renales [17].

1.3.3 Esfingomielinasa D

La esfingomielinasa D (SMD), el componente proteico mayoritario del veneno de *Loxosceles*, es una enzima con un peso molecular de 30 a 33 kDa. Existen varias isoformas de esfingomielinasas D, dependiendo de la especie de *Loxosceles*. En el caso particular del veneno de *L. boneti*, se han descrito tres isoformas, siendo dos de ellas enzimáticamente activas [19]. Esta enzima es responsable de desencadenar diferentes mecanismos que conducen a las respuestas inflamatorias y lesiones necróticas, entre otras [15]. La actividad de SMD no es exclusiva de las arañas del género *Loxosceles*; también es producida como exotoxina por los patógenos *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Corynebacterium ulcerans* y *Arcanobacterium haemolyticum*. Tanto la SMD de *Loxosceles* como la de *C. pseudotuberculosis* producen efectos como: agregación plaquetaria, hiper-permeabilidad endotelial, hemólisis dependiente del Complemento y reclutamiento de neutrófilos [18].

La SMD hidroliza esfingolípidos tales como esfingomielina y lisofosfatidilcolina [15, 20]. La esfingomielina se localiza en la parte exterior de la membrana plasmática de células como eritrocitos y células del epitelio vascular [20]. Se sabe que la SMD actúa sobre el enlace fosfoéster de la esfingomielina, liberando una molécula de fosfoceramida y otra de colina, ver Figura 6a [12, 21].

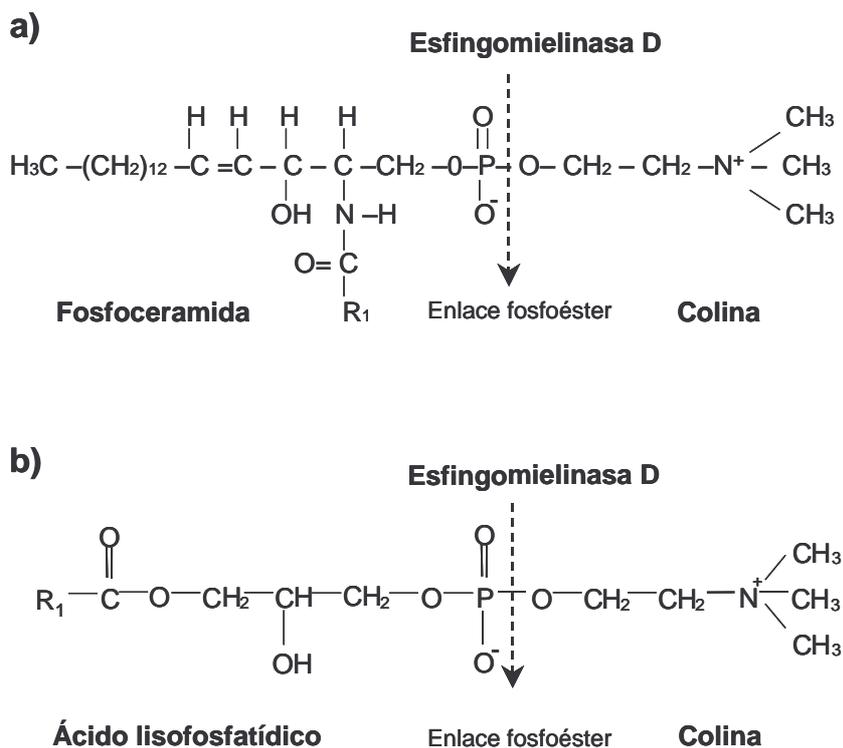


Figura 6. Mecanismo de acción de la esfingomielinasa D. La flecha indica el sitio de corte de la enzima en cada uno de los sustratos: esfingomielina (a) y lisofosfatidilcolina (b). R₁, acilo sustituyente variable. Figuras modificadas a partir de Ramos-Cerrillo, 2002 [12] (a) y de Ramos-Cerrillo, 2005 [4] (b).

Por otro lado se ha demostrado que la esfingomielinasa D posee actividad de lisofosfolipasa D, es decir, puede hidrolizar a la lisofosfatidilcolina. La hidrólisis enzimática de la lisofosfatidilcolina produce la liberación de la cabeza polar (colina) de este fosfolípido, generando ácido lisofosfatídico; ver Figura 6b [4, 20]. Entre las propiedades del ácido lisofosfatídico reportadas en la literatura se puede mencionar que promueve la infiltración de neutrófilos, la agregación plaquetaria, una disfunción de la barrera endotelial e induce respuestas pro-inflamatorias [20].

Para efectos de identificar los mecanismos que producen las lesiones dermonecróticas, es necesario conocer el o los sustratos que utiliza la SMD en el sitio de la mordedura, siendo la lisofosfatidilcolina y la esfingomielina dos de los posibles candidatos. Esto permitirá aclarar cuáles son los procesos que conllevan a las lesiones cutáneas y posiblemente a las víscero-cutáneas.

1.4 Toxina recombinante de *L. boneti*

Si bien la SMD es la proteína más abundante en el veneno (lo que facilita su purificación), el paso verdaderamente limitante en la obtención de esta enzima pura se refiere a la cantidad de veneno disponible. En la práctica, la toxina se purifica a partir del extracto de glándulas, o bien por estimulación eléctrica. Esto implica que se debe contar con una gran cantidad de especímenes. Es por ello que se ha recurrido a las técnicas de expresión de proteínas recombinantes. A continuación se describe, a grandes rasgos, la estrategia seguida por el grupo del Dr. Alagón para purificar la SMD a partir del extracto glandular, clonar el cDNA que codifica para esta toxina, así como para expresar y purificar la toxina recombinante SMD isoforma 1 de *L. boneti* (rLb1N).

1.4.1 Purificación de la esfingomielinasa D de *L. boneti*

Partiendo del extracto de 500 glándulas de *L. boneti*, se realizó una purificación por cromatografía de exclusión molecular en gel a cuyas fracciones les fue medida la DO a 260 y 280 nm (Figura 7). Se obtuvieron cuatro picos (pico I, II, III y IV; Figura 7a), cuyos componentes se analizaron por SDS-PAGE (Figura 7b). El pico I (carril 2) estaba enriquecido con hemocianina, mientras que el pico II (carril 3) contenía una proteína de ~32 kDa. Los picos III y IV (carriles 4 y 5, respectivamente) no contenían proteínas de alto peso molecular. Sólo la mezcla de las fracciones que conforman el pico II presentó actividad SMD, ver Figura 7b [12, 19], por lo que los componentes del pico II fueron resueltos por cromatografía de intercambio catiónico en sistema FPLC, obteniéndose tres picos correspondientes a las isoformas Lb1, Lb2 y Lb3 de la SMD, respectivamente (recuadro Figura 7a y Figura 7c). Las isoformas Lb1 y Lb2 presentaron actividad SMD, no siendo así para el caso de la isoforma 3 [19].

Finalmente pruebas de dermonecrosis en conejo y letalidad en ratón revelaron que la SMD conserva las propiedades biológicas asociadas a la patología del veneno.

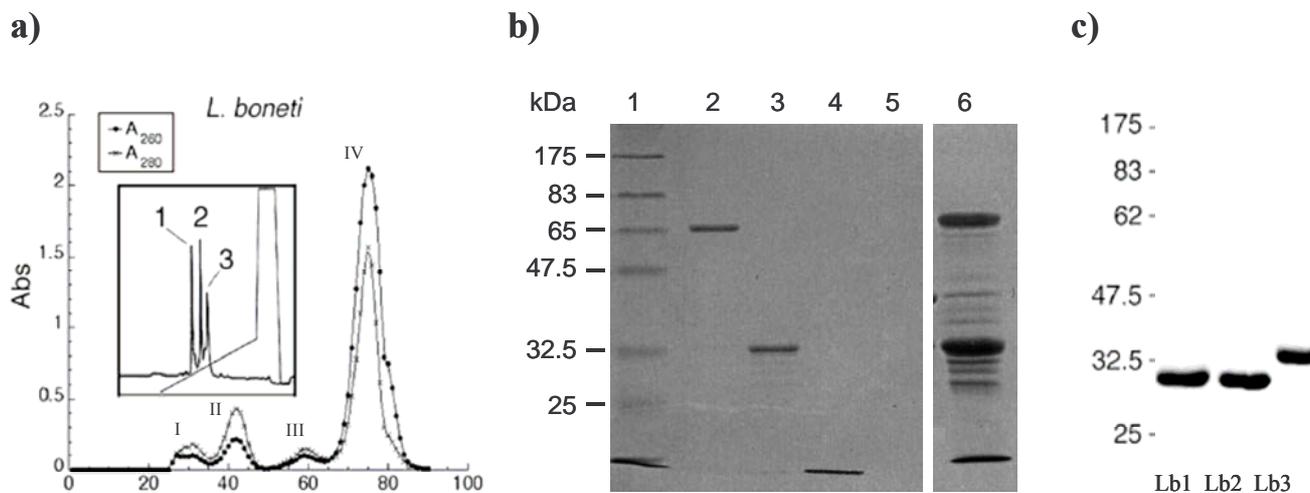


Figura 7. Análisis del veneno de *L. boneti*. a) Absorbancia a 260 y 280 nm de las fracciones obtenidas por cromatografía de exclusión molecular en gel indicando la resolución de cuatro picos principales (I, II, III y IV). Recuadro superior, cromatograma (FPLC) de las fracciones que conforman el pico II indicando las tres isoformas de SMD (1,2 y 3, respectivamente). b) Análisis por SDS-PAGE de los picos I, II, III y IV (carriles 2 a 5, respectivamente); carril 6, extracto glandular de veneno de *L. boneti*; carril 1, marcador de peso molecular. c) Análisis por SDS-PAGE de las tres isoformas de SMD (Lb1, Lb2 y Lb3, respectivamente). Esta Figura ilustra versiones modificadas de la Figura 1 de Ramos-Cerrillo, et al., 2004 [19] (a) y c)) y de la Figura 10 de Ramos-Cerrillo, 2002 [12] (b)).

1.4.2 Expresión y purificación de la toxina recombinante de *L. boneti*

A partir de RNA de glándulas de *L. boneti* y oligonucleótidos degenerados basados en la secuencia N-terminal de Lb1, en el laboratorio del Dr. Alagón se logró clonar el cDNA que codifica para la isoforma Lb1 activa. Con apoyo de técnicas de biología molecular se expresó el cDNA de Lb1, produciendo una proteína recombinante, soluble y activa, con una serie de 6 histidinas (His_{6X}) en el extremo amino terminal, rLb1N [19]. Pruebas de actividad de SMD, de dermonecrosis en conejos y de letalidad en ratón, mostraron que la toxina recombinante contaba con actividades enzimática y biológica similares a las de la enzima contenida en el veneno [4].

1.5 Características de la proteína verde fluorescente (GFP)

La proteína verde fluorescente (*Green Fluorescent Protein*), fue descubierta durante el estudio de la bioluminiscencia en la medusa *Aequorea victoria*, al mismo tiempo que se descubrió a su proteína acompañante, aequorina, una proteína quimioluminiscente. La emisión de la luz azul lleva a aequorina a excitar a la GFP [22].

La GFP es una proteína pequeña de 28 kDa cuya estructura terciaria, semejante a un barril (TIM barrel), está formada por 11 hojas β ligeramente torcidas alrededor de una α hélice, la cual recorre el eje del cilindro. Dicha estructura es conocida como “ β -can” y se ilustra en Figura 8 [23]. La fluorescencia de GFP es causada por la ciclización de tres aminoácidos: serina 65, tirosina 66 y glicina 67. La GFP silvestre excita a 395 y 470 nm y emite a un máximo de 509 nm [22].

Debido a su baja toxicidad celular y a no requerir de sustratos o anticuerpos específicos para su detección, la GFP ha sido utilizada como un marcador celular, como un gen reportero, como un indicador de la expresión génica, entre otros [24].

En esta tesis se utilizó la versión *red-shifted* de GFP (rsGFP; AFP-Tag[™] Quantum, una mutante comercial de GFP), la cual tiene sólo un máximo de excitación a 473 nm y un máximo de emisión a 509 nm [25]. Para facilitar su purificación, esta versión de GFP se expresó como proteína recombinante marcada con una extensión de histidinas (His_{6x}) en su extremo N-terminal. La nomenclatura utilizada en este manuscrito para referirse a esta proteína fue rGFP.

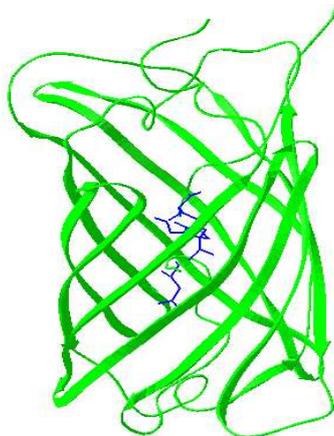


Figura 8. Estructura terciaria de GFP. En verde se muestra la estructura β -can de la GFP y en azul se indican los aminoácidos implicados en la ciclización para formar el cromóforo [26].

Capítulo 2. Antecedentes

Con el objeto de contar con una herramienta útil en la caracterización de la actividad biológica *in vivo* de la SMD de *Loxosceles*, se construyó un cDNA híbrido que codifica para una proteína quimera rGFP-Lb1, cuyo extremo N-terminal incluye una serie de 6 histidinas (His_{6x}). El vector de expresión utilizado fue pQE30, de la serie QIAexpressionist™ (QIAGEN), de donde la construcción obtenida se define como pQE30-GFP-Lb1 ver sección Anexos I. La Figura 9 ilustra la estructura primaria, así como la masa molecular y el punto isoeléctrico (pI) teóricos de la proteína quimera. Como referencia, se indican los datos correspondientes a rGFP y rLb1N, ambas, también con una etiqueta His_{6x} en el extremo N-terminal.

Como se puede observar, la proteína quimera cuenta con aproximadamente el doble de masa molecular (~60 kDa), respecto a rLb1N (~32 kDa) y rGFP (~28 kDa). Por ello, podemos considerar que 2 µg de rGFP-Lb1 equivalen estequiométricamente a ~1 µg de rLb1N o de rGFP (Figura 9).

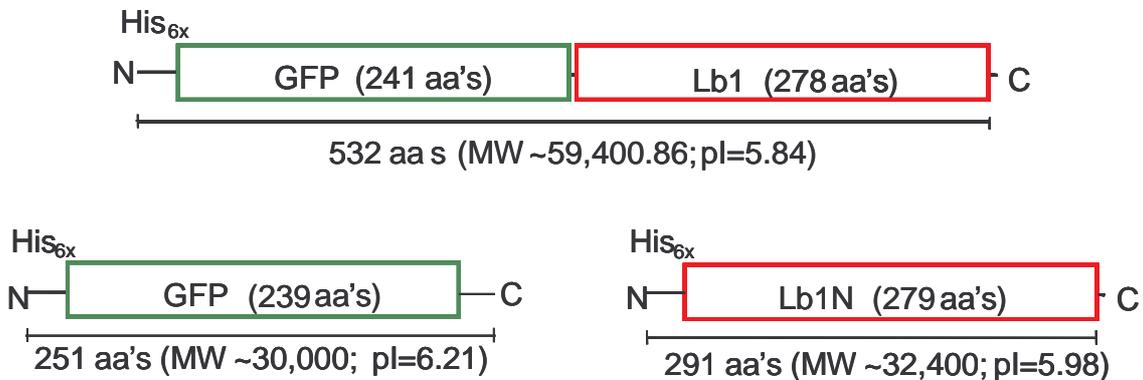


Figura 9. Esquema de la estructura primaria de las proteínas rGFP-Lb1, rGFP y rLb1N. Los valores de masa molecular y pI teóricos de cada proteína se mencionan bajo la estructura primaria correspondiente [28].

El ensayo preliminar de la expresión en *E. coli* BL21 (DE3) transformada con pQE30-GFP-Lb1 y su análisis por cromatografía de afinidad a níquel (Ni-NTA), mostró la producción y enriquecimiento de dos proteínas que co-elúan con 100 mM imidazol: una de ~60 kDa, del tamaño esperado para la quimera rGFP-Lb1 y otra de ~27 kDa, que pudiera corresponder a

un producto de degradación de la quimera, o bien, a un problema de traducción generando una versión truncada de la quimera. Las fracciones de co-elución presentaron actividad de esfingomielinasa D y una intensidad de color verde característico de GFP.

Capítulo 3. Justificación y Objetivos

3.1 Justificación

Si bien es claro que la SMD es la responsable de desencadenar las reacciones que conducen a lesiones de loxoscelismo cutáneo y víscero-cutáneo, falta identificar las estructuras celulares y tisulares blanco de la acción de esta enzima en la piel. Un marcador fluorescente asociado a una SMD recombinante (rGFP-Lb1) pudiera ser una herramienta valiosa en el estudio de la histopatología del loxoscelismo.

3.2 Objetivos

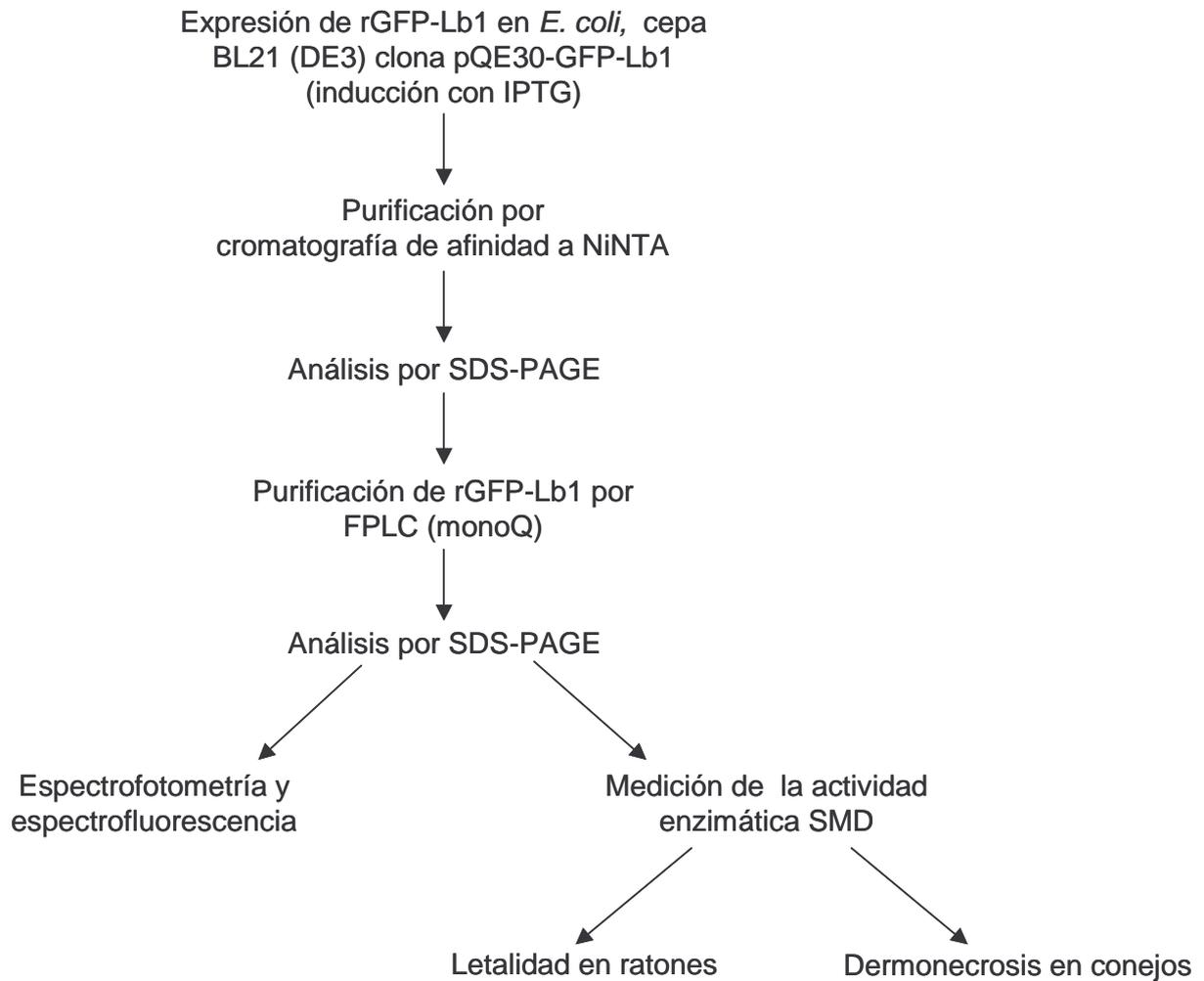
1.2.1 General

Producir y caracterizar la quimera rGFP-Lb1 en función de sus actividades de SMD, fluorescencia, dermonecrosis en conejo y letalidad en ratón.

1.2.2 Particulares

- Definir un protocolo de purificación de la quimera rGFP-Lb1.
- Evaluar su actividad de SMD y sus propiedades de fluorescencia.
- Evaluar su actividad dermonecrótica en conejo y de letalidad en ratón.

Capítulo 4. Estrategia experimental



Capítulo 5. Materiales y métodos

5.1 Materiales

5.1.1 Soluciones y buffers generales

Los reactivos fueron adquiridos a través de los representantes comerciales de las casas Sigma, JT Baker, Research Organics, Aldrich Chemical Co. Inc, Bio-Rad, Merck, Novagen, Quiagen y Kodak.

- HCl 1N. Disolver 0.862 ml de HCl concentrado (11.6 N) en agua destilada y llevar a volumen final de 10 ml.
- NaOH 10 M. Disolver 4 g de NaOH en agua destilada y llevar a un volumen final de 10 ml.
- EDTA disódico 0.5 M, pH 8.0. Disolver 18.612 g de $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y llevar a 75 ml con agua destilada. Ajustar el pH con NaOH 10 N. Aforar a 100 ml con agua destilada.
- Etanol 30%. Diluir 150 ml de etanol en agua destilada y llevar a un volumen final de 500 ml.
- Tris-HCl 1M, pH 7.5. Disolver 121.14 g de Tris-base en 800 ml de agua destilada. Ajustar el pH con HCl concentrado y aforar a un litro.
- NaCl 5M. Disolver 146.1 g de NaCl en agua destilada y aforar a 500 ml.
- MgCl_2 100 mM. Disolver 0.203 g de MgCl_2 en agua destilada y aforar a 10 ml.
- PBS 1X (NaCl 137 mM, KCl 2.6 mM, Na_2HPO_4 10 mM y KH_2PO_4 1.76 mM). Disolver 80 g de NaCl, 2 g de KCl, 14.4 g de Na_2HPO_4 anhidro y 2.4 g de KH_2PO_4 anhidro en 800 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 7.2 con NaOH 10 N y aforar a un litro.
- IPTG 1M. Disolver 2.38 g de IPTG en 10 ml de H_2O tetradestilada estéril. Preparar alícuotas de 50 μl y guardarlas a -20°C .

5.1.2 Buffers para cromatografía en sistema FPLC

- Fosfatos de sodio 20 mM, pH 7.5 (NaH_2PO_4 y Na_2HPO_4 20 mM, pH 7.5). Disolver 0.519 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y 4.352 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en 800 ml de agua destilada. Ajustar el pH con HCl 1 N y aforar a un litro.
- Fosfatos de sodio 20 mM-NaCl 2M, pH 7.5 (NaH_2PO_4 20 mM, Na_2HPO_4 20 mM, NaCl 2 M, pH 7.5). Disolver 0.2595 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 2.176 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 58.44 g de NaCl en 400 ml con agua destilada y ajustar el pH con 1N HCl. Aforar a 500 ml.

5.1.3 Soluciones para la purificación por cromatografía de afinidad a níquel (Ni-NTA)

- Mezcla de BugBuster. Disolver 4 ml de solución BugBuster[®] Protein Extraction Reagent (Novagen), 0.2 μl de rLysozyme[™] Solution (30 KU/ μl ; Novagen) y 4 μl de Benzonase[®] Nuclease (25 U/ μl ; Novagen).
- PBS 1X-25 mM imidazol. Disolver 125 μl de imidazol 10 M en 50 ml (volumen final) de PBS 1X.
- PBS 1X-100 mM imidazol. Disolver 500 μl de imidazol 10 M en 50 ml de PBS 1X
- Glicerol 30%, ácido acético 0.2 M. Mezclar 2.28 ml de ácido acético glacial y 60 ml de glicerol. Aforar a 200 ml con agua destilada.

5.1.4 Soluciones para electroforesis de proteínas (SDS-PAGE)

- Solución de acrilamida (acrilamida 30%, bis-acrilamida 0.8%). Disolver 49.5 g de acrilamida y 1.32 g de bis-acrilamida en un volumen final de 165 ml de agua destilada.
- Buffer separador (Tris-base 1.5 M, SDS 0.4%). Disolver 18.17g de Tris-base en 50 ml de agua destilada y adicionar 2 ml de SDS al 20%. Ajustar el pH a 8.8 con HCl concentrado. Aforar a 100 ml con agua destilada.

- Buffer concentrador (Tris-base 0.5 M, SDS 0.4%). Disolver 6.06 g de Tris-base en 50 ml de agua destilada y adicionar 2 ml de SDS al 20%. Ajustar el pH a 6.8 con HCl concentrado. Aforar a 100 ml.
- Buffer de corrida 10 X (Tris-base 0.25 M, glicina 0.19 M, SDS 0.1%, pH 8.6). Disolver 15.2 g de Tris-base y 72.1 g de glicina en 300 ml de agua destilada, y adicionar 25 ml de SDS al 20%. Ajustar el pH a 8.6 con NaOH 10 N. Aforar a 500 ml.
- Buffer desnaturalizante 5X (glicerol 25%, SDS 6.25%, Tris-HCl 125 mM, pH 6.8, 2-β mercaptoetanol 12.5%, azul de bromofenol 0.005%). Disolver 2.5 ml de glicerol 3.125 ml de SDS al 20%, 1.25 ml de Tris-HCl 1M, pH 6.8, 1.25 ml de 2-β mercaptoetanol y 0.5 ml de azul de bromofenol al 1%. Aforar a 10 ml con agua destilada.
- Persulfato de amonio 10% (APS). Disolver 0.1g de APS en 1 ml de agua destilada.
- Solución de tinción (isopropanol 50%, ácido acético 10%, azul de Coomassie G250 0.2%). Disolver 1g de azul de Coomassie G250 en 250 ml de isopropanol, agregar 50 ml de ácido acético glaciado y aforar a 500 ml con agua destilada.
- Solución de desteñido (isopropanol 10%, ácido acético 10%). Disolver 400 ml de agua destilada, 50 ml de isopropanol y 50 ml de ácido acético

5.1.5 Soluciones para medir la actividad de SMD

- Buffer de reacción 1X (Tris-HCl 0.1 M, pH 7.5, MgCl₂ 5 mM). Disolver 1.5 ml de Tris-HCl 1 M, pH 7.5 en 750 µl de MgCl₂ 100 mM, ver el inciso 5.1.1. Aforar a 15 ml con agua destilada. Almacenar a 4 °C.
- Buffer de reacción 5X (Tris-HCl 0.5 M, pH 7.5, MgCl₂ 50 mM). Diluir 7.5 ml de Tris-HCl 1M, pH 7.5, en 7.5 ml de MgCl₂ 100 mM. Aforar a 15 ml (volumen final) de agua destilada. Almacenar a 4 °C.
- Tritón™ X-100 al 2%. Diluir 1 ml de Tritón™ X-100, al 20% en 9 ml de agua destilada. Mantener a 4 °C.

- Esfingomielina (SM 5 mM). Diluir 60 µl de la solución de esfingomielina 100 mM en etanol (incluida en el Amplex™ Red Sphingomyelinase Assay Kit; Molecular Probes) en 1.14 ml de Tritón™ X-100 al 2%. Guardar a –20 °C.
- Amplex Red (ADPH 10 mM). Disolver un vial de Amplex Red (0.26 mg), en 100 µl de DMSO anhidro. Ambas soluciones incluidas en el Amplex™ Red Sphingomyelinase Assay Kit de Molecular Probes. Guardar en alícuotas de 100 µl a –20 °C y proteger de la luz.
- Peroxidasa de rábano (HRP, 200 U/ml). Disolver el vial de HRP (200 U; Amplex™ Red Sphingomyelinase Assay Kit, Molecular Probes) en 1 ml de buffer de reacción 1X. Hacer alícuotas de 20 µl y guardarlas a –20 °C.
- Colina oxidasa (ChOx, 20 U/ml). Disolver el vial de ChOx (12 U; Amplex™ Red Sphingomyelinase Assay Kit, Molecular Probes) en 0.6 ml de buffer de reacción 1X. Hacer alícuotas de 20 µl y guardarlas a –20 °C.
- Mezcla de reacción 2X (100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM MgCl₂, SM 0.5 mM, ChOx 0.2 U/ml, HRP 2 U/ml, ADHP 0.1 mM). Para 2 ml mezclar 1340 µl de agua destilada, 400 µl de buffer de reacción 5X, 200 µl de SM 5 mM, 20 µl de ChOx a 20 U/ml, 20 µl de HRP 200 U/ml, y 20 µl de ADPH 10 mM. El ADPH se agrega hasta el momento en el que se va a utilizar esta solución.

5.1.6 Vector de expresión, clonas, cepas bacterianas y medio de cultivo

- pQE30 (QIAexpressionist™; Qiagen). Vector de expresión de proteínas recombinantes en *E. coli*. El cassette de expresión está bajo control del promotor y el operador *lac*, inducible con IPTG. Los sitios de clonación se encuentran en fase y río arriba de seis codones de histidina, favoreciendo la expresión de la proteína recombinante con una serie de 6 histidinas (His_{6X}) en el extremo amino terminal. La serie His_{6X} facilita la purificación de la proteína recombinante mediante una estrategia de cromatografía de afinidad a níquel (Ni-NTA agarose; Invitrogen™ Qiagen).

- Clona pQE30-GFP. Esta clona permite expresar la proteína recombinante GFP (versión rsGFP, AFP-TagTM; ver Anexo I) con una serie de His_{6x} en el extremo amino terminal. Por razones de orden práctico en este trabajo utilizaremos la nomenclatura rGFP para referirnos a esta proteína.
- Clona pQE30-GFP-Lb1. Esta clona permite la expresión de una proteína recombinante tipo rGFP-Lb1 con una serie de His_{6x} en su extremo amino, es decir, una quimera en la que sucesivamente se fusionan His_{6x}, GFP y Lb1 (ver Anexo I).
- Clona pQE30-Lb1. Esta clona dirige la expresión de la toxina rLb1N. La expresión de esta clona permite producir la proteína rHis_{6x}-Lb1N (o simplemente rLb1N), la cual tiene actividades de SMD, dermonecrótica y letal en conejos y ratones, comparables a los de la SMD isoforma 1 de *L. boneti* [4, 19].
- *E. coli* XL1Blue (Stratagene). Es una cepa excelente para una rápida y estable clonación de un inserto en un plásmido. Por otro lado permite la identificación de las colonias que portan el plásmido con el inserto. Las colonias positivas no se tornan azules en presencia del sustrato cromogénico X-gal.
- *E. coli* BL21 (DE3) (Stratagene). Esta cepa es deficiente en las proteasas *ompT* y *lon*, periplásmica y citoplásmica, respectivamente. Lo anterior, en principio, facilita la expresión y purificación de proteínas solubles.
- Clona en *E. coli*. Cepa de *E. coli* transformada con la construcción de la serie pQE30 correspondiente y crio-preservada a -70 °C en medio LB-ampicilina con glicerol al 15%.
- Medio de cultivo Luria-Bertani (LB). Medio utilizado para el cultivo de cepas de *E. coli*. Para 2 litros, pesar 10 g de extracto de levadura, 20 g de bacto-tripona, 20 g de cloruro de sodio y aforar a 2 litros con agua destilada. Esterilizar por 20 minutos a 121 °C en autoclave.
- Medio de cultivo LB-ampicilina. Medio LB con 100 µg/ml de ampicilina.

5.1.7 Animales utilizados

- Se utilizaron ratones de la cepa BALB/c de 18 a 20 g, proporcionados por el Bioterio del Instituto de Biotecnología de la UNAM o comprados a la compañía Harlan, México.
- Se utilizaron conejos de la cepa New Zeland White de 3 a 5 kg proporcionados por el Bioterio del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

5.2 Metodologías

5.2.1 Inducción de la expresión de proteínas recombinantes

- Inocular 50 ml de medio LB-ampicilina con una asada de la clona en *E coli* correspondiente y dejar creciendo por 12 h a 35 °C con agitación constante.
- Transferir 10 ml de este cultivo a 1 litro de medio LB-ampicilina e incubar a 32 °C con agitación constante hasta alcanzar una DO_{600nm} de 0.6 unidades (aproximadamente 3-4 h).
- Inducir la expresión de la proteína recombinante correspondiente en presencia de 0.1 mM IPTG durante 16 h a 20 °C con agitación constante.
- Centrifugar a 5,000 rpm durante 10 minutos a 4 °C en un rotor JA-14 (Beckman), desechar el sobrenadante y purificar la proteína de interés a partir del paquete celular.

5.2.2 Purificación por cromatografía de afinidad a níquel

El método de cromatografía de afinidad está basado en la propiedad de unión no covalente (afinidad) de una molécula (ligada a un soporte tipo cromatografía, Ni-NTA) a otra molécula distinta (ligando o proteína con etiqueta His_{6X}). La capacidad de unión disminuye en presencia de otra molécula competidora del ligando (elución con imidazol).

Para la purificación por afinidad a Ni se realizaron los siguientes pasos:

- Resuspender el paquete celular obtenido (inciso 5.2.1) con la mezcla de BugBuster (inciso 5.1.3) a una relación de 1 ml por cada 100 ml de cultivo. Agitar la mezcla en un Nutator por 20 minutos a temperatura ambiente para facilitar la degradación enzimática del DNA y de la pared celular bacterianos, lo cual se refleja en la disminución de la viscosidad de la mezcla.
- Centrifugar el homogenado a 15,000 rpm por 10 minutos a 4 °C utilizando el rotor JA-20 (Beckman). Pasar el sobrenadante obtenido (clarificado) por una columna de Ni-NTA (1 ml) pre-equilibrada con PBS 1X.
- Lavar la columna con 10 ml de PBS 1X.
- Eluir sucesivamente con 10 ml de PBS 1X en presencia de 25 (10 ml), 100 (5 ml) y 250 (5 ml) mM imidazol dependiendo de la afinidad de las proteínas a níquel, colectándose fracciones de 500 µl.
- Para regenerar la columna, pasar 5 ml de PBS-250 mM imidazol, seguidos de 10 ml de PBS 1X y 10 ml de glicerol 30% -ácido acético 0.2 M y finalmente guardarla a 4 °C.

5.2.3 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

La electroforesis es un método de separación de macromoléculas (proteínas y ácidos nucleicos) en el cual las moléculas se ordenan en función de su carga eléctrica, tamaño y estructura al ser sometidas a un campo eléctrico [27].

Los geles para resolver proteínas realizados a lo largo de este trabajo se prepararon a una concentración de poliacrilamida al 12.5% (gel separador) y al 4% (gel concentrador). A continuación se describe el proceso para la elaboración de los geles así como las condiciones de corrida electroforética:

- Gel separador. Mezclar suavemente 1.5 ml de buffer separador, 2.5 ml de solución de acrilamida, 2 ml de agua destilada, 5 µl de TEMED y 20 µl de APS al 10%. Se vierte la mezcla entre dos placas de vidrio del sistema de electroforesis vertical (Mini Protean[®]3 Cell, Bio-Rad) y se agrega, suavemente, un poco de agua destilada

para evitar la formación de un menisco en el gel. A continuación se deja polimerizar a temperatura ambiente.

- Gel concentrador. Mezclar 0.63 ml de buffer concentrador, 0.33 ml de solución de acrilamida, 1.54 ml de agua destilada, 12.5 μ l de APS al 10% y 2.5 μ l de TEMED. Se retira el agua depositada sobre el gel separador ya polimerizado y se agrega la mezcla para el gel concentrador. Colocar el peine adecuado al número de pozos deseados y dejar polimerizar.
- Desnaturalización de las muestras. En un tubo eppendorf, mezclar 20 μ l de la muestra y 5 μ l de buffer desnaturalizante 5X (inciso 5.1.4). Desnaturalizar la muestra a 100 °C durante 5 minutos y centrifugar durante 2 minutos a 14 krpm.
- Condiciones de electroforesis (voltaje constante). Agregar 16 μ l de la muestra desnaturalizada por pozo y migrar (utilizando el buffer de corrida) a 50 V hasta que el colorante de referencia (azul de bromofenol) haya atravesado el gel concentrador. Posteriormente, aumentar el voltaje a 150 V y continuar la corrida electroforética hasta que el azul de bromofenol llegue a ~0.5 cm del extremo inferior del gel separador.
- Tinción de proteínas con azul de Coomassie. Una vez concluida la electroforesis, desmontar el gel y sumergirlo en solución de tinción (inciso 5.1.4) durante ~4 h con agitación constante a temperatura ambiente. Pasar el gel a la solución de desteñido (inciso 5.1.4) durante ~10 h

5.2.4 Diálisis

La diálisis es una técnica que tiene como objeto intercambiar/eliminar (por difusión) moléculas entre dos soluciones distintas. El criterio a considerar es el tamaño de las moléculas que pueden atravesar una membrana, es decir, el “cut-off” de la membrana. En este trabajo se utilizó una membrana de la casa comercial Sigma, con un “cut-off” de 12,000, por lo que tiene la capacidad de retener proteínas de peso molecular de 12,000 o mayores.

- Centrifugar las muestras durante 2 minutos a 14,000 rpm. Estimar el volumen del sobrenadante y su absorbancia a 280 nm como una aproximación de la concentración de proteína presente en cada muestra a dializar.
- Dializar las muestras a temperatura ambiente por 1 hora contra PBS 1X y/o buffer fosfatos de sodio 20 mM, pH 7.5 (ver inciso 5.1.2), según el caso.

5.2.5 Purificación de proteínas por cromatografía de intercambio aniónico (FPLC)

La cromatografía de intercambio iónico está basada en la atracción entre iones del soluto y puntos cargados que existen en la fase estacionaria. En el caso de intercambiadores aniónicos con grupos cargados positivamente en la fase estacionaria atraen aniones del soluto. Los intercambiadores catiónicos contienen puntos cargados negativamente que atraen cationes del soluto. La velocidad de migración del electrolito a través de la columna está en función de su capacidad de ionización, de la concentración de otros iones en la solución y de su afinidad relativa por las cargas de las resinas [27].

A pH por arriba de su pI, las proteínas tienen carga negativa, mientras que a pH inferior al pI, la carga será positiva. En el primer caso se debe utilizar una columna cuya resina posea cargas positivas (Mono Q), mientras que para el segundo caso, una proteína con cargas positivas requerirá de resina con cargas negativas (Mono S).

Para efectos de este trabajo se utilizó el equipo de FPLC Biothech (Pump-500; Pharmacia LKB), el graficador utilizado fue Linear 1200 y la columna Mono Q[®] HR 5/5 (1 ml; 5 cm de altura x 0.5 cm de diámetro) con una capacidad de pegado de 10 mg/ml. La resina contiene como intercambiadores de carga positiva (intercambio aniónico) aminas cuaternarias.

El flujo utilizado en las corridas fue de 1 ml/min y el buffer de la fase móvil (A) fue fosfato de sodio 20 mM, pH 7.5, mientras que el buffer de elución (B) fue fosfatos de sodio 20 mM-NaCl 2M, pH 7.5 (inciso 5.1.2), ambos filtrados a través de una membrana de 0.22 µm (Pall Corporation). El procedimiento general se describe a continuación:

- Equilibrar la columna con el buffer A.
- Purgar las mangueras para eliminar las posibles burbujas.
- Antes de ser aplicada a la columna, centrifugar la muestra por 2 minutos a 14,000 rpm.
- Definir las condiciones cromatográficas introduciendo el siguiente método:

Tiempo (minutos)	Característica	
0.00	Valve.Pos	1.1
0.00	Conc %B	0.0
0.00	ml/min	1.00
0.00	Valve.Pos	1.2
5.00	Valve.Pos	1.1
10.00	Conc %B	0.0
50.00	Conc %B	30.0
55.00	Conc %B	100
60.00	Conc %B	0.0
75.00	Conc %B	0.0

- Encender la lámpara UV e indicar la sensibilidad a utilizar. En este caso la sensibilidad del diodo a 280 nm fue de 0.2 UA y el gradiente iónico (0-2M NaCl) en el cual se colectaron las fracciones fue de 0 a 0.6 M de NaCl a lo largo de 40 minutos.
- Después de establecer la línea basal del graficador se carga la muestra utilizando el "loop" adecuado.
- Iniciar el método cromatográfico y coleccionar las fracciones de acuerdo al cromatograma.
- Una vez terminado el método, las bombas y la columna se lavan con agua y posteriormente con etanol al 30 %.
- Las fracciones verdes obtenidas se analizaron por SDS-PAGE al 12.5% y, aquellas con el peso esperado se mezclaron y dializaron contra fosfatos de sodio 20 mM, pH 7.5 (tres cambios de una hora cada uno a temperatura ambiente), ver el inciso 5.1.2.

5.2.6 Determinación de la concentración de proteínas (método Micro BCA, Pierce)

El Micro BCA Protein Assay Reagent Kit[®] Pierce, es un método espectrofotométrico para la determinación de la concentración de proteína en una solución acuosa. El método consiste en combinar la reacción de Biuret (una proteína que al reaccionar con Cu^{2+} en medio alcalino produce Cu^{1+}) con una segunda reacción, en la que se desarrolla un color púrpura (con un máximo de absorbancia a 562 nm) como resultado de la interacción de dos moléculas de BCA (ácido bicinconínico) con un ión Cu^{+1} .

- Previo a la cuantificación por BCA, estimar la concentración de las muestras problema por absorbancia a 280 nm. Diluir las muestras de acuerdo al rango de sensibilidad del método (5 a 80 $\mu\text{g/ml}$).
- Preparar el reactivo BCA en el momento de la cuantificación mezclando las siguientes soluciones (incluidas en el kit comercial) en el orden y proporciones indicados:

C = 40 μl (2 % del volumen final)

B = 960 μl (48 % del volumen final)

A = 1000 μl (50 % del volumen final)

- En una placa de 96 pozos (tipo ELISA), colocar 100 μl por pozo de proteína problema, de BSA o de blanco de reacción. Utilizando PBS 1X como buffer para diluir las proteínas.
- Añadir 100 μl de reactivo BCA a cada pozo e incubar la placa a 37 °C por 2 horas.
- Obtener las lecturas de absorbancia en el lector de placas tipo ELISA (Tecan, SUNRISE) utilizando un filtro de 570 nm.
- Obtener la gráfica y los valores de regresión lineal de la curva estándar con el programa KaleidaGraph[™] versión 3.0 y, calcular la concentración de proteínas problema con apoyo del programa Microsoft Excel versión 10.0.

5.2.7 Determinación de la actividad de esfingomielinasa D

En nuestro laboratorio, la determinación de la actividad de esfingomielinasa D se basa en el ensayo comercial (o kit) Amplex™ Red Sphingomyelinase Assay Kit; Molecular Probes. Es un método colorimétrico que permite el monitoreo indirecto de la actividad esfingomielinasa en un formato de microplaca. Como se ilustra en la Figura 10, el método se basa en reacciones enzimáticas acopladas en cadena que generan como producto final una molécula de resorufina por cada molécula de esfingomielina. Dado que la SMD, objeto de este estudio, genera fosfoceramida y colina a partir de esfingomielina, el protocolo del ensayo comercial ha sido modificado. Es decir, se omite el paso de reacción con fosfatasa alcalina para directamente cuantificar la colina producida por la SMD (Figura 10). La resorufina es un compuesto colorido y presenta un máximo de absorbancia a una longitud de onda ~570 nm con un coeficiente de extinción molar (ϵ) de 54,000 M⁻¹ cm⁻¹.

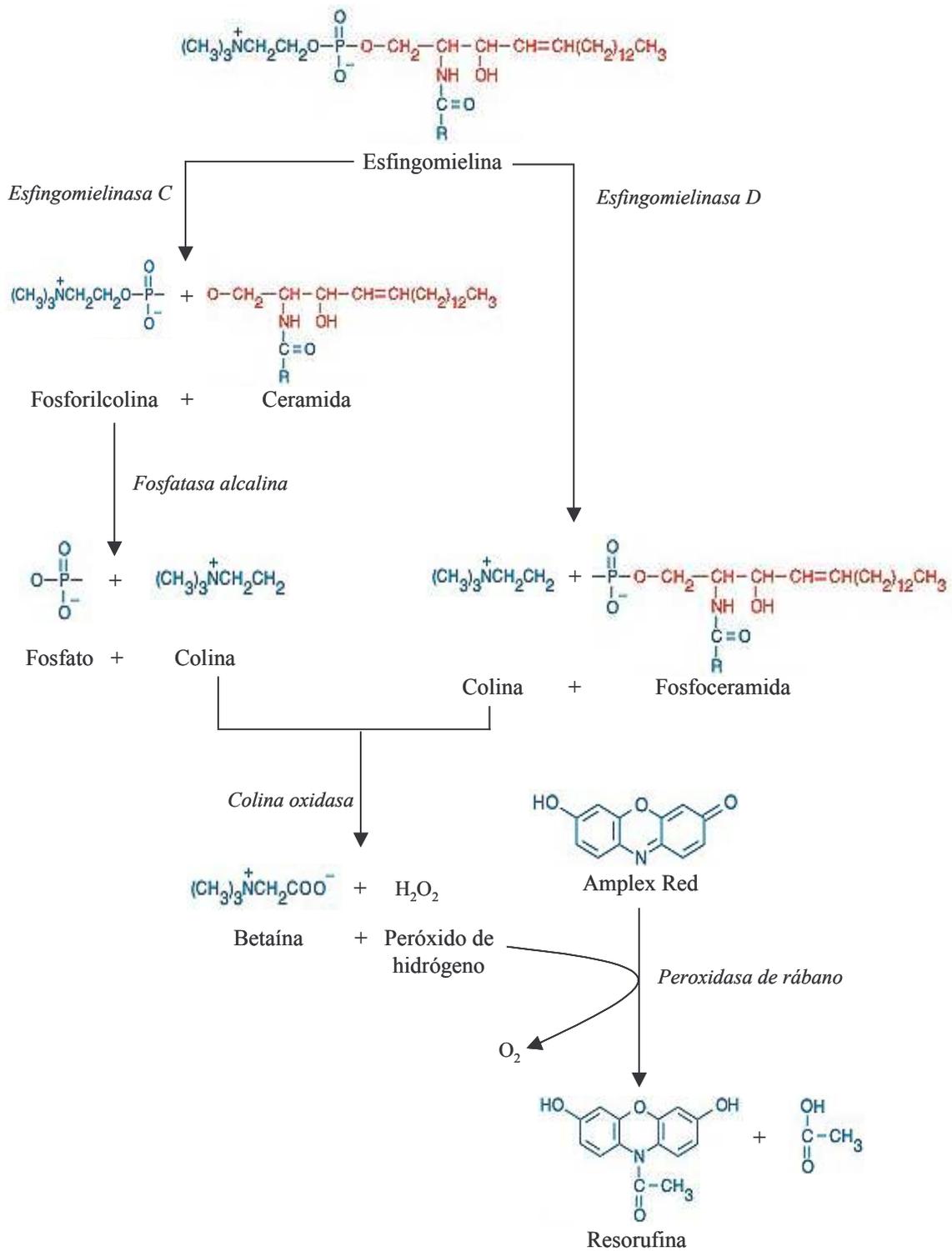


Figura 10. Procedimiento para determinar la actividad de esfingomielinasa basado en el ensayo comercial (o kit) Amplex™ Red Sphingomyelinase Assay Kit; Molecular Probes.

El protocolo para la determinación de la actividad de esfingomielinasa D, descrito por Olguín-Pérez, 2006 [29], se resume como sigue:

- Colocar en una microplaca Costar de 96 pozos concentraciones seriadas de una proteína problema (partiendo de 2 $\mu\text{g/ml}$ a 32.5 ng/ml), llevándola a un volumen final de 100 μl por pozo (inciso 5.1.5).
- Preincubar la placa durante 30 minutos a temperatura ambiente y en presencia de MgCl_2 , incluido en el buffer de reacción 1X.
- Adicionar 100 μl por pozo de la mezcla de reacción 2X (inciso 5.1.5), mezclando suavemente y evitando generar burbujas.
- Inmediatamente después tomar lecturas cada 10 minutos en un periodo de 0 a 60 minutos en el lector de placas Tecan, SUNRISE, utilizando el filtro de 570 nm y, el programa Magellant 4.
- Obtener la velocidad de la reacción (regresión lineal) con el programa GraphPad Prism (versión 4.0), graficando el tiempo contra absorbancia.
- Con ayuda del programa GraphPad Prism (versión 4.0), determinar el punto de saturación de la proteína graficando el tiempo (minutos) contra la pendiente (velocidad de reacción).

5.2.8 Espectrofotometría

La espectrofotometría es la medida de la absorción de luz por una muestra a una o más longitudes de onda. Cada compuesto tiene un espectro de absorbancia característico. En este trabajo se realizó un análisis espectrofotométrico en un rango de longitud de onda de 240 a 600 nm, utilizando un espectrofotómetro Beckman DU 650i. Las absorbancias obtenidas fueron graficadas con apoyo del programa KaleidaGraph versión 3.0.

5.2.9 Espectrofluorimetría

Muchos compuestos absorben luz de una cierta longitud de onda e inmediatamente reemiten algo de su energía en forma de luz fluorescente de una longitud de onda mayor.

Este fenómeno, conocido como fluorescencia, es sumamente selectivo, ya que un compuesto dado se excitará a ciertas longitudes de onda y fluorecerá (emitirá) a longitudes de onda mayores. En otras palabras, los compuestos fluorescentes tienen espectros de excitación y de emisión característicos.

Los espectros de fluorescencia reportados en este trabajo fueron obtenidos utilizando el equipo AB2 Luminescence Spectrometer, SIM-AMINCO Spectronic Instruments, Inc. Amnico Bowman Series 2, (laboratorio del Dr. Mario Soberón). Los valores obtenidos fueron graficados con apoyo del programa KaleidaGraph versión 3.0.

5.2.10 Determinación de la dosis letal media (DL₅₀) en ratón

La DL₅₀ se define como la cantidad de toxina capaz de matar al 50% de una población de animales experimentales. Para determinar la DL₅₀ se administraron intraperitonealmente diferentes cantidades de proteína diluidas en 500 µl de NaCl 0.9%) a grupos de 4 ratones BALB/c (18-20 g). La lectura de mortalidad se tomó a las 72 h *post*-inoculación. Los datos se procesaron con apoyo del programa GraphPad Prism versión 2 (Software, Inc., San Diego, CA). El punto de inflexión se calculó ajustando los datos experimentales por regresión no-lineal de las curvas sigmoides, determinando así la DL₅₀, la cual se expresa como µg por ratón.

5.2.11 Dermonecrosis en conejos

Para determinar la actividad dermonecrótica de la quimera se inyectaron, intradérmicamente, diferentes cantidades de proteína (diluidas en 200 µl de NaCl 0.9%) en el dorso de conejos, previamente rasurados. La evolución de la dermonecrosis se registró a las 24, 48 y 72 h *post*-inyección.

Capítulo 6. Resultados y Discusión

6.1 Purificación de proteínas recombinantes (~27 y ~60 kDa) por cromatografía de afinidad a Ni-NTA

Como punto de partida del presente trabajo, se preparó un extracto total de *E. coli* BL21 (DE3) clona pQE30-GFP-Lb1 (inciso 5.1.6) y sus componentes fueron separados por cromatografía de afinidad a níquel. La elución se realizó en presencia de 25, 100 y 250 mM imidazol, sucesivamente. Posteriormente, las fracciones colectadas fueron analizadas por electroforesis (SDS-PAGE 12.5%). La Figura 11 muestra los resultados obtenidos.

Las fracciones generadas en presencia de 25 y 100 mM imidazol presentaban un color verde característico de la proteína GFP, mientras que las fracciones eluidas con 250 mM imidazol fueron incoloras. Las fracciones eluidas en 25 mM imidazol contenían varias proteínas, presentes a baja concentración. Entre ellas, una de ~27 kDa y otra de ~60 kDa que, teóricamente, podrían corresponder a la rGFP y a la quimera rGFP-Lb1, respectivamente (Figura 11a). En el caso de las fracciones eluidas en presencia de 100 mM imidazol, se observaron dos proteínas mayoritarias de ~27 y ~60 kDa, respectivamente, muy abundantes en las fracciones 15-19 (Figura 11b). En tanto que las fracciones correspondientes a la elución con 250 mM de imidazol, aparentemente, no contenían proteína. Estos resultados son similares a los encontrados en un estudio preliminar (ver sección Antecedentes).

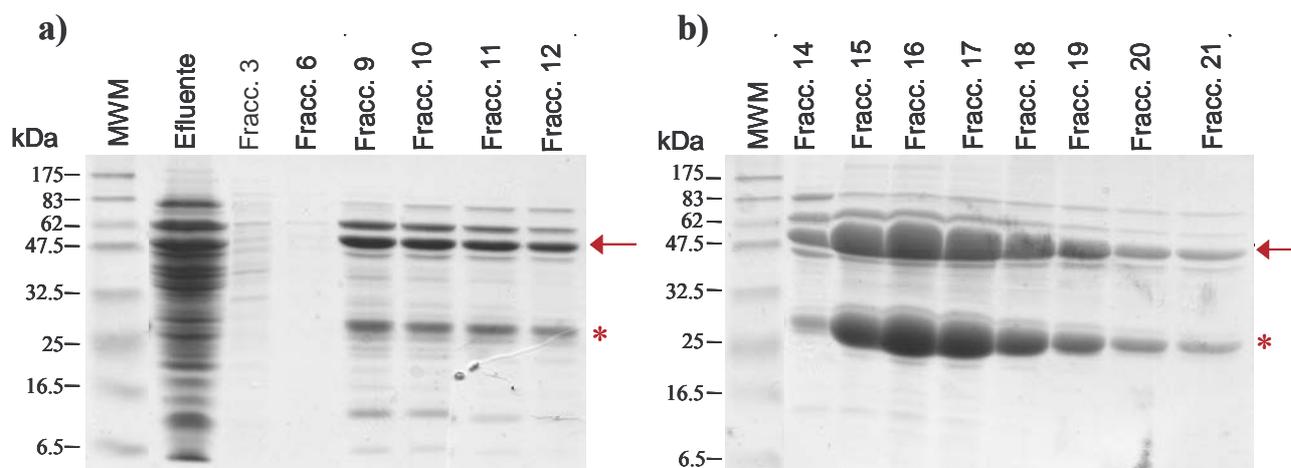


Figura 11. Análisis electroforético en gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) de las fracciones obtenidas por cromatografía de afinidad a níquel. a) Efluente o proteínas no retenidas en la columna; Fracc. 3 y 6, fracciones colectadas durante el lavado de la columna con PBS; Fracc. 9-12, fracciones generadas en presencia de 25 mM imidazol. b) Fracc. 14-21, fracciones generadas en presencia de 100 mM imidazol. MWM, marcador de peso molecular. Los asteriscos y flechas indican la posición a la cual migran las proteínas de ~27 y ~60 kDa, respectivamente.

6.2 Cromatografía de intercambio iónico (FPLC)

Con el objeto de resolver las proteínas de ~27 y ~60 kDa co-eluidas con 25 y 100 mM imidazol, se estableció un protocolo de diálisis para eliminar el imidazol y cambiar el buffer de las proteínas a fosfatos 20 mM y pH 7.5, seguido de una purificación de las proteínas por cromatografía de intercambio iónico en el sistema FPLC utilizando una columna mono Q (intercambio aniónico). Se realizaron dos ensayos de cromatografía independientes, pero utilizando las mismas condiciones de corrida. En ambos, los resultados mostraron la separación de las proteínas en dos picos principales: el pico I y II (Figura 12). Las fracciones de ambos picos conservaron el color verde característico de GFP, ya observado anteriormente en la cromatografía de afinidad a Ni-NTA.

El primer ensayo se realizó a partir de la mezcla de las fracciones eluidas con imidazol a 25 mM imidazol. El análisis por SDS-PAGE confirmó la resolución de las proteínas y permitió determinar por migración relativa la masa de cada una de éstas. El

primer pico (I) contenía una proteína de 29 kDa (antes ~27 kDa), mientras que el segundo pico (II) presentó una proteína de 57 kDa (antes ~60 kDa). Si bien la concentración de proteína en ambos picos era baja, el rendimiento obtenido era proporcional a la abundancia relativa de estas proteínas en la muestra de partida (Figura 11a y Tabla 1), e insuficiente para los fines de este proyecto. Razón por la cual estos resultados no se ilustran en el presente trabajo.

Tabla 1. Rendimiento en la purificación de las proteínas de 29 y 57 kDa

Lote	Muestra	Purificación por NiNTA Mezcla de 29 y 57 kDa		Purificación por FPLC				% recuperación (proteína 57 kDa por lt de cultivo)
		μg/ml	Rendimiento (mg prot/lt cultivo)	29 kDa		57 kDa		
				μg/ml	Rendimiento (mg prot/lt cultivo)	μg/ml	Rendimiento (mg prot/lt cultivo)	
1	25 mM imidazol	797.00	11.16	7.82	0.14	27.96	0.86	7.69
1	100 mM imidazol	2350.00	3.90	173.00	1.05	44.40	0.68	17.49
2 ⁽¹⁾	100 mM imidazol	702.60	2.11	117.40	0.53	73.47	0.34	16.32
3 ⁽²⁾	100 mM imidazol	1994.00	4.79	ND	ND	342.20	1.21	25.35
4	100 mM imidazol	3140.00	8.16	ND	ND	242.53	2.01	24.65
5 ⁽¹⁾	100 mM imidazol	529.00	2.12	ND	ND	115.00	0.53	25.08

(1) resina NiNTA utilizada en varias corridas, es decir, que fue perdiendo su capacidad de pegado

(2) resina nueva

ND no determinado

El segundo ensayo correspondió a la separación de las proteínas contenidas en la mezcla de elución en presencia de 100 mM imidazol (Figura 11b, fracciones 15-19). En el cromatograma se observó que el pico I, correspondiente a las fracciones 10-15, eluyó entre 120-170 mM NaCl y estaba compuesto por la proteína de 29 kDa (Figura 12a y 12b). El pico II, fracciones 18 a la 22, contenía la proteína de 57 kDa y eluyó entre 200-260 mM NaCl (Figuras 12a y 12c).

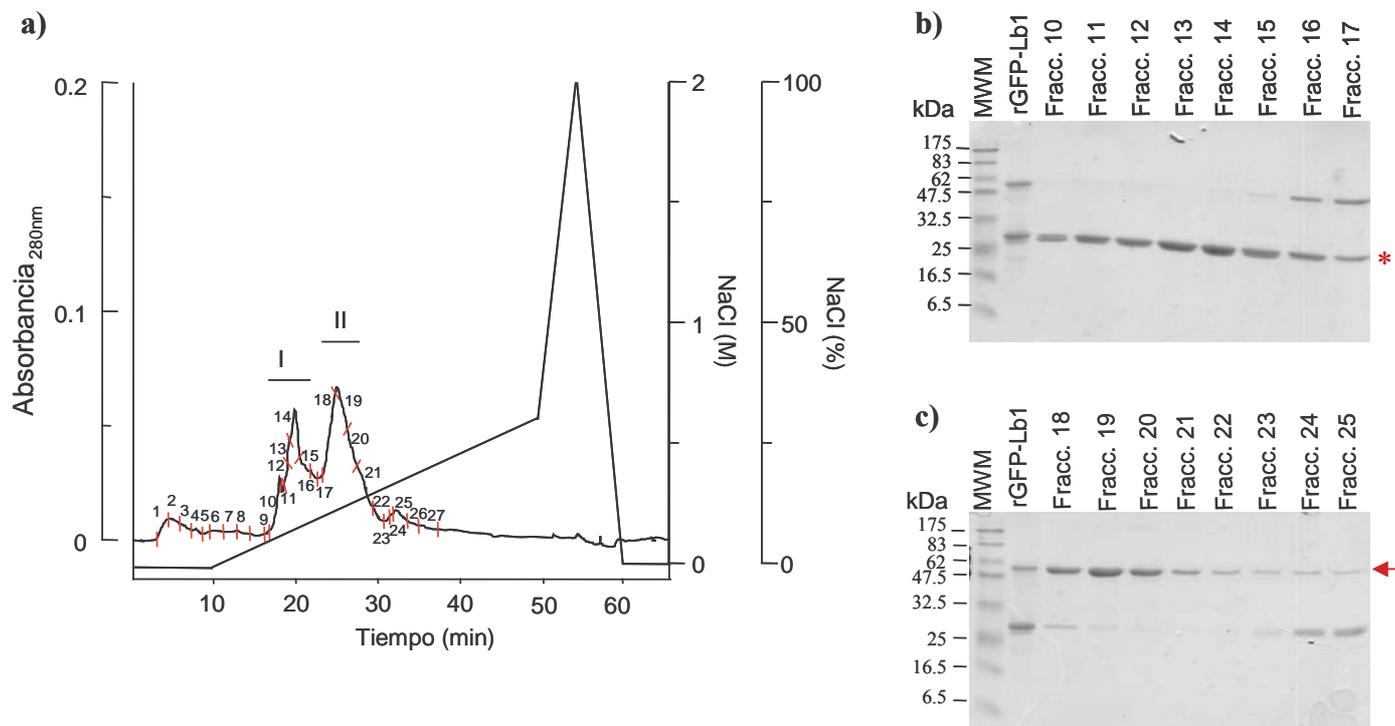


Figura 12. Análisis por intercambio aniónico (FPLC) de la mezcla con las proteínas de 29 y 57 kDa obtenidas por Ni-NTA. a) Cromatograma representativo de la separación en columna Mono Q de las proteínas presentes en la mezcla eluida con 100 mM imidazol. Los picos I y II están señalados con una barra horizontal. El gradiente de elución correspondió de 0 a 600 mM de 2M NaCl en un tiempo de 40 minutos. La sensibilidad utilizada para medir la absorbancia a 280 nm fue de 0.2 UA. Las fracciones colectadas están indicadas sobre el perfil de absorbancia, delimitadas (línea roja) y numeradas como corresponde (1-27). La muestra cargada en la corrida aquí ilustrada, corresponde a la mezcla de las fracciones 15-19 descritas en la Figura 11b. b) y c) Análisis electroforético (SDS-PAGE) de las fracciones colectadas durante la cromatografía en FPLC: fracciones 10-17 (b) y fracciones 18-25 (c). MWM, marcador de peso molecular. La flecha y el asterisco indican la posición a la cual migran las proteínas de 29 y 57 kDa, respectivamente.

Cabe hacer notar que las fracciones 16 y 17 (~1 ml cada una), contenían tanto la proteína de 29 como la de 57 kDa (Figura 12b). Esto sugiere que el punto isoeléctrico (pI) de la proteína 29 kDa es muy cercano al pI de la de 57 kDa. En este sentido, resulta pertinente mencionar, que el pI teórico (calculado usando el algoritmo de la página web

<http://www.scripps.edu/cgi-bin/cdputnam/protcalc3>) de la quimera rGFP-Lb1 es de 5.84 (ver Figura 9), mientras que los calculados para rLb1N y rGFP corresponden a 5.98 y 6.13, respectivamente (Figura 9). Una segunda observación concierne a las fracciones 23-25, las cuales contienen una proteína ligeramente menor a la de 29 kDa y, en mucho menor proporción, la de 57 kDa (Figura 12c). Una posible explicación se refiere a que la proteína de 57 kDa pudiera estar hidrolizándose, generando una proteína de 29 kDa coincidente al peso estimado de la proteína rGFP y otra con un peso ligeramente inferior que correspondería al fragmento Lb1 (Figura 9).

Los resultados obtenidos aplicando este protocolo de purificación en dos etapas de cromatografía de afinidad a Ni-NTA y FPLC de intercambio catiónico fueron reproducibles. El rendimiento obtenido con este protocolo fue satisfactorio y se fue mejorando conforme se fue repitiendo (Tabla 1), según los requerimientos de material en las subsecuentes etapas de caracterización descritas en el presente manuscrito.

6.3 Evaluación de la actividad de esfingomielinasa D (SMD) de las proteínas de 29 y 57 kDa

En nuestro laboratorio, la determinación de la actividad de esfingomielinasa D (SMD) se realiza utilizando 100 ng de la toxina rLb1N (32 kDa, Olvera, *et al.*, 2006) [30]. Así, en una primera evaluación de la actividad SMD de las proteínas de 29 y 57 kDa se utilizaron 100 y 200 ng de proteína, respectivamente; es decir, en relación estequiométrica 1:1 respecto a rLb1N (Figura 9).

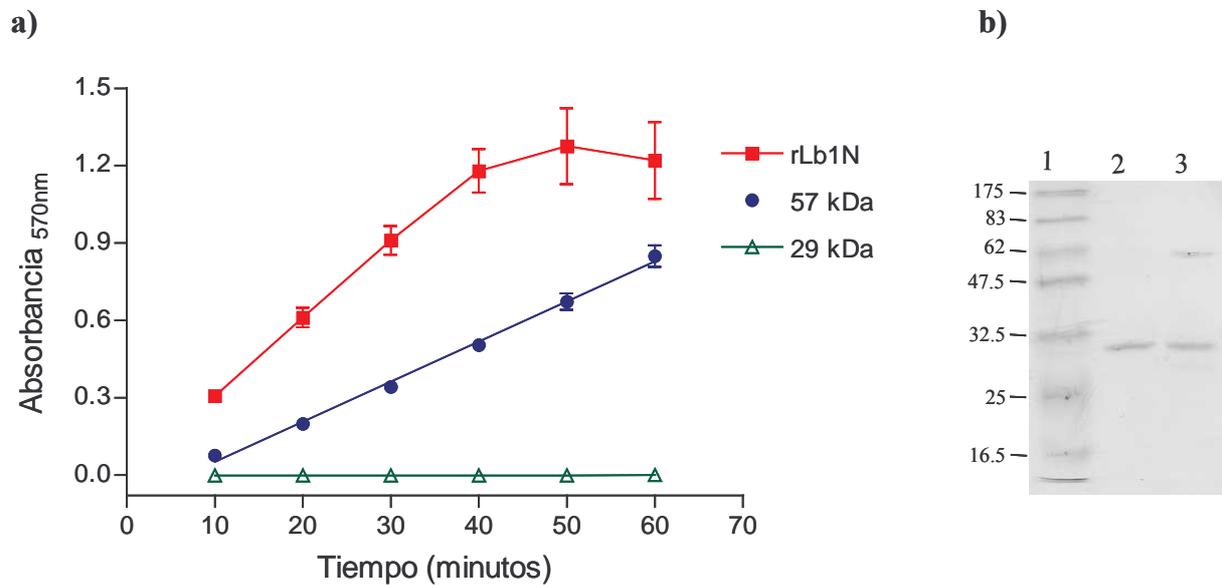


Figura 13. Análisis preliminar de actividad enzimática de las proteínas de 29 y 57 kDa. a) Evaluación de la actividad SMD de las proteínas de 57 (200 ng) y 29 kDa (100 ng). Como control positivo se utilizó la toxina rLb1N (100 ng). b) Comparación entre la migración de rGFP (carril 2) y la mezcla de las proteínas de 29 kDa y 57 kDa eludías con 100 mM imidazol y dializadas contra buffer fosfatos 20 mM, pH 7.5 (carril 3). Marcador de peso molecular, carril 1.

El ensayo mostró que la proteína de 57 kDa contiene actividad enzimática de SMD (Figura 13), lo que apoya el planteamiento de que la proteína de 57 kDa corresponde a la quimera rGFP-Lb1, por lo que en lo sucesivo sólo se utilizará esta nomenclatura. Mientras que la proteína de 29 kDa resultó sin actividad de SMD, razón por la cual esta proteína no se incluyó en experimentos posteriores de caracterización (Figura 13).

Cabe destacar que la proteína de 29 kDa, purificada por Ni-NTA, dializada contra buffer fosfatos 20 mM, pH 7.5, migra en una posición similar a la de rGFP (31 kDa); ver Figura 13b.

6.4. Caracterización de la proteína quimera rGFP-Lb1 (57 kDa)

El diseño de la proteína quimera rGFP-Lb1 postula que ésta conservaría tanto la propiedad de fluorescencia típica de la proteína rGFP como las actividades biológicas propias de la toxina rLb1N (agente causante de dermonecrosis y de letalidad en ratón). A continuación se describen los resultados obtenidos.

6.4.1 Espectrofotometría

Con el objeto de caracterizar las propiedades espectrales de la proteína rGFP-Lb1, se realizó un estudio comparativo de la espectrofotometría de las proteínas rGFP-Lb1, rLb1C y rGFP en un rango de longitud de onda de 240 a 600 nm.

Tal como se muestra en la Figura 14, el espectro de absorbancia de rLb1C presentó sólo un pico de absorbancia a 280 nm, característico del patrón espectrofotométrico del triptofano y tirosina, presentes en las proteínas. Mientras que rGFP, además del pico a 280 nm, presenta un máximo de absorbancia a 475 nm. El patrón espectral de rGFP-Lb1 resultó muy similar al de rGFP, es decir, dos picos de absorbancia a 280 y 475 nm (Figura 14). La relación entre la absorbancia de rGFP-Lb1 a 475 nm respecto a la observada a 280 nm fue de 0.428, mientras que en el caso de rGFP, esta relación tuvo un valor de 1.66. La propiedad de absorber a 475 nm no está presente en la toxina rLb1C, como se ilustra en la Figura 14.

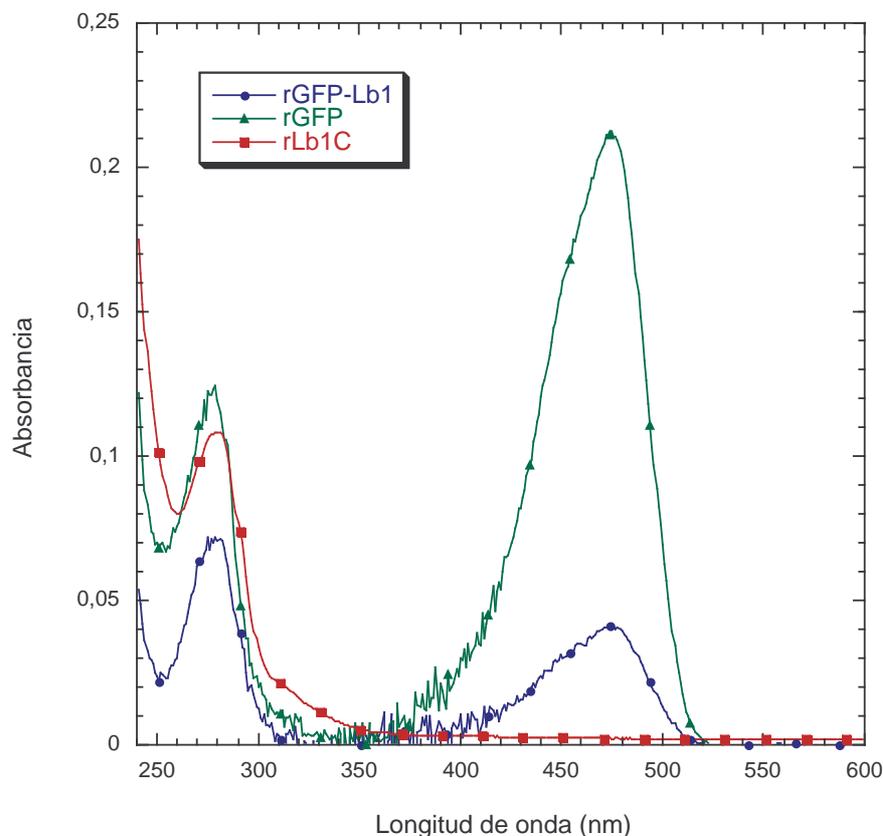


Figura 14. Análisis espectrofotométrico de las proteínas rGFP, rLb1C rGFP-Lb1. Las muestras fueron dializadas contra PBS 1X y se analizaron a una concentración de 114.5, 110 y 44.4 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente.

6.4.2 Espectrofluorimetría

Con objeto de caracterizar las propiedades de fluorescencia de rGFP-Lb1, respecto a rGFP, se realizó un análisis espectrofluorimétrico comparativo entre las proteínas rGFP, rGFP-Lb1 y rLb1N. Dada la alta sensibilidad del equipo utilizado para medir la fluorescencia se analizaron muestras con concentraciones de proteína del orden de 1.14 (rGFP) y 2.29 $\mu\text{g/ml}$ (rGFP-Lb1 y rLb1N). Las lecturas de intensidad de fluorescencia fueron normalizadas respecto a los valores máximos obtenidos en los espectros de excitación y emisión de rGFP, respectivamente (Figura 14). De acuerdo a lo esperado, se observó que rLb1N no tiene propiedades de fluorescencia, mientras que rGFP y rGFP-Lb1

presentaron espectros de fluorescencia muy similares tanto de longitud de onda (máxima a 468 nm) como en la de emisión (máxima a 503 nm). Cabe hacer notar que estos valores de longitud de onda concuerdan con lo reportado para la versión de rGFP utilizada en este trabajo (ver Tabla 2).

Es de resaltar la diferencia significativa en la intensidad de fluorescencia entre los espectros de rGFP y rGFP-Lb1. Tomando en cuenta que este análisis se realizó utilizando concentraciones de rGFP y rGFP-Lb1 equivalentes en términos estequiométricos (ver Figura 9), los resultados indican que la intensidad de fluorescencia de rGFP-Lb1 es ~ 2.5 veces menor que la de rGFP. Esta diferencia pudiera deberse a un plegamiento ineficiente de la porción GFP de la quimera rGFP-Lb1, o bien a una interferencia (*quenching*) de la porción Lb1 con la fluorescencia de la porción GFP de esta proteína. Sin duda, esta observación encontraría validez de estar sustentada en un análisis comparativo del rendimiento cuántico (*quantum yield*) de estas proteínas.

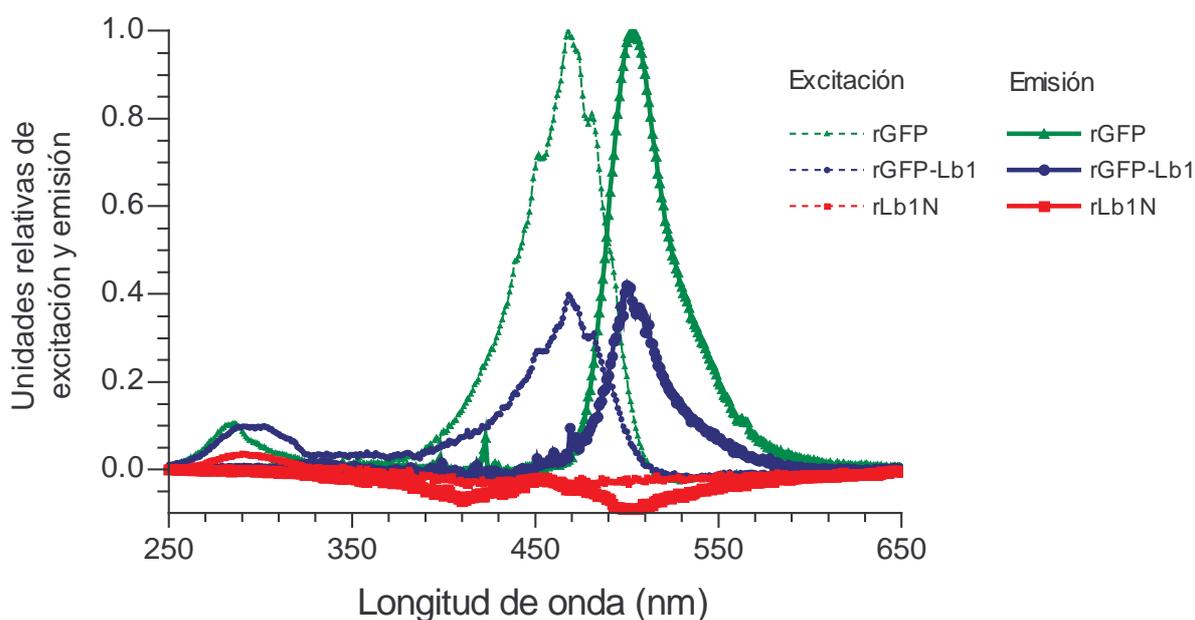


Figura 15. Espectros de fluorescencia relativa de rLb1N, rGFP, rGFP-Lb1. Los valores de fluorescencia de los espectros de excitación y emisión fueron normalizados tomando los valores máximos de excitación (468 nm) y emisión (503 nm) de rGFP como 1.0.

Tabla 2. Longitud de onda de los picos de máxima excitación y emisión de diferentes versiones comerciales de GFP y de las proteínas analizadas en este trabajo.

<i>Proteína</i>	<i>Excitación</i>	<i>Emisión</i>	<i>Referencia</i>
wtGFP	395 nm (473 nm, menor)	509 nm	http://www.purebiotechllc.com/mbpd/autofluor/afptag.html [25]
rsGFP	473 nm	509 nm	http://www.purebiotechllc.com/mbpd/autofluor/afptag.html [25]
rGFP	468 nm	503 nm	Este trabajo
rGFP-Lb1	468 nm	503 nm	Este trabajo
rLb1N	No excitación	No emisión	Este trabajo

6.5 Determinación de la actividad específica de SMD de rGFP-Lb1

En un estudio previo, realizado por Olguín-Pérez, L. P., 2006 [29], se encontró que rLb1N preparada en condiciones similares a las descritas en este trabajo tenía una actividad específica que oscila entre 0.7-1.0 U/mg, dependiendo del lote de rLb1N analizado. En donde 1 U/mg se define como la cantidad (μmol) de esfingomielina hidrolizada por unidad de tiempo (min) por mg de proteína.

La cinética enzimática ilustrada en las Figuras 16 y 17 muestra que rGFP-Lb1N presentó una actividad de SMD similar a la de rLb1N. En este análisis de dosis-respuesta de actividad enzimática se observó que al utilizar 2.0 μg por pozo de rGFP-Lb1 se alcanzó el punto de saturación a los 50 minutos del ensayo. Mientras que, 1.0 μg por pozo de rLb1N mostró un comportamiento similar (Figura 16). Las velocidades enzimáticas iniciales de rGFP-Lb1 (calculadas como se describe en el Anexo II) fueron muy parecidas en los pozos con elevadas cantidades de proteína y en proporción estequiométrica; sin embargo, la velocidad de reacción fue perdiéndose conforme se disminuyó la cantidad de proteína por pozo (Figura 16). Es de hacer notar que rGFP no presentó actividad de SMD aún con 1000 ng de proteína por pozo (Figura 16 y Figura 17).

Al graficar la velocidad inicial contra cantidad de enzima se observó que las velocidades máximas de rGFP-Lb1 y rLb1N son similares (Figura 17). El análisis de esta gráfica permitió comparar las velocidades máximas y las actividades específicas de rGFP-Lb1 y rLb1N, según se muestra en la Tabla 3. La actividad específica de rLb1N correspondió a 0.986 U/mg, mientras que la de rGFP-Lb1 resultó de 0.886 U/mg. La relación entre la actividad específica de rLb1N y rGFP-Lb1 fue de 1.11, la cual es significativamente menor a lo esperado considerando la relación estequiométrica que hay entre rLb1N: rGFP-Lb1 (1.0:0.5).

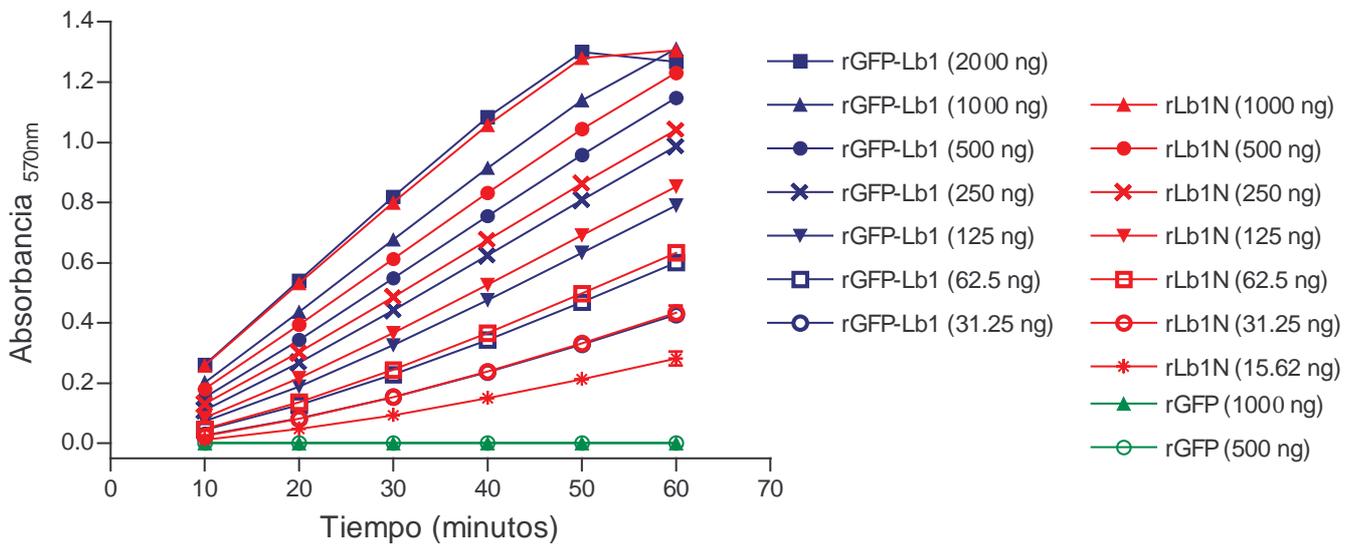


Figura 16. Actividad SMD de rGFP-Lb1, rLb1N y rGFP. Se determinó la actividad enzimática a diferentes cantidades de proteína por ensayo.

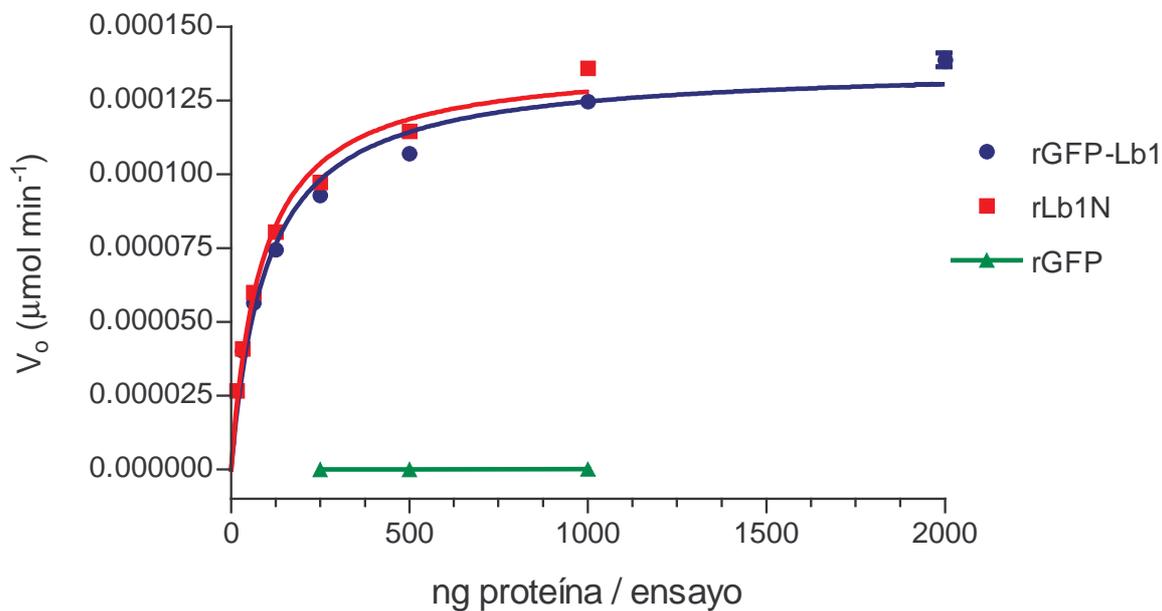


Figura 17. Cinética enzimática de SMD de rGFP-Lb1, rLb1N y rGFP. La actividad específica se calculó considerando el rango lineal de cada una de las gráficas (ver Anexo II).

Tabla 3. Comparación de las actividades específicas (SMD) de rLb1N y rGFP-Lb1

<i>Proteína</i>	<i>V max</i>	<i>Actividad Específica U / mg⁽¹⁾</i>
rGFP	No presentó actividad	
rGFP-Lb1N	0.02590 ± 0.001012	0.886 ± 0.0518
rLb1N	0.02625 ± 0.001073	0.986 ± 0.0411

(1) Calculado como se describe en el Anexo II

6.6 Pruebas de letalidad en ratón

Dada la relevancia de la actividad letal en ratón de rLb1N, se consideró importante determinar la dosis letal media (DL_{50}) de rGFP-Lb1. Como referencia de partida se tomó la DL_{50} de rLb1N (5.0 $\mu\text{g}/\text{ratón}$ de 18-20 g), previamente reportado por Ramos-Cerrillo [4]. Se utilizaron grupos de 4 ratones por dosis inyectada intraperitonealmente y se tomaron registros de letalidad hasta las 72 h *post*-inyección. La Figura 18 y la Tabla 4 muestran la curva sigmoide dosis respuesta y los valores de DL_{50} obtenidos, respectivamente.

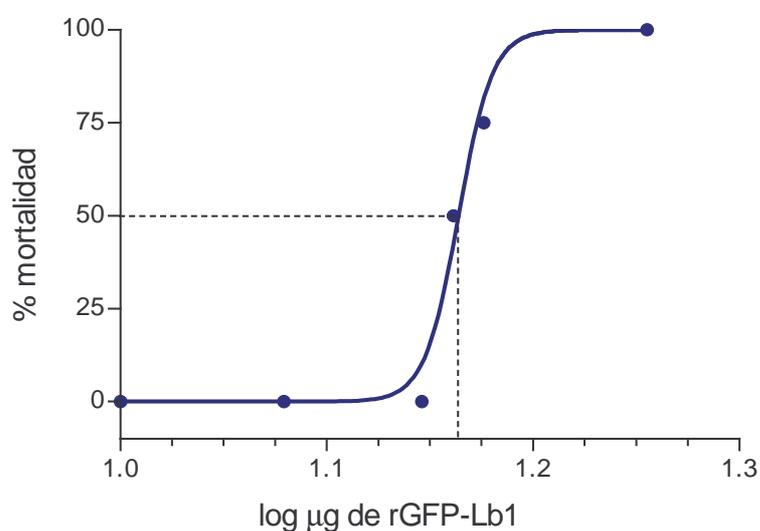


Figura 18. Modelo de curva sigmoide dosis-respuesta para determinar la DL_{50} de rGFP-Lb1 en ratón.

Tabla 4. DL_{50} de rGFP-Lb1 y rLb1N en ratones

<i>Proteína</i>	<i>DL₅₀ ($\mu\text{g} / \text{ratón}$)</i>	<i>Intervalo de confianza (95%)</i>
rGFP	No es letal	
rGFP-Lb1	14.59	14.41-14.77
rLb1N	5 ⁽¹⁾	4.96-5.04

(1) Ramos-Cerrillo, B., 2005 [4].

Dada la relevancia estequiométrica entre rGFP-Lb1N (57 kDa) y rLb1N (32 kDa) se esperaba que la DL_{50} de rGFP-Lb1 fuera de $\sim 10 \mu\text{g}$ por ratón; sin embargo, los resultados obtenidos mostraron que rGFP-Lb1 tiene menor actividad letal en ratones ($DL_{50} = 14.59 \mu\text{g/ratón}$).

Es importante resaltar que como control negativo se inyectó un grupo de 4 ratones con $15 \mu\text{g}$ de rGFP por ratón, es decir, a dosis estequiométricamente equivalentes a $30 \mu\text{g}$ de rGFP-Lb1 y a $15 \mu\text{g}$ de rLb1N. Ninguno de estos ratones murió, confirmando que rGFP no es letal en ratón. Este resultado indica claramente que el efecto de letalidad de rGFP-Lb1 es provocado por la porción Lb1, mientras que la porción GFP (extremo amino) no participa en la actividad letal en ratones. Sin embargo, no se puede excluir la posibilidad de alguna diferencia entre el plegamiento de la toxina rLb1N y la porción equivalente a Lb1 de la quimera rGFP-Lb1, lo cual puede explicar la baja letalidad de ésta.

6.7 Pruebas de dermonecrosis en conejos

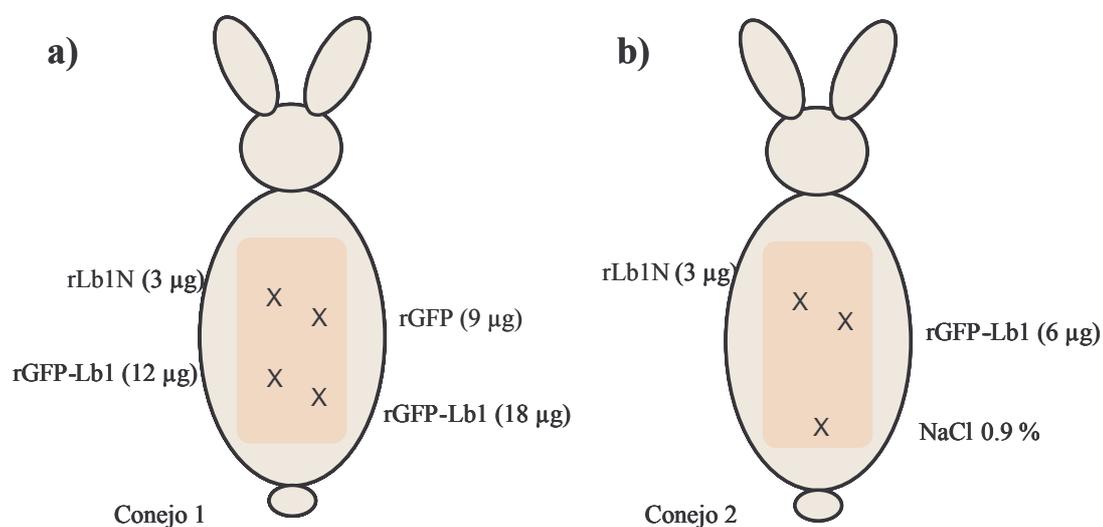


Figura 19. Esquema de inoculación de rGFP-Lb1 en conejos. Se muestran los sitios de inoculación (en el dorso rasurado) con diferentes cantidades de rGFP-Lb1. El control positivo fue rLb1N y los controles negativos fueron rGFP y NaCl 0.9%.

Con base en los datos publicados por Ramos-Cerrillo [4], se inocularon 3µg de rLb1N como control positivo en el dorso de dos conejos (1 y 2) previamente rasurados. Como se ilustra en la Figura 19, el dorso del conejo 1 también se inyectó con 12 y 18 µg de rGFP-Lb1, estequiométricamente equivalentes a 6 y 9 µg de rLb1N, respectivamente, así como con 9 µg de rGFP (Figura 19a). Igualmente, el dorso del conejo 2 fue inyectado con 6 µg de rGFP-Lb1 (estequiométricamente equivalentes a 3µg de rLb1N) y solución salina (control negativo), ver Figura 19b.

La Figura 20 muestra la dermonecrosis producida a las 48 horas *post*-inoculación. Tanto los puntos inoculados con rLb1N como con dosis estequiométricamente equivalentes de rGFP-Lb1 (Figura 20b) desarrollaron una severa dermonecrosis similar a la reportada por Ramos-Cerrillos, 2005 [4], característica de la esfingomielinasa D del veneno de la araña *Loxosceles*. Si bien en el laboratorio se ha observado que la respuesta varía de conejo a conejo, la Figura 20a sugiere que al igual que rLb1N, la magnitud (severidad) de la dermonecrosis generada por rGFP-Lb1 es dosis dependiente. Ni el sitio inoculado con rGFP ni el control con solución salina desarrollaron signos de dermonecrosis (Figura 20a y b). Los conejos fueron sacrificados a las 72 h de evolución y el Dr. Adolfo de Roodt (colaborador del laboratorio) procedió a evaluar macroscópicamente la lesión. Se encontró que rGFP-Lb1 presenta una actividad significativamente menor que rLb1N. Un análisis histológico de la dermonecrosis causada por rGFP-Lb1 sería de gran apoyo a las observaciones del Dr. de Roodt.

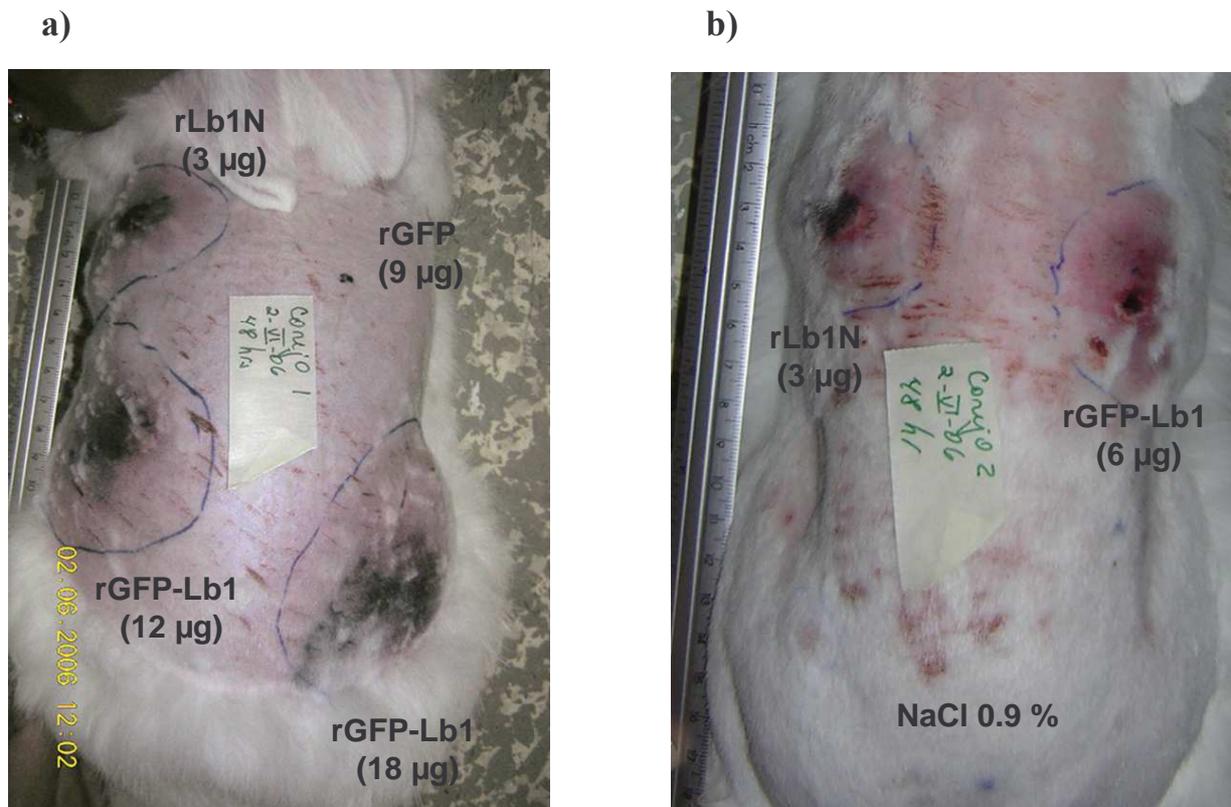


Figura 20. Dermonecrosis en conejos. a) conejo 1 con el control negativo rGFP (9 µg) y el control positivo de rLb1N (3µg). Se muestra la inoculación de rGFP-Lb1 con 12 y 18 µg. b) conejo 2, control positivo con 3µg de rLb1N y 6 µg de rGFP-Lb1; NaCl, solución salina al 0.9 %. La línea azul indica la zona de inflamación. Fotografías tomadas 48 horas *post*-inoculación.

7. Conclusiones

Se logró clonar el inserto GFP-Lb1 en el plásmido pQE30, así como la expresión de la quimera recombinante rGFP-Lb1, en la cepa *E. coli* BL21 (DE3). La proteína recombinante se purificó por cromatografía de afinidad a níquel, resultando en la co-elución de dos proteínas (29 y 57 kDa). Una última etapa de purificación consistió en la resolución de estas proteínas por cromatografía de intercambio aniónico mediante FPLC.

Por sus propiedades tales como: patrón espectrofotométrico, afinidad a Ni, tamaño e intensidad de color verde, espectro de fluorescencia y carencia de actividad enzimática, se sugiere que la proteína de 29 kDa tiene una estructura primaria tipo His_{6x}-GFP, como producto de la inestabilidad y degradación de la quimera rGFP-Lb1. Los datos obtenidos en este trabajo no permiten excluir una incompleta transcripción y/o traducción de la secuencia que la codifica.

La caracterización bioquímica de la proteína de 57 kDa se llevó a cabo en función de su actividad de SMD, espectrofotometría y fluorescencia, demostrando que conserva tanto las propiedades espectrales de GFP como las actividades biológicas propias de rLb1N. Estos datos, en su conjunto, permitieron concluir que la proteína de 57 kDa corresponde a la proteína quimera rGFP-Lb1.

Se demostró que tanto rGFP-Lb1 como rLb1N presentan actividad de esfingomielinasa D. Para la caracterización biológica de rGFP-Lb1 se realizaron pruebas de dermonecrosis en conejo y letalidad en ratones. En el caso de la dermonecrosis el proceso de evolución de las lesiones fue similar con rGFP-Lb1 y con rLb1N; mientras que la DL₅₀ determinada para rGFP-Lb1 (14.5 µg/ratón) resultó mayor a la esperada (10 µg/ratón).

Finalmente podemos decir que se logró la purificación y caracterización de una proteína tipo rHis_{6x}-GFP-Lb1, en función de sus actividades de SMD, fluorescencia, dermonecrosis en conejos y letalidad en ratón.

8. Perspectivas

El propósito de diseñar y caracterizar una quimera fluorescente tipo rGFP-Lb1 está en relación con su potencial de utilización como herramienta para monitorear y evaluar la distribución de esta toxina en modelo de piel de conejo. Si bien, el presente trabajo no se extiende en esta dirección, es importante mencionar algunos experimentos preliminares no descritos que consistieron en: la incubación de diferentes tipos celulares en presencia de rGFP-Lb1 y un posterior análisis de fluorescencia por microscopía confocal. Sin embargo, los resultados fueron poco favorables, ya que se observó la precipitación o posible agregación de rGFP-Lb1 en el medio de cultivo. Por otro lado, el análisis por SDS-PAGE y Western blot reveló que después de cierto tiempo de incubación de las células en presencia de rGFP-Lb1, la proteína quimera tiende a degradarse.

Igualmente, se realizó un primer intento de evaluar la distribución de la señal fluorescente en biopsias de piel de conejo inoculada con rGFP-Lb1. En el caso de las biopsias de piel de conejo, se observó que el folículo piloso presentaba autofluorescencia, por lo que, aunado a la tendencia de rGFP-Lb1 a precipitar y degradarse se decidió suspender estos experimentos.

La utilización de la proteína rGFP-Lb1 en futuros estudios dependerá, en buena medida, de aumentar la estabilidad de esta proteína, o replantear su diseño. Así, se proponen las siguientes alternativas:

- Diseñar otras proteínas tipo rGFP-Lb1 en las cuales el péptido de unión entre GFP y Lb1 sea más largo, buscando mayor flexibilidad en la estructura de la quimera.
- La expresión de una proteína con las secuencias invertidas, por ejemplo rHis_{6x}-Lb1-GFP, buscando tener una quimera fluorescente más estable.
- Utilizar y valorar otros formatos para marcar la SMD que nos pudieran permitir el monitoreo del efecto de esta toxina en: diferentes líneas celulares, condiciones de cultivo y eventualmente en modelos animales.

8. Perspectivas

El propósito de diseñar y caracterizar una quimera fluorescente tipo rGFP-Lb1 está en relación con su potencial de utilización como herramienta para monitorear y evaluar la distribución de esta toxina en modelo de piel de conejo. Si bien, el presente trabajo no se extiende en esta dirección, es importante mencionar algunos experimentos preliminares no descritos que consistieron en: la incubación de diferentes tipos celulares en presencia de rGFP-Lb1 y un posterior análisis de fluorescencia por microscopía confocal. Sin embargo, los resultados fueron poco favorables, ya que se observó la precipitación o posible agregación de rGFP-Lb1 en el medio de cultivo. Por otro lado, el análisis por SDS-PAGE y Western blot reveló que después de cierto tiempo de incubación de las células en presencia de rGFP-Lb1, la proteína quimera tiende a degradarse.

Igualmente, se realizó un primer intento de evaluar la distribución de la señal fluorescente en biopsias de piel de conejo inoculada con rGFP-Lb1. En el caso de las biopsias de piel de conejo, se observó que el folículo piloso presentaba autofluorescencia, por lo que, aunado a la tendencia de rGFP-Lb1 a precipitar y degradarse se decidió suspender estos experimentos.

La utilización de la proteína rGFP-Lb1 en futuros estudios dependerá, en buena medida, de aumentar la estabilidad de esta proteína, o replantear su diseño. Así, se proponen las siguientes alternativas:

- Diseñar otras proteínas tipo rGFP-Lb1 en las cuales el péptido de unión entre GFP y Lb1 sea más largo, buscando mayor flexibilidad en la estructura de la quimera.
- La expresión de una proteína con las secuencias invertidas, por ejemplo rHis_{6x}-Lb1-GFP, buscando tener una quimera fluorescente más estable.
- Utilizar y valorar otros formatos para marcar la SMD que nos pudieran permitir el monitoreo del efecto de esta toxina en: diferentes líneas celulares, condiciones de cultivo y eventualmente en modelos animales.

Referencias

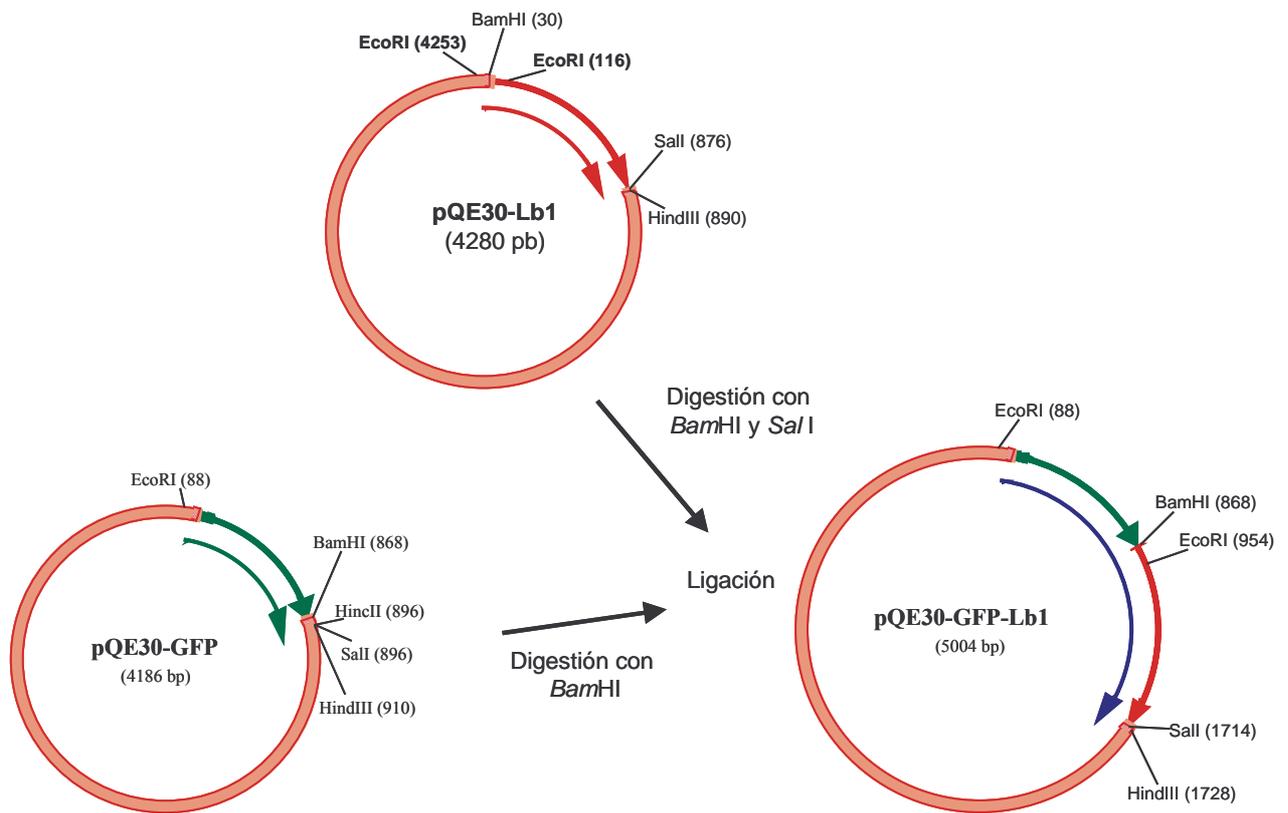
- (1) Foelix, R. F., 1996. *Biology of Spiders*. Oxford Thieme. USA. pp. 330.
- (2) Alexander, P., Bahret, M. J., Chaves, J., Courts, G. y D'Alessio, N. S. 1992. *Biología*. Prentice Hall. USA.
- (3) De Roodt, A. R., Salomón, O. D., Lloveras, S. C., Orduña, T. A. 2002. Envenenamiento por arañas del género *Loxosceles*. *Medicina*. 62, 83-94.1
- (4) Ramos-Cerrillo, B. 2005. Producción, evaluación y caracterización de los inmunógenos recombinantes de las esfingomielinasas de *L. boneti*, *L. reclusa* y *L. laeta*. Tesis de Maestría. Instituto de Biotecnología, UNAM.
- (5) Hogan, C. J., Barbaro, K. C., Winkel, K., 2004. Loxoscelism: Old Obstacles. *Ann. Emerg. Med.* 44, 608-624.
- (6) Quintana, J. C., y Patiño, R. O. 2002. Envenenamiento aracnídico en las Américas. *MedUNAB*. 5, 1-9.
- (7) http://www.museums.org.za/bio/spiderweb/spider_classification.htm
- (8) Ubick, U., Paquin, P., Cushing, P. E. y Roth, V. 2005. *Spiders of North America: an identification manual*. American Aracnological Society. pp. 377.
- (9) Gajardo, T. R. 1966. El araneísmo en el mundo tropical y subtropical. *Mem Inst Butantan Simp. Internacional*. 33, 45-54.
- (10) Silvestre, F.G., de Castro, C.S., de Moura J.F., Giusta M.S., De Maria M., Álvares, E.S.S, Lobato, F.C.F., Assis, R.A., Gonçalves, L.A., Gubert, I.C., Chávez-Olórtegui, C. y Kalapothakis, E. 2005. Characterization of the venom from the Brazilian Brown Spider *Loxosceles similis* Moenkhaus, 1898 (Araneae, Sicariidae). *Toxicon* 46, 927–936.
- (11) Paludo, K. S. Gremski, L. E. Sanches, V. S., Meiri, C. O., Gremski, W., de Freitas, B. D., Bonciani, N. H., Dietrich, C.P. y Cavichiolo, F. C. R. 2006. The effect of brown spider venom of endothelial cell morphology and adhesive structures. *Toxicon*. 47, 844-53.
- (12) Ramos-Cerrillo, B. M. 2002. Comparación bioquímica, inmunológica y toxicológica de los venenos de *Loxosceles boeneti* y *Loxosceles reclusa*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM.

- (13) Luciano, M.N., da Silva, P.H., Chaim, O.M., dos Santos, V.L.P., Franco, C.R.C., Soares, M.F.S., Zanata, S.M., Mangili, O.C., Gremski, W. y Veiga S.S. 2004. Experimental evidence for a direct cytotoxicity of *Loxosceles intermedia* (Brown Spider) venom in renal tissue. *J. Hist. Cyto.* 52, 455–467.
- (14) Paixao-Cavalcante, D., van den Berg, C. W., Fernández-Pedrosa, M.F., Goncalves, A. R. M. y Tambourgi, D. V. 2006. Role of matrix metalloproteinases in HaCaT keratinocytes venom sphingomyelinase D. *J. Invest Dermatol.* 126, 61-68.
- (15) da Silveira, R. B., Pigozzo, R. B., Chaim O. M., Appel, M. H., Dreyfuss, J. L., Toma L., Mangili, O. C., Gremski, W., Dietrich, C. P., Nader, H. B., Sanches, S. V. 2006. Molecular cloning and functional characterization of two isoforms of dermonecrotic toxin from *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom gland. *Biochimie.* 88, 1241-53
- (16) <http://www.pasqualinonet.com.ar/Histamina.htm>
- (17) http://www.censat.org/A_A_Documentos_048.htm
- (18) Tambourgi, D.V., Fernández Pedrosa, M.F., Goncalves de Andrade, R.M., Billington, S.J., Griffiths, M. y van den Berg, C.W. 2007. Sphingomyelinases D induce direct association of C1q to the erythrocyte membrane causing complement mediated autologous haemolysis. *Mol. Immunol.* 44, 576-82.
- (19) Ramos-Cerrillo, B., Olvera, A., Odell, G. V., Zamunio, F., Paniagua-Solís, J., Alagón, A. y Stock, R. P. 2004. Genetic and enzymatic characterization of sphingomyelinase D isoforms from the North American fiddleback spiders *Loxosceles boneti* and *Loxosceles reclusa*. *Toxicon.* 44, 507-514.
- (20) Van Meeteren, L.A., Frederiks, F. Giepmans, B.N., Fernandes Pedrosa, M.F., Billington, S.J., Jost, B., Tambourgi, D.V. y Moolenaar, W.H., 2004. Spider and bacterial sphingomyelinases D target cellular LPA receptors by hydrolyzing lysophosphatidylcholine. *J. Biol. Chem.* 279, 10833-10836.
- (21) Miura, Y., Gotoh, E., Nara, F., Nishijima, M. y Hanada, K. 2004. Hydrolysis of sphingosylphosphocholine by neutral sphingomyelinases. *FEBS Letters* 557, 288-292.
- (22) Sullivan, K. F. y Kay, S. A. 1999. *Methods in cell biology: Green Fluorescent Protein.* Academic Press. Vol 58. E.U.

- (23) Schmid, A., and Neumeier, H. 2005. Evolutions in Science Triggered by Green Fluorescent Protein (GFP). *Chem Bio Chem*. 6, 1149-1156.
- (24) <http://www.iztacala.unam.mx/temas/foropaea/16TB09Ia.htm>
- (25) <http://www.purebiotechllc.com/mbpd/autofluor/afptag.html>
- (26) Tsien, R. Y. 1998. The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 509–44
- (27) González-Morán, M. G. 1996. Técnicas en biología celular. Teoría y práctica. A.G. T. Editor, S. A. México. pp. 86-92
- (28) <http://www.scripps.edu/cgi-bin/cdputnam/protcalc3>
- (29) Olguín-Pérez, L. P. 2006. Caracterización de la actividad enzimática de la esfingomielinasa D del veneno de las arañas violinistas *Loxosceles boneti*, *L. reclusa* y *L. laeta*. Tesis de Maestría. Instituto de Biotecnología, UNAM.
- (30) Olvera, A., Ramos-Cerrillo, B., Estévez, J., Clement, H., de Roodt, A., Paniagua-Solís, J., Vázquez, H., Zavaleta, A., Salas Arruz, M., Stock, R.P. y Alagón, A. 2006. North and South American *Loxosceles* spiders: Development of a polyvalent antivenom with recombinant sphingomyelinases D as antigens. *Toxicon* 48, 64–74.

Anexo I

Estrategia seguida para la construcción del vector de expresión pQE30-GFP-Lb1 (Ramos-Cerrillo, R. y Sánchez López, R.; resultados no publicados).



Anexo II

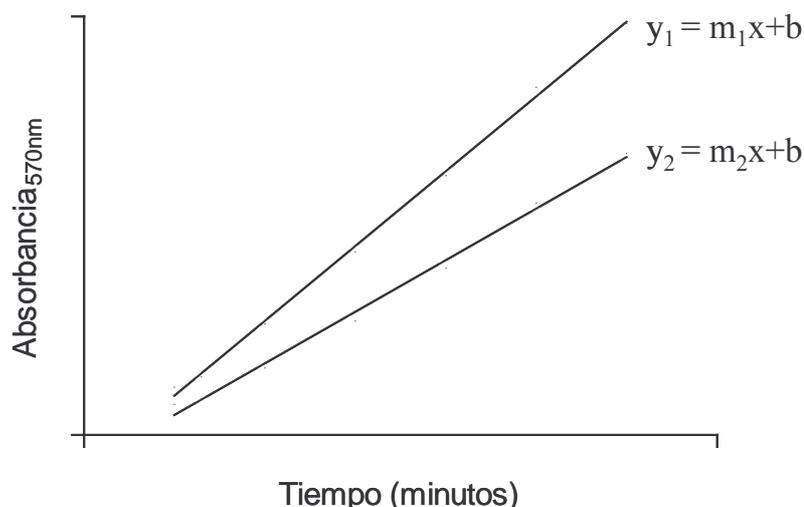
La determinación de la actividad de esfingomielinasa D (SMD) se basa en el ensayo comercial (o kit) Amplex™ Red Sphingomyelinase Assay Kit; Molecular Probes. Es un método colorimétrico que permite el monitoreo indirecto de la actividad esfingomielinasa en un formato de microplaca. El método se basa en reacciones enzimáticas acopladas en cadena que generan como producto final una molécula de resorufina por cada molécula de esfingomielina (Figura 10). De donde 1 unidad (U) de SMD se define como la cantidad de enzima que se requiere para producir 1 μmol de resorufina a partir de esfingomielina, por unidad de tiempo (min).

La actividad específica (U/mg) de esfingomielinasa D (SMD) se calcula de la siguiente manera:

1. Determinar la velocidad inicial (V_o) de la reacción enzimática utilizando diferentes cantidades de SMD por ensayo.

a) Leer los valores de absorbancia a 570 nm de cada mezcla de reacción enzimática cada 10 minutos durante 1 hora.

b) Graficar los valores de absorbancia contra el tiempo de reacción (min), como se ilustra en al siguiente figura.



- c) Calcular la V_o de cada reacción, es decir, la diferencia de absorbancia por unidad de tiempo ($\Delta A_{570\text{nm}} \text{ min}^{-1}$), y corresponde a la pendiente de la recta en la gráfica anterior.
- d) Convertir la V_o ($\Delta A_{570\text{nm}} \text{ min}^{-1}$) a unidades de actividad enzimática (U), utilizando la ley de Lambert-Beer:

$$A = \epsilon d c$$

Donde: A es la absorbancia (en este caso a $\Delta A_{570\text{nm}} \text{ min}^{-1}$)
 ϵ es el coeficiente de extinción molar (en el caso de resorufina es de $54,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
 d es la distancia que atraviesa el haz de luz (0.7 cm en el ensayo de actividad SMD en placa descrito en este trabajo)
 c es la concentración de la sustancia absorbente en el medio (expresado en molaridad, M o $10^3 \mu\text{mol ml}^{-1}$)

Despejar c : $c = A/\epsilon d$

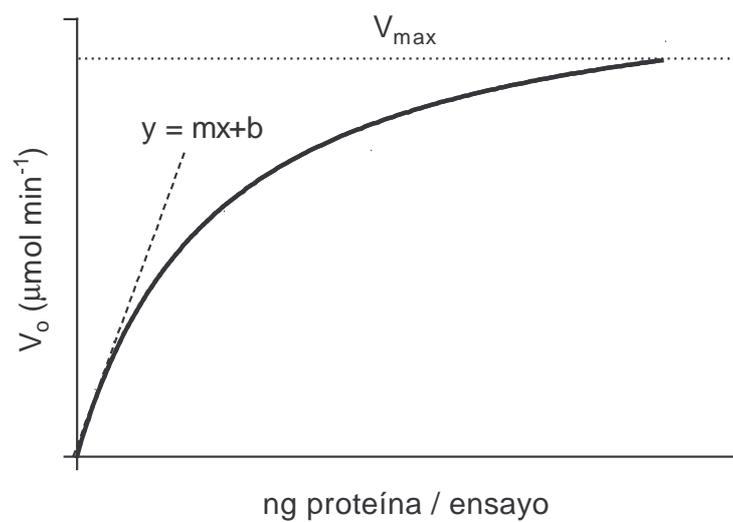
Substituir valores considerando que $d = 0.7 \text{ cm}$ y que el volumen de la reacción es de 0.2 ml:

$$M = \Delta A_{570\text{nm}} \text{ min}^{-1} / (54,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}) (0.7 \text{ cm})$$

por lo tanto $M = \Delta A_{570\text{nm}} \text{ min}^{-1} * 0.2 \text{ ml} / (37,800 / 10^3 \mu\text{mol ml}^{-1})$

$$\mu\text{mol min}^{-1} = \Delta_{570\text{nm}} \text{ min}^{-1} * 5.291 \times 10^{-3} \mu\text{mol}$$

2. Graficar la V_o ($\mu\text{mol min}^{-1}$) contra cantidad de esfingomielinasa D (ng por ensayo) y determinar el rango lineal de la reacción, como se muestra en la siguiente gráfica.



La pendiente de la recta es la actividad espec\u00edfica de la enzima expresada como ($\mu\text{mol min}^{-1}/\text{ng}$). Por simple regla de tres, calcular la actividad espec\u00edfica expresada como $\mu\text{mol min}^{-1}/\text{mg}$.