

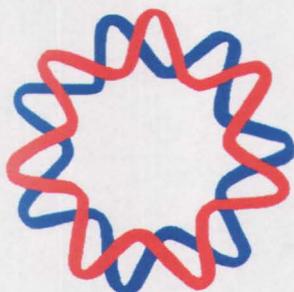


INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

PRODUCCIÓN, EVALUACIÓN Y
CARACTERIZACIÓN DE LOS INMUNÓGENOS
RECOMBINANTES DE LAS ESFINGOMIELINASAS
DE *L. boneti*, *L. reclusa* Y *L. laeta*.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
P R E S E N T A:
BLANCA MARGARITA RAMOS CERRILLO



CUERNAVACA, MORELOS. JUNIO 2005

m. 344616



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

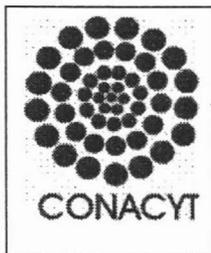
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

LA PRESENTE TESIS SE REALIZÓ EN:
EL LABORATORIO DEL DR. ALEJANDRO ALAGÓN
EN EL DEPARTAMENTO DE MEDICINA MOLECULAR Y BIOPROCESOS
DEL INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, DE LA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO,
CUERNAVACA, MORELOS
BAJO LA DIRECCIÓN DEL

DR. ALEJANDRO ALAGÓN CANO

Y

ASESOR M. en C. ALEJANDRO OLVERA RODRÍGUEZ



Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la
UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el
contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Blanca Margarita

Ramos Cerrillo J

FECHA: 27. mayo 05

SIGNA: [Firma]

DURANTE MIS ESTUDIOS FUI BECARIA DEL
CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA (CONACyT) Y DE LA DIRECCIÓN
GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO (DGEP) DE LA UNAM.

ESTE TRABAJO FUE APOYADO POR LOS PROYECTOS
PAPIIT-DGAPA IN 230203-2
CONACyT - 2002
Y POR EL INSTITUTO BIOCLON A TRAVÉS DE CONVENIOS ESPECÍFICOS.

Y siguiendo con la misma historia de justificar la existencia:

“El trabajo es lo único que dignifica al hombre”

palabras sabías que un buen amigo transmite diariamente y que sin lugar a duda, estoy de acuerdo con ellas. Mamá, gracias por enseñarme a creer no solamente en ésto sino también en la gente. Gracias por insistir en que abrazara mis convicciones. Gracias por la fuerza que transmites día a día, que es un estímulo para no darse por vencido. Gracias porque siempre has estado y estarás en mi mente.

*Simplemente un pequeño presente
Por tí y para tí*

Blanca

Lo reitero nuevamente: ¡gracias por la libertad!

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Alejandro Alagón por permitirme formar parte de su laboratorio. Doc. todo mi respeto y admiración, por ser un tutor excelente, por ser un gran investigador y apasionado de la ciencia.

Al M. en C. Alejandro Olvera porque juntos hicimos posible el proyecto, por estimularme a competir conmigo misma, por la perseverancia y sobretodo por la gran amistad. Muchas gracias Pinch.

Al Dr. George Odell y Laura Palomares por sus comentarios y sugerencias durante los tutorales de este proyecto.

A los Dres. Alejandro Alagón, Baltazar Becerril, Miguel Angel Cevallos, Lourival Possani y Lorenzo Segovia por sus comentarios y observaciones durante la escritura de la tesis y por fungir como jurado en mi exámen.

Al Dr. Roberto Stock por la asesoría y acertados comentarios durante la realización de esta tesis.

A la M. en I.B.B. Hilda Vázquez y la M. en C. Judith Estévez por el apoyo técnico y por proveer el material de estudio.

A la Biól. Maricela Olvera por el apoyo técnico en la unidad de secuenciación automática de DNA.

Al Biól. Felipe Olvera y a la M. en B. Herlinda Clement por el apoyo técnico en el laboratorio.

A la Dra. Rosana Sánchez por sus punto de vista críticos y analíticos durante la escritura de esta tesis.

A las M.V.Z. Elizabeth Mata y Bárbara Mondragón por el apoyo técnico en la unidad del Bioterio.

A Angélica Linares por el apoyo administrativo en el laboratorio.

A Olegaria Benitez y Ricardo Mondragón por su apoyo técnico y laboratorista.

A Gloria Villa y Maribel Velasco por el apoyo en todos los trámites administrativos.

A los Dres. A. Zavaleta y M. Salas por proveer material de estudio y por las sugerencias durante la realización del proyecto.

A mis compañeros de laboratorio: Pinch, Herli, George, Rosana, Ale. Saucedo, Angélica, Felipe, Mabel, Héctor, Laura, Montse, Roberto, G. Corzo, Leo y Ricardo, por aguantar mi inestabilidad emocional y por los momentos inolvidables.

A mi querida madre y abuela por la comprensión y por ayudarme a crecer.

A José Antonio Carreón por la asesoría durante la escritura de la tesis.

Muchas gracias a todos.

AGRADECIMIENTOS MUY PERSONALES

Abuela "Mamita" gracias por ayudarme a crecer, por estar, porque disfrutas la vida, por los 80 y los que vengan, gracias por la comprensión.

Muy especialmente al tío Enrique porque indudablemente es un ejemplo de calidad humana y por su gran gusto por aprender.

A Mariana por el tiempo e interés que dedicaste en este trabajo.

Al tío Miguel "Nicho" para que te abracés a tus sueños y sigas adelante.

A mis primos Emilio y Luis porque son mis hermanos.

Al tío Mariano "Gordo" por la buena fe.

Y a toda mi familia GRACIAS POR EL INTERÉS.

Sin lugar a duda a Javier Carreto por ser un estímulo en mi vida, por el apoyo, por soltarme y porque somos mutualistas. Una vez más gracias por prestarme tu visión para ayudarme a pensar con claridad.

Y no podían faltar mis amigos incondicionales, solidarios, guapos y simpáticos: el buen Josue "enano", Pablo, Nora y Victor, por ser tan divertidos y porque el tiempo no pasa en valde.

A mi buen amigo Angel por estar, por compartir diversos momentos que engrandecen nuestra amistad.

A Ergar por tener tan alto el valor de la amistad, y porque pasemos muchos años más juntos.

A mis queridos cuates de la facultad: Leonardo, Jorge, Jazmín, Argel y Chíos (queridos).

A Lety porque puedo contar contigo.

A Armando "Arch" por permitirme conocer cosas chistosas de la vida y sobretodo por ampliar mi vocabulario.

Pero por supuesto, mis compas del laboratorio tienen que destacar , empezando por:

***Rosana**, gracias por la compañía, por el apoyo moral y por la socialización a través del brindis... ¡SALUD!*

*A **Herli** porque se que eres una gran persona, que se cuenta contigo y porque siempre tienes todos los aditamentos del laboratorio que necesitamos. Gracias por soportar mi mal genio.*

*Al buen **Ale**, por el intercambio de palabras que hace mucho más ameno el día. Por ayudarme a razonar y porque de alguna manera has contribuído a darme cuenta que existen músculos que nunca pense tener.*

*Al **Doc.** porque a pesar de ser un jefe excelente (gritos y regaños), también es un buen amigo con una calidad humana enorme.*

*A **George** por su espíritu que lo hace ser una grandiosa persona.*

*A **Roberto** por pensar en mí para ofrecerme chamba y por estimularme a pensar rápido durante su plática.*

*A **Angélica** "Chaparris" porque los últimos siempre serán los primeros.*

*A **Laura** por proveerme de pomaditas quita manchas y por evitar que pegara posters en la calle.*

*A **Montse** por ser una fayuquera alivianada.*

*A **Felipón** por ser tan anecdótico y por las charlas a cerca de autos.*

*A **Mabel** por preparar expresos buenísimos y mojitos concentrados.*

*A **Héctor** por ser tan buen aprendiz.*

*Y más que ha nadie a **Pinch**, por que juntos formamos el duo dinámico y conquistaremos nuestro mundo y más allá. Gracias por ser un gran maestro y no sólo de la vida.*

MUCHAS GRACIAS A TODOS PORQUE CONTRIBUYERON DE MANERA SUSTANCIAL

SINCERAMENTE

Blanchis

ABREVIATURAS

ABTS	2-2'-Azino-di[3-etilbenzoliazo-lino sulfonato (6)]
ADNc	ácido desoxirribonucleico complementario
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
CFA	adyuvante completo de Freund
CID	coagulación intravascular diseminada
oC	grados Celsius
DE50	dosis efectiva media
DL50	dosis letal media
DMN	dosis mínima necrotizantes
DTT	dithiothreitol
EDTA	ácido etilendiamino tetra-acético
EK	enterocinasa
EtBr	bromuro de etidio
FII	fracción II necrotóxica
FPLC	fast protein liquid chromatography
g	gramo
GSH	glutación reducido
GSSG	glutación oxidado
IFA	adyuvante incompleto de Freund
IPTG	isopropyl-beta-D-thiogalactopiranosido
IRA	insuficiencia renal aguda
KHz	kilo Hertz
L.	<i>Loxosceles</i>
Lb	<i>Loxosceles boneti</i>
LI	<i>Loxosceles laeta</i>
LPA	ácido liso-fosfatídico
LPC	liso-fosfatidilcolina
Lr	<i>Loxosceles reclusa</i>
M	molar
m	mili
l	litro
MPM	marcador de peso molecular
Ni-NTA	níquel-nitriloacético
OD	densidad óptica
pb	pares de base
PBS	Buffer de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
rpm	revoluciones por minuto
RT	reverso transcriptasa
SDS-PAGE	sodium dodecil sulfate-poliacrylamide gel electrophoresis
SMD	esfingomielinasa D
SMDr	esfingomielinasa D recombinante
TBST	Tris-Buffered Saline Tween-20
TNPAL	trinitrofenil ácido amino-laúrico
U	unidades
UA	unidades de absorbancia
UFR	unidades de fluorescencia relativas

ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN.	
I. INTRODUCCIÓN.	1
I.I. <i>Mitología e Historia.</i>	1
I.II. <i>Morfología.</i>	2
a) <i>Cefalotórax.</i>	2
b) <i>Abdomen.</i>	3
I.III. <i>Aparato venenoso y toxicidad.</i>	4
a) <i>Neurotoxinas.</i>	5
b) <i>Péptidos no neurotóxicos.</i>	5
c) <i>Enzimas.</i>	5
d) <i>Componentes de bajo peso molecular.</i>	5
e) <i>Necrotoxinas.</i>	6
I.IV. <i>Taxonomía.</i>	6
a) <i>Mesothelae.</i>	6
b) <i>Mygalomorphae.</i>	6
c) <i>Araneomorphae (Labidognatha).</i>	7
II. GÉNERO <i>Loxosceles</i>.	7
II.I. <i>Características generales.</i>	7
II.II. <i>Distribución y habitat.</i>	9
II.III. <i>Comportamiento.</i>	9
II.IV. <i>Aparato venenoso y veneno.</i>	10
II.V. <i>Toxinología del veneno.</i>	13
a) <i>lesiones locales.</i>	14
b) <i>lesiones sistémicas.</i>	17
II.VI. <i>Tratamiento del loxoscelismo.</i>	18
a) <i>Tratamiento específico.</i>	18
b) <i>Tratamiento inespecífico.</i>	19
II.VII. <i>Especies de interés médico.</i>	20
III. ANTECEDENTES. APROXIMACIÓN TEÓRICA.	21
III.I. <i>L. intermedia.</i>	
III.I.I. <i>Bioquímica del veneno.</i>	21
III.I.II. <i>Clonación y secuenciación del gen de la esfingomielinasa.</i>	21
III.II. <i>L. boneti.</i>	
III.II.I. <i>Caracterización bioquímica e inmunológica del veneno.</i>	22

	<i>Pág.</i>	
III.II.II.	<i>Clonación y secuenciación de los genes de las esfingomielinasa de L. boneti y L. reclusa.</i>	23
III.III.	<i>L. laeta.</i>	
III.III.I.	<i>Clonación y secuenciación de los genes de las esfingomielinasas.</i>	25
IV.	JUSTIFICACIÓN.	26
V.	OBJETIVOS.	26
	<i>Objetivo general.</i>	26
	<i>Objetivos particulares.</i>	26
VI.	MATERIAL Y MÉTODOS.	27
VI.I.	Materiales.	28
VI.I.I.	<i>Especímenes vivos.</i>	28
a)	<i>Arañas.</i>	28
a.1.	<i>L. boneti.</i>	28
a.2.	<i>L. reclusa.</i>	28
a.3.	<i>L. laeta.</i>	28
b)	<i>Conejos.</i>	28
c)	<i>Ratones.</i>	28
VI.I.II.	<i>Reactivos.</i>	28
VI.I.III.	<i>Filtración en gel.</i>	29
VI.I.IV.	<i>FPLC.</i>	29
VI.I.V.	<i>Oligonucleótidos.</i>	29
VI.I.VI.	<i>Enzimas.</i>	29
VI.I.VII.	<i>Vectores.</i>	29
VI.I.VIII.	<i>Kits.</i>	30
VI.I.IX.	<i>Células competentes.</i>	30
VI.I.X.	<i>Adyuvantes.</i>	30
VI.II.	Metodología.	31
VI.II.I.	<i>Obtención del veneno.</i>	31
VI.II.II.	<i>Cromatografía en gel.</i>	32
VI.II.III.	<i>Cromatografía de intercambio iónico (FPLC).</i>	32
VI.II.IV.	<i>Extracción de RNA total de las glándulas venenosas de araña por el método de Piotr Chomczynski y Nicoleta Sacchi, 1987.</i>	33

	Pág.	
VI.II.V.	<i>3' RACE - (Rapid amplification of cDNA Ends; Gibco-BRL).</i>	34
VI.II.VI.	<i>Clonación y secuenciación de los genes de las esfingomielinasas D de Loxosceles.</i>	36
VI.II.VII.	<i>Análisis de las secuencias y alineamientos.</i>	37
VI.II.VIII.	<i>Electroforesis.</i>	37
VI.II.IX.	<i>Construcciones en vectores de expresión.</i>	38
VI.II.X.	<i>Transformación.</i>	39
VI.II.XI.	<i>Expresión y purificación de proteínas recombinantes.</i>	40
a.1.	<i>Cultivo celular.</i>	40
a.2.	<i>Extracción.</i>	41
a.3.	<i>Purificación.</i>	41
VI.II.XII.	<i>Plegamiento in vitro de la proteína recombinante.</i>	42
VI.II.XIII.	<i>Hidrólisis de un fragmento de la proteína recombinante (SMDr) con la enzima enterocinasa (EK).</i>	43
VI.II.XIV.	<i>Cuantificación de proteínas.</i>	44
VI.II.XV.	<i>Medición de la actividad enzimática de esfingomielinasas.</i>	44
VI.II.XVI.	<i>Inhibición de la actividad enzimática de las esfingomielinasas D de Loxosceles.</i>	46
VI.II.XVII.	<i>Inmunización de conejos.</i>	46
VI.II.XVIII.	<i>Medición de títulos por ELISA (Enzyme Linked Immuno Assay).</i>	47
VI.II.XIX.	<i>Pruebas de Western-blot.</i>	49
VI.II.XX.	<i>Valoración de la dosis letal media en ratones.</i>	50
VI.II.XXI.	<i>Valoración de la inmunidad pasiva en ratones.</i>	50
VI.II.XXII.	<i>Dermonecrosis en conejos.</i>	51
VI.II.XXIII.	<i>Escalamiento en biorreactor.</i>	52
VII.	RESULTADOS.	53
VII.I.	<i>Obtención de las esfingomielinasas D nativas de L. boneti y L. reclusa.</i>	53
VII.II.	<i>Clonación, expresión y caracterización de la esfingomielinasa de L. boneti.</i>	56
VII.III.	<i>Generación de anticuerpos en conejos contra la proteína recombinante precipitada de L. boneti y caracterización inmunológica.</i>	59

	Pág.	
VII.IV.	<i>Plegamiento in vitro de la proteína recombinante precipitada de L. boneti y su caracterización bioquímica.</i>	62
VII.V.	<i>Clonación de las esfingomielinasas D completas de L. boneti, L. reclusa y L. laeta (Perú).</i>	65
VII.VI.	<i>Secuenciación y análisis de comparación de las esfingomielinasas D completas de L. boneti, L. reclusa y L. laeta (Perú).</i>	68
VII.VII.	<i>Análisis de comparación entre las secuencias de las esfingomielinasas de L. laeta variedad peruana con las esfingomielinasas D de L. laeta variedad brasileña.</i>	69
VII.VIII.	<i>Alineamiento múltiple de las secuencias reportadas de las esfingomielinasas D de Loxosceles.</i>	69
VII.IX.	<i>Clonación de los genes de esfingomielinasas de L. boneti, L. reclusa y L. laeta en los vectores pQE30 y pQE60.</i>	74
VII.X.	<i>Expresión de las esfingomielinasas solubles (SMDr) en sistemas bacterianos.</i>	75
VII.XI.	<i>Medición y comparación de las actividades específicas de las esfingomielinasas recombinantes contra las nativas.</i>	77
VII.XII.	<i>Producción de anticuerpos en conejos contra las: SMDrLb1-NH2, SMDrLb1-COOH, SMDrLr1-NH2, SMDrLl1-NH2 y SMDrLl2-COOH.</i>	79
VII.XIII.	<i>Determinación de reacciones cruzadas.</i>	82
VII.XIV.	<i>Inhibición de la actividad enzimática de la SMDrLb1-NH2 con el suero hiperinmune generado a partir de SMDrLb1-NH2.</i>	80
VII.XV.	<i>Pruebas toxicológicas e inmunológicas en animales.</i>	81
VI.XV.I.	<i>Dermonecrosis en conejos.</i>	82
VI.XV.II.	<i>Determinación de la dosis letal media de las proteínas recombinantes y veneno de Loxosceles, en ratones balb-c.</i>	82
VI.XV.III.	<i>Determinación de la dosis efectiva media (DE50) de los sueros anti-SMDr, en ratones balb-c.</i>	83
VIII.	DISCUSIÓN.	89
VIII.I	<i>Caracterización bioquímica del veneno de L. boneti y L. reclusa.</i>	87

	<i>Pág.</i>	
<i>VIII.II.</i>	<i>Análisis de las secuencias de las SMD de Loxosceles.</i>	88
<i>VIII.III.</i>	<i>Generación de proteínas recombinantes.</i>	89
<i>VIII.IV.</i>	<i>Plegamiento <i>in vitro</i> de la proteína recombinante precipitada de L. boneti.</i>	90
<i>VIII.V.</i>	<i>Producción de proteínas solubles y activas.</i>	91
<i>VIII.VI.</i>	<i>Producción de anticuerpos neutralizantes y pruebas de neutralización.</i>	93
<i>IX.</i>	CONCLUSIONES.	96
<i>X.</i>	PERSPECTIVAS.	96
	BIBLIOGRAFÍA.	
	APÉNDICE DE SOLUCIONES.	
	PUBLICACIÓN.	

RESUMEN.

De la gran variedad de especies de arañas en el mundo, sólo unas pocas son capaces de producir cuadros severos de envenenamiento en el hombre; entre ellas se encuentran las del género *Loxosceles*. Estas arañas se caracterizan por tener una marca en forma del violín en la parte superior del cefalotórax, por lo cual se llaman comúnmente arañas violinistas.

La patología característica por mordedura de *Loxosceles* es la dermonecrosis y en algunos casos puede causar daños sistémicos como hemólisis y daño renal, entre otras. Estas patologías las provoca la actividad de la esfingomielinasa D (28-32.5 kDa), el componente principal del veneno. Dentro de las especies de este género que tienen mayor importancia sanitaria a nivel mundial destacan *L. reclusa* (E.U.), *L. gaucho* (Brasil), *L. intermedia* (Brasil) y *L. laeta* (Chile, Argentina y Perú) (de Roodt, *et al.*, 2002).

En nuestro país, habitan 39 especies de este género y todavía no existe algún antídoto contra los efectos de la mordedura; por lo que este trabajo tuvo como objetivo generar antígenos recombinantes para la producción de un antiveneno que neutralice el efecto de la mordedura.

Para esto se aisló el ARNm de las glándulas venenosas de: *L. boneti*, *L. reclusa* y *L. laeta*. Mediante la técnica RT-PCR y oligonucleótidos diseñados a partir de la secuencia amino terminal de las esfingomielinasas D, se obtuvo un fragmento de aproximadamente 1Kb para cada especie. Los productos de PCR se clonaron, se secuenciaron y se confirmó la identidad de las secuencias completas de varias esfingomielinasas (SMD) (Ramos-Cerrillo *et al.*, 2004). Estos genes se clonaron en vectores de expresión en *E.coli* que generaron proteínas con etiquetas de histidinas en los extremos amino o carboxilo terminales. Se determinaron las condiciones óptimas de expresión para la obtención de proteínas solubles. Estas proteínas tuvieron un peso molecular entre 28-34 kDa y presentaron características biológicas propias de las proteínas nativas, como son la capacidad de necrosar la piel de conejos, de matar ratones y de hidrolizar la esfingomielina.

Estas proteínas se usaron como inmunógenos para la producción de anticuerpos policlonales en conejos. Los anticuerpos que se generaron fueron capaces de neutralizar eficazmente el efecto del veneno en ratones y además presentaron reacciones cruzadas contra el veneno de diferentes especies *Loxosceles*.

I. INTRODUCCIÓN.

I.I. Mitología e Historia.

Sin duda alguna, las arañas poseen características muy particulares que despiertan cierta curiosidad e interés en el hombre. Esto ha propiciado que se tengan registros, leyendas y creencias sobre ellas desde tiempos remotos.

Mitología Griega.

En la Antigua Grecia se atribuyó el origen de la araña a la metamorfosis sufrida por Aracné, una mujer famosa por la belleza de sus hilados y tejidos. Aracné vanagloriándose de su habilidad, retó a Atenea, diosa de la sabiduría, las artes, la tempestad y el rayo. Ésta le pidió que retirará su reto, pero Aracné se negó. El reto consistía en que Aracné elaborara un tejido que no tuviera error alguno. Aracné realizó un precioso tejido, representando al romance. El trabajo de la bella Aracné fue de tal perfección que Atenea enfurecida por el hecho, deshizo los trabajos, enredando con los hilos a Aracné, provocando la muerte por ahorcamiento de la experta tejedora. Sin embargo, Atenea, arrepentida de su acto, devolvió la vida a la bella joven, aunque transformándola en araña. Del hilo formó una telaraña, y en ella pendería Aracné, condenándola a permanecer colgada y a tejer eternamente con hilos extraídos de su propio cuerpo (Hoffman, 1997; Pineda, 2002).

Las arañas han tenido un simbolismo importante en la cultura, por ejemplo, en un pueblo de África Occidental, se cree que el Sol, la Luna y las estrellas fueron creados por éstas; además la araña intercede entre los dioses y el hombre.

En Asia Central y Siberia la araña representa el alma liberada del cuerpo.

Para los Muisca en Colombia, las almas de los muertos que iban al infierno eran transportadas en un barco de telaraña.

En el Islam, la araña representa dos conceptos contrarios: la blanca simboliza la protección y la negra el daño.

Los primeros datos acerca de la Biología *per se* y el comportamiento de las arañas, las aportó Aristóteles (384-322 a.C.).

I.II. Morfología.

Anatómicamente el cuerpo de la araña se divide en dos partes:

- a) Cefalotórax o prosoma.**
- b) Abdomen u opistosoma.**

Estas dos partes están unidas por una cintura estrecha llamada pedicelo. Como los demás artrópodos, las arañas poseen un exoesqueleto rígido, pero a diferencia de los insectos, poseen una capa externa (cutícula). El componente estructural mayoritario del exoesqueleto es la quitina, polisacárido nitrogenado que forma matrices con otros azúcares y proteínas (escleróticas), formando fuertes conexiones, confiriéndole una gran resistencia. Por tanto, la función del exoesqueleto es sostener y proteger al cuerpo de la araña, además de reducir significativamente la pérdida de agua.

a) Cefalotoráx.

La parte dorsal del cefalotórax está cubierta por una placa llamada caparaza, que le confiere un aspecto cóncavo, lo que permite que los músculos permanezcan unidos y sean contráctiles.

En la parte antero superior del cefalotórax, están los ojos. El número y arreglo varía entre cada familia de arácnidos, siendo una característica determinante en la taxonomía de arañas. Otros apéndices que se encuentran en la parte frontal del cefalotórax son los pedipalpos, que tienen aspecto de patas pequeñas. Estos apéndices se usan para manipular a la presa y además actúan como filtros al momento de succionar el alimento.

Por otro lado los pedipalpos son muy importantes en el sentido reproductivo. Cuando un macho llega a la madurez sexual, los pedipalpos se modifican de tal manera que, en la punta de estos, se desarrolla una estructura tipo bulbo que termina con un aguijón, que funciona como órgano inyector de esperma (Preston-Mafham, *et al.*, 1996). En muchas especies, los machos desarrollan

en las puntas del primer par de patas verdaderas, unas estructuras llamadas ganchos de apareamiento, que sostienen a los quelíceros de la hembra, mientras el macho inyecta el esperma durante el apareamiento.

Entre los pedipalpos existe un par de estructuras robustas llamadas quelíceros, estos son apéndices muy fuertes, que se usan para cavar sus madrigueras o bien permiten a la araña hembra transportar su ooteca (estructura donde depositan sus huevos). Las glándulas venenosas se encuentran en la base de dichas estructuras, lo que facilita la disposición de veneno cuando hay que inyectarlo.

b) Abdomen.

En la parte posterior del cuerpo de la araña se encuentra el abdomen. Posee un aspecto globular y aquí es donde se llevan a cabo las funciones vegetativas como: la respiración, la circulación, la digestión, la excreción y la reproducción.

La piel que recubre el abdomen, a diferencia de la del cefalotórax, es suave y expandible, lo cual no sólo les permite almacenar el alimento sino también el desarrollo de los huevos, en el caso de las hembras.

Las arañas poseen dos sistemas de uso alternativo en el intercambio de gases: los pulmones libro y, el espiráculo traqueal. El primer sistema se encuentra en la parte antero-inferior del abdomen. Éste se identifica por un par de marcas en forma de semicírculo, las cuales son las aberturas pulmonares. Por estos conductos se toma el oxígeno y se lleva directamente al torrente sanguíneo. En la parte posterior del abdomen se encuentra el segundo sistema, que se identifica como un pequeño orificio virtual.

Entre los pulmones libro, se encuentra el surco epigástrico, el cual es la apertura de los órganos genitales. En el caso de las hembras, este surco es mucho más pronunciado.

En el extremo posterior del abdomen, se localiza el ano, a través del cual, los desechos se excretan. Frente al ano están las hileras, apéndices de aspecto tubular, por donde se secreta la seda. Algunas arañas tienen por delante de las hileras otra estructura llamada cribelo, que actúa como criba,

es decir, cuela la seda que sale al exterior en numerosos hilos los cuales peina el calamistro, que es una especie de peine, compuesto por pelos duros espiniformes que se encuentran en el cuarto par de patas. Otras arañas en lugar de cribelo tienen un órgano pequeño llamado colulo, del cual se desconoce su función (Hoffman, 1997). En la Figura 1 se ilustra la anatomía general de las arañas.

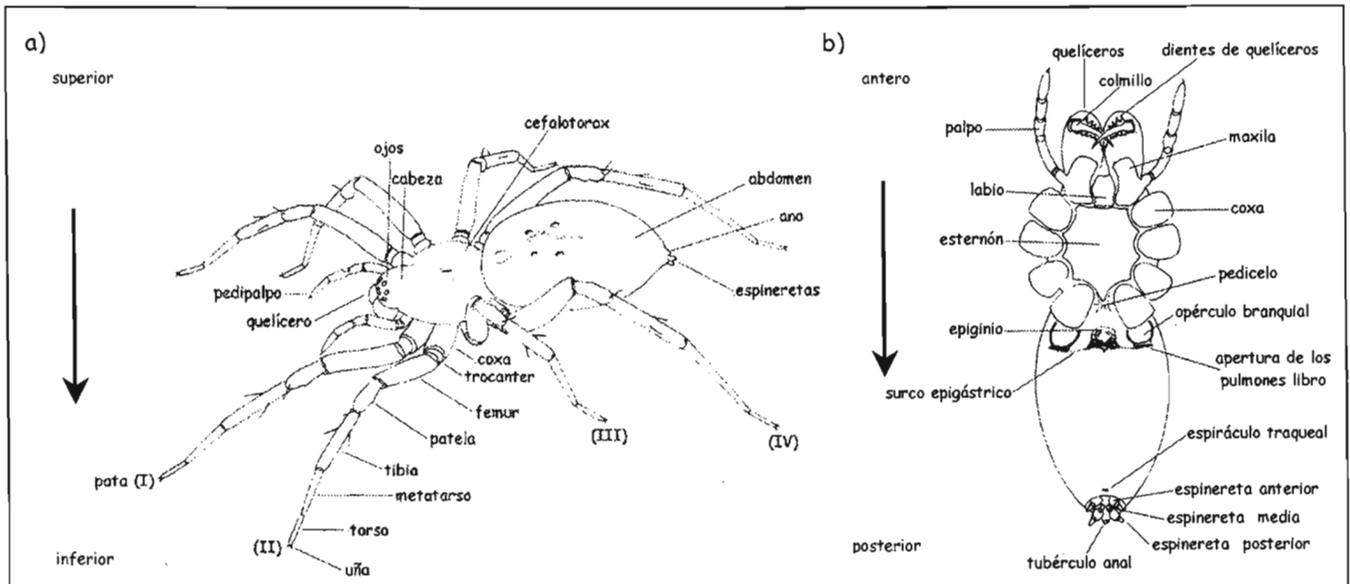


Figura 1. Anatomía general de una araña. a) vista superior y b) vista inferior de la estructura corporal externa. (Preston-Mafham, *et al.*, 1996).

I.III. Aparato venenoso y toxicidad.

Todas las arañas, excepto la familia Uloboridae (arañas de patas plumosas), poseen un par de glándulas venenosas localizadas en la base de los queliceros. Cada glándula está compuesta por una parte cilíndrica y unos ductos. Estos últimos se insertan en los queliceros y se abren al exterior por medio de un poro hacia el ápice. La pared de las glándulas venenosas está formada por un epitelio de secreción holócrina que recubre a una capa muscular; ésta a su vez está conectada por una lámina basal a las células glandulares. La musculatura es estriada y autónoma, es decir, posee su propio motor neural. El epitelio también está innervado, lo cual estimula o regula la síntesis del veneno. Cuando las arañas muerden a sus presas hay una contracción de la musculatura y el veneno se expulsa rápidamente. La función primaria del veneno es inmovilizar a sus presas y los efectos letales, son consecuencias secundarias (Foelix, 1996).

El veneno de las arañas es una mezcla de compuestos, los cuales se dividen en varios grupos (Rash, *et al.*, 2002):

a) Neurotoxinas.

Tienen una variedad de acciones en el sistema nervioso. El blanco de acción de las toxinas de arañas, son los receptores a neurotransmisores, los canales iónicos y las proteínas de la membrana presináptica involucradas en la liberación de neurotransmisores.

Las neurotoxinas de arañas se clasifican de acuerdo a su modo de acción:

- a.1. Toxinas que son antagonistas de receptores de glutamato
- a.2. Los que actúan sobre canales de calcio, sodio, potasio y cloro
- a.3. Las toxinas que bloquean a los receptores post-sinápticos colinérgicos.

b) Péptidos no neurotóxicos.

La mayor parte de las toxinas de tipo peptídico no neurotóxicas son capaces de afectar directamente a las células. Ejemplos de estos péptidos son los de la familia Salticidae (arañas saltarinas), que actúan en células de ratón e insectos.

c) Enzimas.

Son los componentes más comunes del veneno de las arañas, entre las que destacan la hialuronidasa, las proteasas, las metaloproteasas, las fosfodiesterasas, las fosfolipasas, etc.

d) Componentes de bajo peso molecular.

Tienen diversas actividades farmacológicas que en su mayoría no se han elucidado completamente. Dentro de este grupo se incluyen aminas biogénicas, aminoácidos libres, poliaminas, nucleótidos y sales inorgánicas.

e) Necrotoxinas.

Tienen la capacidad de inducir el desarrollo de necrosis cutánea, como es el caso de la esfingomielinasa D del género *Loxosceles*. De estas toxinas en particular se hablará a lo largo de toda esta tesis.

I.IV. Taxonomía.

Las arañas son un grupo muy antiguo, se tiene un registro fósil que data de 300 millones de años, correspondiente al período Carbonífero. Actualmente se estima que existen alrededor de 40,000 especies de arañas en el mundo, aunque no se han descrito en su mayoría.

En nuestro país se han encontrado 50 familias, 340 géneros y cerca de 2000 especies (Hoffman, 1997), sin embargo, se piensa que no son ni la mitad de las que pueden existir, ya que faltan muchas especies por clasificar y determinar.

Todas las arañas pertenecen al Phylum Artropoda, un gran grupo de animales con patas articuladas y exoesqueleto rígido. La clase de la que forman parte es la Arachnida, la cual comprende organismos que anatómicamente están conformados por dos tagmas: el cefalotórax y el abdomen. Otras características de los organismos que conforman esta clase es que tienen cuatro pares de patas y no poseen antenas ni alas. Las arañas figuran dentro del orden Araneae que a su vez es dividido en tres subordenes:

a) Mesothelae.

Filogenéticamente son el grupo más antiguo dado que poseen el abdomen segmentado y cuatro pares de espineretas ventrales. Este suborden está conformado por una familia, dos géneros y 40 especies (Foelix, 1996).

b) Mygalomorphae.

Grupo cuyos quelíceros se localizan hacia el frente de la cabeza en forma paralela y sus colmillos se mueven hacia delante y abajo (Figura 2). Otras de las características que agrupa este suborden es que, carecen de espineretas medias, y las laterales están muy reducidas.

Dentro de este grupo se encuentran todas las tarántulas, agrupadas en 15 familias, 260 géneros y cerca de 2200 especies (Foelix, 1996).

c) Araneomorphae (Labidognatha).

Las arañas que se clasifican en este suborden tiene los colmillos por debajo de la cabeza, acomodados de forma perpendicular al eje antero-posterior del cuerpo y se mueven lateralmente (Figura 2). Aunque todavía no queda clara la taxonomía de estas arañas, se dice que aquí se agrupan las "arañas verdaderas" y aloja a más del 90% de ellas. Este suborden está conformado por 90 familias, 2700 géneros y alrededor de 32,000 especies. El género *Loxosceles* se clasifica dentro de este grupo (Foelix, 1996).

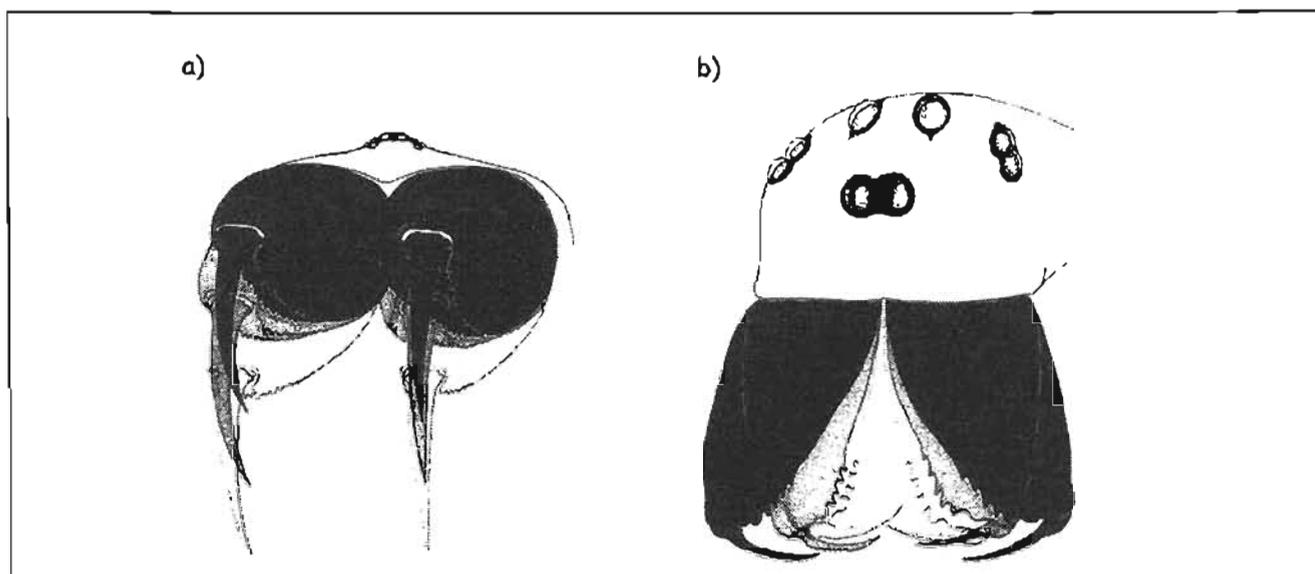


Figura 2. Esquema que ilustra la diferencia en la posición de los quelíceros entre las arañas a) Mygalomorphae (tarántulas) y b) Araneomorphae (arañas verdaderas) (Preston-Matham, *et al.*, 1996).

II. GÉNERO *Loxosceles*

II.1. Características generales.

Las arañas de este género pertenecen al grupo Haplogynae, cuya característica es que los órganos sexuales en las hembras son muy simples y en su mayoría carecen de ductos de fertilización. La familia de la que forman parte es la Sicariidae y el género es *Loxosceles* dentro del cual se encuentran alrededor de 100 especies descritas. (Platnick, 2000).

El término **Loxosceles** proviene de las raíces griegas **loxos**: curvas y **kelos**: patas, ya que por la longitud (2 a 4 centímetros), y anatomía de sus patas, tienen un aspecto circular o curvo. Sin embargo la característica que sobresale de estos animales es una marca oscura en forma de violín en la parte anterosuperior del cefalotórax por lo que se conocen comúnmente como arañas violinistas. Otro nombre común de estos animales es araña marrón, debido a que su color es café amarillento, el cual puede variar de tono dependiendo de la especie y del estadio en el que se encuentren.

Estas arañas también se nombran reclusas, debido a que sus hábitos son lucífugos y sedentarios, es decir, se hallan en cualquier refugio oscuro protegido y con poca humedad.

La longitud corporal de las arañas violinistas varía entre 8 y 13 mm, sus patas son largas y delgadas y los palpos son pequeños. Las diferencias externas entre una hembra y un macho radica en que las patas del macho son más largas, y el abdomen es más estrecho (Alvarez del Toro, 1992). Poseen seis ojos dispuestos en diadas y microvellosidades a lo largo de todo el cuerpo, llamadas tricobotrias (Figura 3) (Alvarez del Toro, 1992).



Figura 3. Fotografía que ilustra las características corporales de una araña violinista. En la parte antero-superior del cefalotórax resalta a la vista, una marca oscura en forma de violín con el mástil hacia atrás.

II.II. Distribución y Hábitat.

Las arañas de este género son cosmopolitas y se distribuyen principalmente en regiones tropicales y templadas. En el mundo se reconocen al menos 100 especies del género *Loxosceles*, figurando entre ellas *L. reclusa*, que se distribuye en el sureste de E.U., *L. boneti* que se encuentra en el noreste de Guerrero, sur y centro de Morelos en México y, *L. laeta*, aunque es nativa de Chile, también se tienen registros de ella en el este de Argentina y sur de Perú (Hoffmann, 1976; Gertsch, 1983; Platnick 2000). De estas tres especies se hablará a lo largo de toda esta tesis.

Los principales habitats que ocupan estas arañas son orificios naturales de barrancos, bajo la corteza de los árboles, en cavernas, y/o cualquier objeto que esté a la intemperie, que facilite la construcción de un refugio. Otros sitios recurrentes, donde se pueden encontrar estas arañas, son interiores y exteriores de viviendas. En el primer caso es frecuente encontrarlas detrás de cuadros, en muebles cercanos a las paredes, en grietas, entre las uniones de ladrillos, en sanitarios, etc. En el segundo caso pueden hallarse en refugios no expuestos directamente al sol, ya que esto aunado a una alta humedad afecta la supervivencia de los individuos que forman parte de este género.

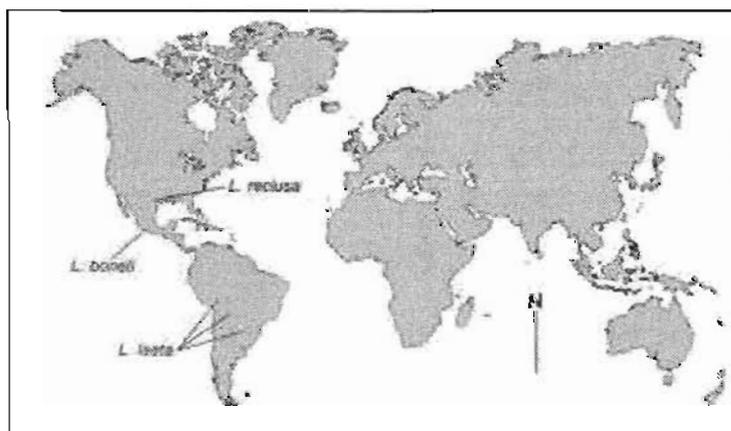


Figura 4. Distribución de las arañas *L. reclusa*, *L. boneti* y *L. laeta* en el mundo (Platnick, 2000).

II.III. Comportamiento.

Las *Loxosceles* son arañas de actividad principalmente nocturna, sedentarias y se alimentan de insectos pequeños.

Las hembras tejen las ootecas (estructuras con aspecto algodonoso en donde depositan sus huevos) cuando las condiciones ambientales son favorables y el

alimento es abundante, debido a que estos factores son importantes para la supervivencia de las crías. De esta manera, la madre garantiza el desarrollo de los nuevos individuos.

Las arañas recién nacidas mudarán de exoesqueleto por lo menos de 4 a 12 veces antes de la madurez, ya que ciertas partes de la araña todavía no están completamente desarrolladas.

Conforme se va dando el desarrollo ontogenético la concentración y la actividad del veneno se incrementan simultáneamente. En las arañas *Loxosceles* el veneno aparece hasta la tercera muda; esto correlaciona con la aparición de las habilidades para cazar y predar por sí solas (Goncalves, *et al.*, 1999).

Las *Loxosceles* cazan clavando los colmillos en la presa con el fin de paralizarla (Moye de Alba, 1997; Biagi, 1974). Inmediatamente después arrojan enzimas digestivas para degradar al alimento antes de ingerirlo (Preston-Mafham, 1996). Cabe resaltar que la tela de estas arañas, de aspecto algodonoso sin patrón específico, no la usan para cazar, sino más bien la utilizan como refugio (de Roodt, *et al.*, 2002).

Ninguna de estas arañas es agresiva. El comportamiento defensivo se suscita cuando no hay alternativa de huida. En humanos las mordeduras por *Loxosceles* ocurren principalmente por esta razón, ya que la araña al sentirse oprimida, contra el cuerpo o entre los pliegues de la ropa, responderá con su único sistema de defensa: la mordedura.

II.IV. Aparato venenoso y veneno.

Como se mencionó anteriormente, las glándulas productoras de veneno son de secreción holocrina, es decir, la secreción constituida por células desintegradas o alteradas de la propia glándula (dos Santos *et al.*, 2000).

Se ha encontrado que las proteínas del veneno de *Loxosceles* son una mezcla muy heterogénea, su rango de peso molecular varía entre 5 y 850 kDa. En recientes estudios se ha observado que la mayor parte de las proteínas entre 60 y 850 kDa son contaminaciones por fluidos digestivos de la araña, ya que ésta suele arrojar dichos fluidos por la manipulación que se le da al momento de extraer el veneno (Veiga, *et al.*, 2000).

Por todo lo anterior se plantea que las proteínas propias del veneno se encuentran entre 5 y 40 kDa. El veneno puede presentar diferencias en cuanto a su actividad, dependiendo de la edad, el estado fisiológico y el sexo de la araña (de Oliveira, *et al.*, 1999).

El veneno de *Loxosceles* tiene una gran variedad de componentes entre los que figuran: la histamina, la serotonina, el ácido gamma amino butírico, la espermina, los 5'-ribonucleótidos, la fosfatasa alcalina, la hialuronidasa, las proteasas y las esfingomielinasas. (Ramos, 2000).

Aunque se han identificado los componentes principales del veneno, todavía no queda clara la función específica de algunas de estas sustancias.

Uno de los componentes, que se le ha atribuido alguna función, es la espermina; es una amina biogénica, que para el caso de algunos animales son potentes antagonistas de receptores de glutamato (Williams, 1997), y aunque no están consideradas dentro de las fracciones citotóxicas, pueden ocasionar dolor al ser inoculadas en mamíferos (Ramos, 2000).

Otro componente que se ha encontrado en varios venenos incluyendo al de *Loxosceles rufescens*, son las hialuronidasas (Young, *et al.*, 2001). Son enzimas que catalizan la ruptura de ciertos mucopolisacáridos del tejido conectivo, ácido hialurónico y coindritín sulfato A y C, componentes esenciales de la matriz extracelular. La función de estas enzimas se considera esencial para el envenamiento ya que actúa como factor de dispersión del veneno, debido a que la hidrólisis del ácido hialurónico facilita la difusión del resto de los componentes dentro de la víctima (Cevallos, *et al.*, 1992).

Se han identificado dos metaloproteasas en el veneno de *Loxosceles*: loxolisina A y loxolisina B (Feitosa, *et al.*, 1998).

La loxolisina A (20-28 kDa), posee actividad fibrinogenolítica (degrada fibrinógeno) y fibronectinolítica (degrada fibronectina). El fibrinógeno es una glicoproteína dimérica de 340 kDa. Está formada por tres cadenas: la subunidad A (α) de 64 kDa, la subunidad B (β) de 56 kDa y la subunidad G (γ) de 47 kDa (Williams *et al.*, 1983). Las tres cadenas están unidas covalentemente por puentes disulfuro. Se ha observado que la loxolisina A solamente actúa en la subunidad α , provocando una coagulación

intravascular diseminada por la formación de fibrina (Feitosa *et al.*, 1998), lo cual posiblemente contribuya de manera relevante a la necrosis (Young, *et al.*, 2001).

La loxolisina B es una proteasa que pesa entre 32-35 kDa. Esta enzima es capaz de degradar gelatina y probablemente está involucrada en la degradación de colágeno dentro de la matriz extracelular (Young, *et al.*, 2001).

La especificidad de las proteasas es tal, que no daña a la misma araña. Por ejemplo la membrana basal de las glándulas de *L. intermedia* es muy rica en laminina (dos Santos *et al.*, 1999) y el veneno de esta araña no presenta actividad laminolítica (Veiga, *et al.*, 2000).

Por otro lado, en el veneno de algunas *Loxosceles* se han identificado proteasas de serina de alto peso molecular (85-95 kDa). Éstas son gelatinolíticas y se activan por tratamiento con tripsina. (Veiga, *et al.*, 2000).

Sin embargo, la esfingomielinasa D es el componente principal en el veneno de *Loxosceles* y se ha demostrado que por sí sola es la responsable de ocasionar lesiones locales (necrosis) y sistémicas (Fernandes Pedrosa, *et al.*, 2002; Ramos, 2002). Esta enzima hidroliza el enlace fosfoéster de la esfingomielina y genera dos productos: la fosfoceramida y la colina (Figura 5) (Gatt, 1978).

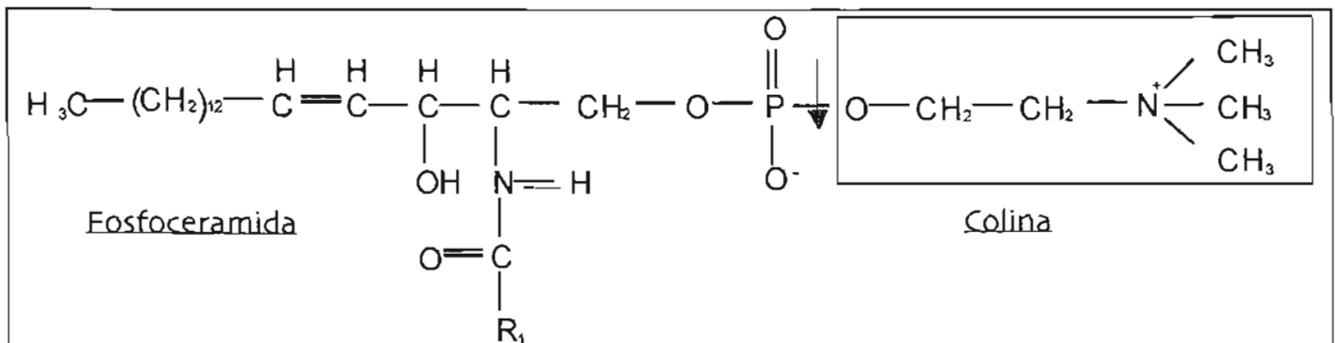


Figura 5. Fórmula de la esfingomielina y productos generados a partir de la hidrólisis por esfingomielinasa D. La flecha indica el sitio de hidrólisis (Gatt, 1978). R_1 =residuo acilo.

Se ha observado que la esfingomielinasa se une a membranas celulares, como las de los eritrocitos e inducen la quimiotaxis de los neutrófilos, ocasionando trombosis vascular (Moye de Alba, 1997). Aunque todavía no queda claro el mecanismo de acción de la esfingomielinasa sobre la membrana celular, se han postulado dos hipótesis:

1. El receptor de la esfingomielinasa es la misma esfingomielina, la cual se encuentra abundantemente en la monocapa externa de la membrana plasmática y es ahí donde actúa exclusivamente (Rees, *et al.*, 1984).
2. La esfingomielinasa tiene una estructura secundaria tipo anfifílica, lo que permite que se inserte en la membrana provocando la hidrólisis de la esfingomielina (Rees, *et al.*, 1984).

Aunque todavía no es claro como la esfingomielinasa D actúa en la membrana, la generación de necrosis puede ocurrir a través de mediadores inflamatorios debido a la generación de fosfolípidos derivados. La generación de sustancias inflamatorias como las prostaglandinas, los tromboxanos y los leucotrienos contribuyen a la reacción inflamatoria, la cual se amplifica por el complemento provocando lesiones necróticas (Rees, *et al.*, 1984).

Se han reportado varias isoformas para las esfingomielinasas de al menos tres especies de *Loxosceles*. En el veneno de *L. reclusa* se han encontrado cuatro formas activas, con un peso molecular que varía entre 32 y 34 kDa con puntos isoeléctricos de 7.8, 8.2, 8.4 y 8.7 (Kurpiewski *et al.*, 1981).

Tambourgi y colaboradores en 1998 reportaron tres isoformas de la esfingomielinasa presentes en el veneno de *L. intermedia*. El peso molecular de las tres isoformas oscila alrededor de 35 kDa. Dos de las isoformas (P1 y P2) son activas, no así la tercera (P3).

El mismo caso se presenta con el veneno de *L. boneti* en el cual se encontraron tres isoformas, dos de ellas presentan actividad de esfingomielinasa D, a diferencia de la tercera (Ramos, 2002).

II.V. Toxinología del veneno.

LOXOSCELISMO es el envenenamiento causado por la mordedura de una araña violín. Una de las principales razones por las que se suscitan estos accidentes es la constante convivencia con el hombre (de Roodt, *et al.*, 2002).

La mordedura de *Loxosceles* produce lesiones locales (necrosis tisular) con pérdida de tejido. En algunos casos se presentan cuadros sistémicos graves como hemólisis, coagulación intravascular diseminada (CID) e insuficiencia renal aguda (IRA), que pueden desencadenar coma y hasta la muerte (de Roodt, *et al.*, 2002). Aunque todavía no queda claro cuales son los mecanismos por los cuales se desarrollan estas patologías, la necrosis y la hemólisis están relacionadas con la activación del sistema del complemento (Tambourgi, *et al.*, 2000).

a) Lesiones locales.

En el sitio de la necrosis se observa edema, adelgazamiento del endotelio vascular, acumulación de células inflamatorias, vasodilatación, coagulación intravascular y hemorragia. Todos estos fenómenos contribuyen significativamente a la necrosis tisular.

Se han propuesto varios mecanismos por los cuales se desencadena la necrosis tisular. Uno de ellos es, que el veneno induce la expresión de E-selectinas y estimula la liberación de interleucina-8 (IL-8) y del factor estimulante de colonias de granulocitos (GM-CSF) (Tambourgi *et al.*, 1998), lo que favorece la adhesión y migración de células que sostienen y aumentan el fenómeno inflamatorio (de Roodt, *et al.*, 2002).

Se ha propuesto que la fosfoceramida, producto primario de la hidrólisis de la esfingomielina, contribuye en el proceso inflamatorio ya que promueve la liberación de ácido araquidónico y subsecuentemente la biosíntesis de eicosanoides (Gómez-Muñoz, 2004).

La fosfoceramida es un lípido regulador de respuestas inflamatorias que promueve la adhesión plaquetaria y la formación de trombos que afectan a la microcirculación (de Roodt, *et al.*, 2002). En la Figura 6 se ilustran los posibles mecanismo de producción de lesiones necróticas locales (de Roodt, *et al.*, 2002).

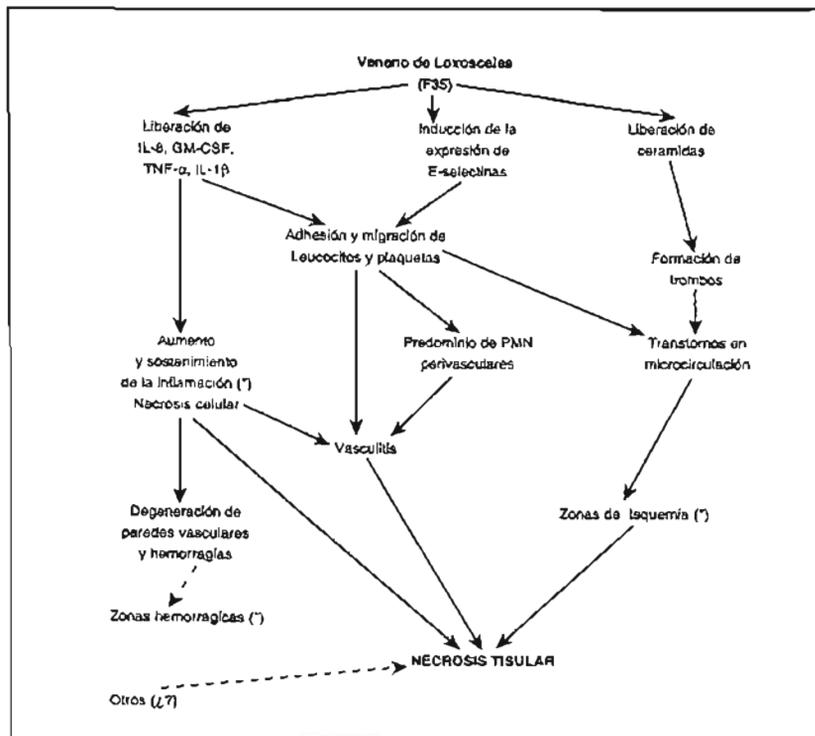


Figura 6. Posibles mecanismos de producción de necrosis locales. Los fenómenos marcados con (*) son aquellos que producirían la lesión típica del loxoscelismo cutáneo: la placa marmórea o livedoide.

De esta manera el proceso inflamatorio y la severa vasculitis, con formación de trombos, serían los principales responsables de la necrosis; así mismo favorece el desarrollo de CID y de zonas de isquemia causantes a su vez de la placa marmórea o livedoide característica local de la mordedura de *Loxosceles* (de Roodt, *et al.*, 2002).

Recientemente se ha propuesto otro posible mecanismo por el cual se desencadenan efectos fisiopatológicos propios del Loxoscelismo (van Meeteren, *et al.*, 2004). En ese estudio se demostró que la esfingomielinasa de *L. laeta* posee actividad de liso-fosfolipasa D, es decir, puede hidrolizar a la liso-fosfatidilcolina unida a la albúmina (LPC-albúmina). LPC es un componente mayoritario de la membrana plasmática, que al remover su cabeza polar, colina, produce ácido liso-fosfatídico (LPA), lípido pleiotrópico que actúa en receptores acoplados a proteínas G. LPA está involucrado en innumerables respuestas biológicas y patofisiológicas en distintos tipos celulares, provocando efectos en los sistemas circulatorio y vascular. En condiciones fisiológicas normales, los niveles de LPA son muy bajos, aunque éstos pueden aumentar por efecto de la coagulación sanguínea, consecuencia de la cicatrización por

alguna lesión. Los niveles altos de LPA en la sangre promueven efectos deletereos como la infiltración de células inflamatorias (neutrófilos), disfunción de la barrera endotelial, entre otros. Estos efectos evocan a respuestas típicas que se presentan en el loxoscelismo necrótico (van Meeteren, *et al.*, 2004) (Figura 7).

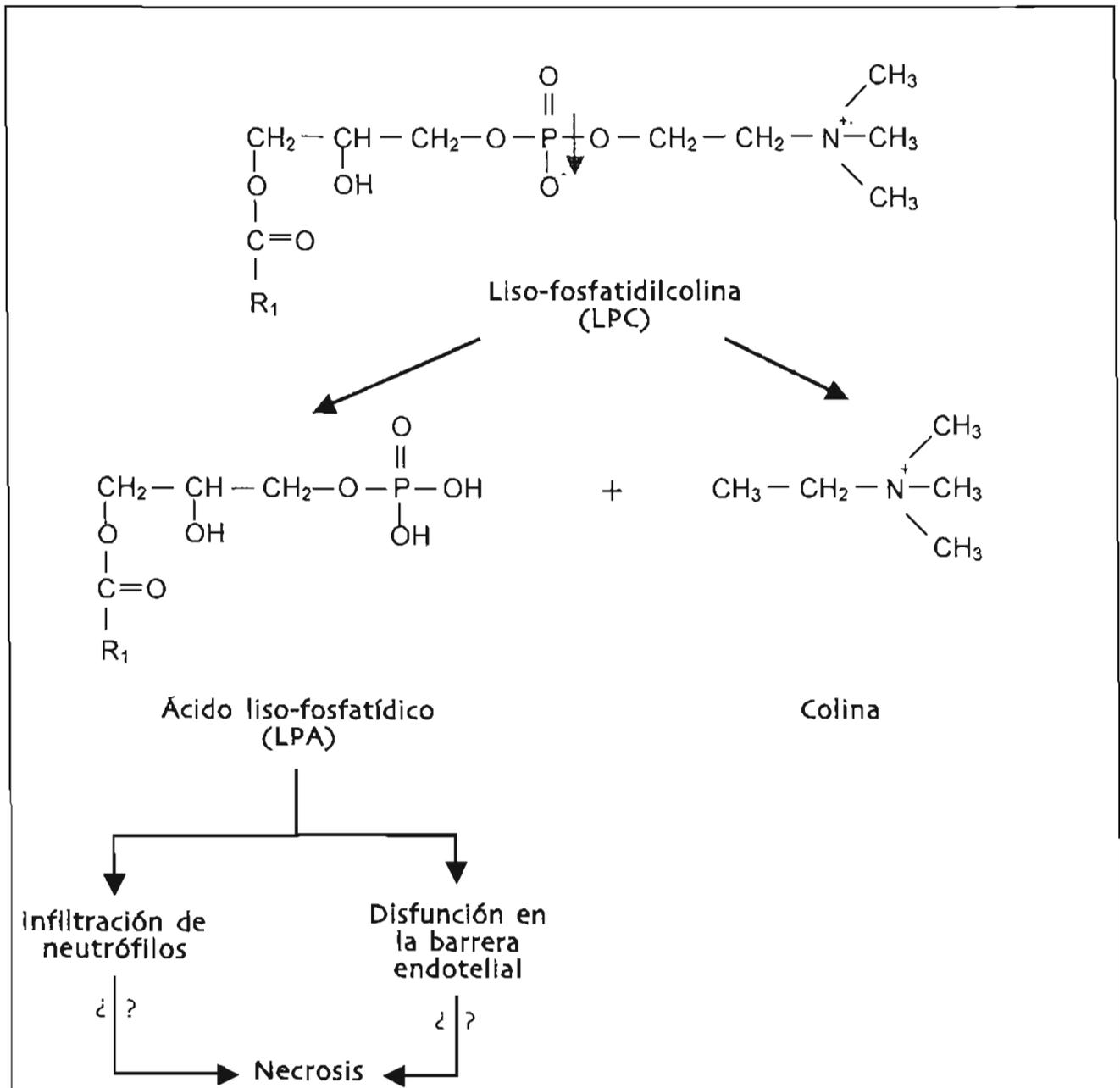


Figura 7. Actividad de la esfingomielinasa D sobre liso-fosfatidilcolina (LPC) y productos generados, que posiblemente regulan respuestas celulares durante el proceso necrótico (van Meeteren *et al.*, 2004). R₁=residuo acilo; ¿? mecanismos desconocidos.

b) Lesiones sistémicas.

Como se mencionó anteriormente en los cuadros severos de loxoscelismo, se puede desencadenar insuficiencia renal aguda (IRA) que puede deberse a la disminución de la perfusión renal, a la precipitación de hemoglobina en túbulos renales o a la coagulación intravascular diseminada (CID) (de Roodt, *et al.*, 2002). Para algunos autores el factor determinante para que se produzca IRA y CID es la hemólisis intravascular (Zavaleta, 1987). Ésta puede atribuirse a la presencia de la esfingomielinasa y LPA (producto de la hidrólisis de LPC), ya que estimulan la entrada de calcio a los eritrocitos lo que promueve la exposición de fosfatidil serina en la membrana eritrocitaria, y da como resultado la pérdida de su asimetría y en consecuencia hemólisis mediada por complemento (van Meeteren, *et al.*, 2004). Los posibles mecanismos propuesto para la hemólisis intravascular y la insuficiencia renal aguda se ilustran en la Figura 8 (de Roodt, *et al.*, 2002).

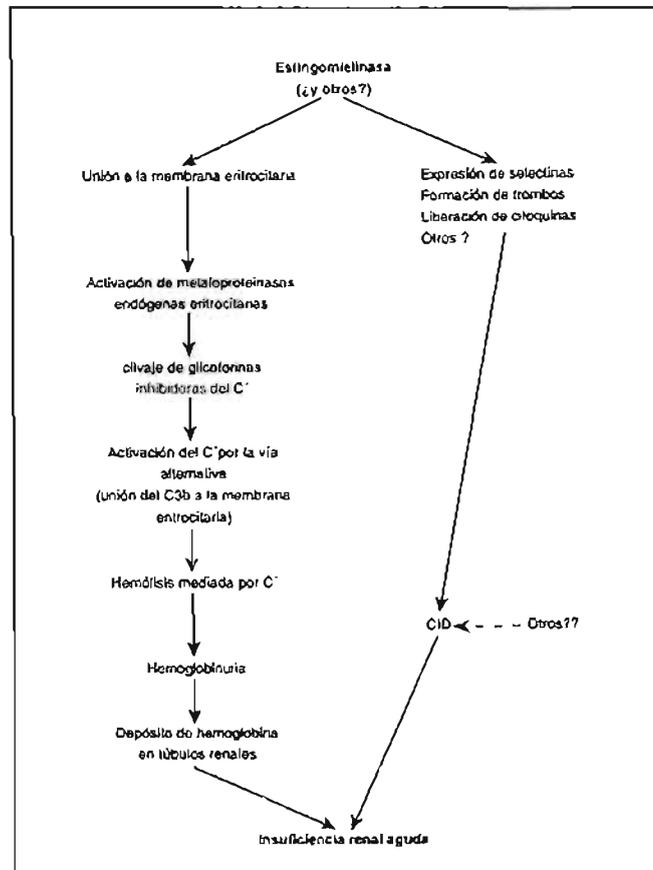


Figura 8. Posibles mecanismos de producción de loxoscelismo sistémico.

II.VI. Tratamiento del loxoscelismo.

Todavía no existe un criterio unánime para tratar el loxoscelismo, aunque para abordarlo se toman en cuenta varios factores, tales como:

- 📌 Etapa evolutiva (pre-necrótica, necrótica, ulcerosa)
- 📌 Forma clínica (cutánea o sistémica)
- 📌 Aparición de complicaciones (insuficiencia renal, sobreinfecciones).

El tratamiento para el envenamamiento por *Loxosceles* puede ser dividido en dos:

- a) El específico que se refiere al uso de antiveneno.
- b) El inespecífico en el cual se usan medicamentos con el fin de controlar la necrosis local y los daños sistémicos, si es que se presentan.

a) Tratamiento específico.

En Sudamérica se han usado dos tipos de antivenenos:

- Uno lo elabora el Instituto Butantán en Brasil, que se presenta en viales de 5 ml por frasco, capaz de neutralizar 75 dosis mínimas necrotizantes (DMN).
- El otro antiveneno se produce en el Instituto Nacional de Higiene de Perú. Éste viene en presentación de 5 mL y posee una capacidad neutralizante mayor (cuatro veces más al del antiveneno del Instituto Butantán). Sin embargo, el procesamiento del suero peruano es distinto al brasileño, es decir, son inmunoglobulinas completas, compuestas por dos regiones: la Fab unida al fragmento Fc. El fragmento Fc está relacionado directamente con la enfermedad del suero por lo que si este antiveneno se administra a un paciente es probable que provoque reacciones anafilácticas por lo que no es recomendable aplicarlo en forma endovenosa (de Roodt, *et al.*, 2002).

En cuanto a dosis y vía de administración todavía es controversial. En Brasil se afirma que el antiveneno se debe aplicar durante las primeras 36 horas posteriores al accidente. Esta indicación discrepa con la del antiveneno peruano, ya que éste se recomienda aplicarse dentro de las primeras 24 horas después de que sucedió el accidente. La dosis que se deberá aplicar dependerá del cuadro clínico. En lesiones locales se debe aplicar antiveneno suficiente para neutralizar 375 DMN administradas por vía intravenosa. En lesiones sistémicas la dosis deberá duplicarse (de Roodt, *et al.*, 2002).

b) Tratamiento inespecífico.

En nuestro país no se cuenta todavía con algún antiveneno, por lo que se ha recurrido a administrar distintos medicamentos para el tratamiento de loxoscelismo:

- b.1. Corticosteroides. Pueden disminuir la respuesta inflamatoria local y por ende el daño. Habitualmente se usa prednisona, vía oral, a razón de 0.5 a 1 mg/kg peso/día.
- b.2. Dapsona. Tiene un efecto modulador de la respuesta inflamatoria. Ésto ayuda a minimizar la lesión local. La dosis indicada es de 50-100 mg/día, durante 15 días.
- b.3. Antihistamínicos. No se han mostrado eficaces para el loxoscelismo.
- b.4. Diálisis. Indicada en casos de insuficiencia renal aguda. No es útil para la depuración plasmática del veneno, pues éste no dializará.
- b.5. Analgésicos (paracetamol).

b.6. Antibióticos para evitar infecciones.

b.7. Profilaxis antitetánica que ayuda en el manejo del paciente.

b.8. En los cuadros hemolíticos deben aplicarse medidas de control y soporte para prevenir la insuficiencia renal aguda y eventualmente transfusión para elevar el hematocrito (de Roodt, *et al.*, 2002).

II.VII. Especies de interés médico.

En el mundo se distribuyen alrededor de 100 especies del género *Loxosceles* (Platnick, 2000). De éstas, solamente algunas son de importancia sanitaria. En el Sur de E.U. destaca *L. reclusa*. En Sudamérica las especies que tienen mayor impacto son *L. gaucho* y *L. intermedia*, nativas de Brasil y *L. laeta* nativa de Chile (Kalapothakis, *et al.*, 2002).

Los casos más antiguos de loxoscelismo se registraron en Chile en el año de 1937 y éste fenómeno fue llamado "La Mancha Gangrenosa de Chile" (Zavaleta, 1987).

En resumen, las especies de *Loxosceles* que han tenido mayor impacto a través del tiempo son: *L. reclusa* (E.U.), *L. gaucho* (Brasil), *L. intermedia* (Brasil) y *L. laeta* (Chile, Argentina y Perú) (de Roodt, *et al.*, 2002). Ésto puede ser debido a que estas especies viven cerca de las viviendas y por tanto tienen mayor contacto con los humanos, aumentando la probabilidad de que se suscite algún accidente por mordedura de *Loxosceles*. El registro de intoxicaciones por araña que se tiene del año 2000, para el caso de México, y 2002 para E. U. y Brasil, se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Intoxicaciones por arañas en: México (2000), E. U. (2002) y Brasil (2002).

País	Especie	No. de casos	No. de pacientes recuperados	Muertes
*México	Araña	3,545	-	0
**E.U.	Araña reclusa	2,944	2,438	0
***Brasil	Araña	3,453	1,916	0

Fuente: * Boletín Epidemiológico del IMSS, 2002.

** 2002 Annual Report of the American Association of Poison Control Centers Toxic Exposure Surveillance System.

*** Sistema Nacional de Informacoes Tóxico-Farmacológicas-SINITOX, 2002.

III. ANTECEDENTES. APROXIMACIÓN TEÓRICA.

III.I. *L. intermedia*.

III.I.I. Bioquímica del veneno.

Como se mencionó anteriormente, Tambourgi y colaboradores en 1998 separaron al veneno de *L. intermedia* en tres fracciones principales, las cuales llamaron P1, P2 y P3 (Tambourgi, *et al.*, 1998). Éstas presentaron un peso molecular de 35 kDa aproximadamente. Los puntos isoeléctricos de P1 y P2 fueron 8.9 y 8.3 respectivamente, y aunque no pudo ser determinado el de P3 se presume que está por arriba de 9. De éstas tres fracciones, solamente P1 y P2 presentaron actividad de esfingomielinasa D. El amino terminal de las fracciones se secuenció; la comparación de estas secuencias mostró un alto grado de similitud entre P1 y P2, pero no con P3 (Tabla 2). En este trabajo (Tambourgi, *et al.*, 1998) se habla de una cuarta isoforma, sin embargo, ésta no fue bien caracterizada, por lo que no se hablará de ella en adelante.

Tabla 2. Porcentaje de identidad entre las isoformas reportadas de *L. intermedia* (Tambourgi, *et al.*, 1998).

Isoformas	P1	P2	P3
P1	100	-	-
P2	89	100	-
P3	52	58	100

III.I.II. Clonación y secuenciación del gen de la esfingomielinasa.

Se clonó, secuenció y expresó un gen que codifica para una de las esfingomielinasas de *L. intermedia* (Kalaphotakis, *et al.*, 2002). La clonación se hizo a partir de una librería de ADNc usando ARNm aislado de las glándulas venenosas. Las clonas se seleccionaron por tamizaje usando un ELISA tipo sandwich, es decir, se sensibilizaron las placas de ELISA con F(ab')₂ específicos anti-*L. intermedia* los cuales se pusieron a reaccionar con el sobrenadante producto de la sonicación y centrifugación de las distintas clonas. Finalmente se mezcló un segundo F(ab')₂ específicos acoplados a peroxidasa anti-*L. intermedia*. El resultado mostró que 50 clonas presentaron altos

niveles de inmoreactividad. La clona que mostró la señal más alta fue la que se caracterizó. El ADN de ésta se secuenció obteniendo un fragmento de 1127 pb, que codifica para una proteína madura de 31.25 kDa a la que se llamó LiD1. El ADNc de LiD1 tiene un propéptido conformado por 10 residuos y un péptido señal incompleto compuesto por 12 aminoácidos, con un sitio de escisión para una peptidasa señal. No se encontró ninguna metionina como inicio de la traducción de la proteína madura.

Esta toxina se clonó en pBK-CMV como proteína de fusión con la β -galactosidasa. El peso molecular esperado fue de 37.39 kDa, incluyendo el fragmento fusionado, los 12 residuos del péptido señal incompleto, los 10 residuos del propéptido y los 280 aminoácidos de la proteína. Ésta se expresó en un sistema bacteriano (XLORL) y se purificó por una columna de Sephacryl-S-200. Las fracciones obtenidas, se analizaron por ELISA. Las positivas, se repurificaron por afinidad mediante inmunoglobulinas G anti-*L. intermedia*. La cantidad de proteína soluble obtenida por litro de cultivo fue de 3 mg, y no presentó actividad enzimática. Se inmunizaron conejos con la proteína recombinante, pero no fue tan inmunogénica como el veneno nativo. Sin embargo, los anticuerpos producidos reconocieron al veneno de *L. intermedia* (Kalaphotakis, *et al.*, 2002).

III.II. *L. boneti*.

III.II.I. Caracterización bioquímica e inmunológica del veneno.

Un caso similar al de *L. intermedia* se presenta con *L. boneti*. Durante mi tesis de licenciatura, caractericé el veneno de esta especie, y encontré tres isoformas de esfingomielinasa, con un peso molecular alrededor de 32.5 kDa. Al igual que *L. intermedia*, sólo dos de las isoformas (Lb1 y Lb2) presentes en el veneno de *L. boneti* son activas, sin ser así la tercera (Lb3).

Las tres isoformas se secuenciaron, obteniéndose alrededor de 30 aminoácidos del extremo amino terminal de cada una de ellas. La comparación de secuencias mostró que Lb1 y Lb2 son muy parecidas entre sí, mientras que Lb3 presenta la mayor diferencia con respecto a las anteriores (Tabla 3). También se hicieron comparaciones entre las isoformas de *L. boneti* con otras secuencias parciales de *L. deserta* y *L. reclusa* que ya se habían reportado (Gomez, *et al.*, 2001) encontrando que el extremo amino terminal está muy conservado (88.6%)

Tabla 3. Porcentaje de identidades entre las isoformas de *L. boneti* (Ramos, 2002).

Isoformas	Lb1	Lb2	Lb3
Lb1	100	-	-
Lb2	94	100	-
Lb3	36	40	100

Por otro lado, se obtuvieron anticuerpos policlonales en conejo contra los venenos de *L. boneti* y *L. reclusa* con títulos alrededor de 20,000. Los análisis por Western-blot mostraron que estos antisueros fueron capaces de reconocer a las necrotoxinas homólogas y además presentaron un alto grado de reconocimiento heterólogo, ya que el antisuero anti-*L. boneti* reconoce a la necrotoxina de *L. reclusa* y viceversa. Adicionalmente, también se mostraron reacciones cruzadas a con el antisuero anti-*L. laeta* (Argentina).

En este trabajo se confirmó, que en el veneno de *L. boneti* existen por lo menos dos proteínas que causan dermonecrosis. Esto se comprobó en piel de conejo aplicando distintas cantidades de cada una de las isoformas, y se encontró que las primeras dos son capaces de producir necrosis, a diferencia de la tercera; esto coincidió con lo hallado a nivel de secuencia aminoacídica ya que la Lb3 es la más divergente.

Las conclusiones de este trabajo resultaron ser muy importantes para el desarrollo de esta tesis, ya que la información generada fue esencial para poder obtener un antiveneno que neutralice el mayor número de venenos de las distintas especies del género *Loxosceles*.

III.II.II. Clonación y secuenciación de los genes de las esfingomielinasas de *L. boneti* y *L. reclusa*.

En el laboratorio del Dr. Alagón; Alejandro Olvera, clonó y secuenció parcialmente los genes que codifican para las esfingomielinasas D tanto de *L. boneti* como de *L. reclusa*, amplificando ADNc a partir de ARNm de glándulas venenosas.

Para seleccionar Ael ADNc codificante de las esfingomielinasas, se diseñaron oligonucleótidos degenerados, a partir de las secuencias parciales (primeros 33 aminoácidos) de las isoformas de *L. boneti* que obtuve anteriormente (Ramos, 2002), así como las secuencias parciales amino terminales de *L. reclusa*, *L. deserta*, *L. laeta*,

L. gaucho y *L. intermedia* que ya se habían reportado (Barbaro, *et al.*, 1996^a; Gomez, *et al.*, 2001; Ramos, 2002). Los oligonucleótidos utilizados se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Diseño de oligonucleótidos para clonar las esfingomielinasas de *L. boneti* y *L. reclusa* (Ramos-Cerrillo, *et al.*, 2004).

Nombre	Secuencia	Degeneración
LbD-1	CCI GCI TGG ATH ATG GG	3
LbD-3	MGI CCI AAR CCI ATH TGG	12

El diseño de LbD-1 se hizo en base a las isoformas I y II encontradas en la fracción necrotóxica de *L. boneti*, ya que éstas dos son idénticas al menos en los primeros 9 residuos amino terminales. Lo mismo sucedió para el caso de *L. reclusa*, ya que su secuencia también es idéntica al amino terminal de las dos isoformas de *L. boneti*. Por tanto ese oligonucleótido se usó para amplificar el ADNc codificante de las esfingomielinasas de ambas especies.

Por otro lado, ya se sabía que la tercera isoforma de la fracción necrotóxica de *L. boneti*, en cuanto a identidad, era la más distinta por lo que se procedió a diseñar el oligonucleótido degenerado LbD-3 para clonar esta isoforma (Tabla 3). Una vez obtenidos los ADNc se amplificaron y se clonaron en el vector pCR2.1-TOPO.

Se aisló plásmido de varias clonas y se analizó por secuencia, encontrando que para el caso de *L. boneti*, dos clonas distintas mostraban 100% de identidad con las secuencias parciales amino terminales correspondientes a la isoforma 1 y 3. A estas secuencias se les dio el nombre de Lb1 y Lb3 respectivamente. El tamaño del fragmento para la Lb1 fue de 828 pb y de 819 pb para la Lb3; estos codifican para 276 y 273 residuos respectivamente. No se encontró alguna clona que tuviera la secuencia la isoforma 2 de *L. boneti*.

En el caso de *L. reclusa* se obtuvieron dos secuencias distintas, las cuales fueron llamadas isoforma 1 (Lr1) y 2 (Lr2), en base al porcentaje de identidad que guardaban con respecto a la isoforma 1 de *L. boneti*. Ambos insertos (Lr1 y Lr2) mostraron un tamaño de 828 pb codificantes para 276 aminoácidos.

Cabe mencionar que todas las secuencias obtenidas tanto de *L. boneti* como de *L. reclusa* fueron parciales, es decir, les hacían falta los primeros cuatro aminoácidos

N-terminales. El porcentaje de identidad entre Lb1 y Lb3 fue del 45% y en cuanto a las dos isoformas de *L. reclusa* fue del 90%.

III.III. *L. laeta*.

III.III.I. Clonación y secuenciación de los genes de las esfingomielinasas.

Los genes que codifican para las esfingomielinasas D de *L. laeta* se clonaron y se secuenciaron a partir de una librería de ADNc de las glándulas venenosas (Fernades Pedrosa, *et al.*, 2002).

Se analizaron varias clonas a nivel de secuencia. Tres de ellas (H17, H13 y H10) fueron muy similares a las secuencias parciales amino terminal de *L. intermedia* que ya se habían reportado (Tambourgi, *et al.*, 1998). Entre ellas, H13 mostró una del identidad 81% con respecto a H17, mientras que la identidad entre H10 con respecto a las dos anteriores, resultó ser significativa pero mucho más baja (40%).

H17 mostró la mayor identidad con las secuencias amino terminales de *Loxosceles* reportadas anteriormente, por lo que se seleccionó para la producción de la proteína recombinante. La secuencia H17 mostró un marco de lectura abierta de 311 aminoácidos, con un sitio de inicio de la transcripción en la posición 12 y un codón de paro en la posición 944. Esta secuencia tiene un péptido señal de 26 aminoácidos.

El ADNc codificante de la proteína madura se amplificó por PCR y se clonó bajo el promotor T7 del plásmido pAE. La construcción final pAE-*L. laeta* tiene una etiqueta de seis histidinas en el extremo amino terminal y cuatro aminoácidos adicionales (LEGS) seguida por la esfingomielinasa. La construcción se transformó en células de *E. coli* BL21 (DE3) para su expresión. Los extractos celulares de las colonias se analizaron por SDS-PAGE y se demostró que una de ellas producía una proteína de 33 kDa. Para sobreexpresar a ésta, indujeron con 1 mM IPTG, purificándola posteriormente por cromatografía de afinidad, y se obtuvo 17.4 mg de necrotoxina recombinante de *L. laeta* por litro de cultivo. La proteína recombinante se caracterizó y sus propiedades biológicas fueron analizadas y comparadas con las de la proteína nativa. Se encontró que al igual que la proteína nativa, la recombinante es capaz de hidrolizar esfingomielina, es necrosante (conejo) y que su actividad hemolítica es dependiente de complemento.

IV. JUSTIFICACIÓN.

En el año 2002, el IMSS reportó 3545 casos de intoxicaciones por mordedura de araña, y aunque no se cuenta con un registro de las especies causantes de las intoxicaciones se cree, por la sintomatología que presentaron los pacientes, que un porcentaje elevado fueron ocasionadas por arañas violinistas.

Pese a que en nuestro país se distribuyen 39 especies del género *Loxosceles* todavía no se cuenta con un antiveneno comercial contra los efectos de la mordedura de esta araña. Por lo que, los resultados obtenidos en esta tesis contribuirán a generar proteínas recombinantes que se usen como antígenos para la producción de un antiveneno que neutralice el efecto del veneno del mayor número de especies *Loxosceles*.

Finalmente, la expresión de estas proteínas contribuirá a la producción de material suficiente y a bajo costo para poder realizar estudios conducentes al logro de un mejor entendimiento de los mecanismos bioquímicos y fisiopatológicos, por los cuales se desarrolla el loxoscelismo.

V. OBJETIVOS.

📌 Objetivo general.

Producir, evaluar y caracterizar toxinas recombinantes de las esfingomielinasas D de *L. boneti*, *L. reclusa* y *L. laeta* (Perú) para su posible uso como inmunógenos para la producción de un antiveneno polivalente.

📌 Objetivos particulares.

- Generar inmunógenos recombinantes activos de las esfingomielinasas D de las tres especies de *Loxosceles*.
- Encontrar las condiciones óptimas para la expresión y purificación de las proteínas recombinantes.

- Evaluar las actividades enzimáticas de las toxinas recombinantes.
- Evaluar las capacidades inmunogénicas de las toxinas recombinantes.
- Evaluar las capacidades neutralizantes de los sueros hiperinmunes (inmunidad pasiva), producidos a partir de las proteínas recombinantes.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS.

En el diagrama de flujo que a continuación se ilustra, refleja la estrategia usada a lo largo de este trabajo.

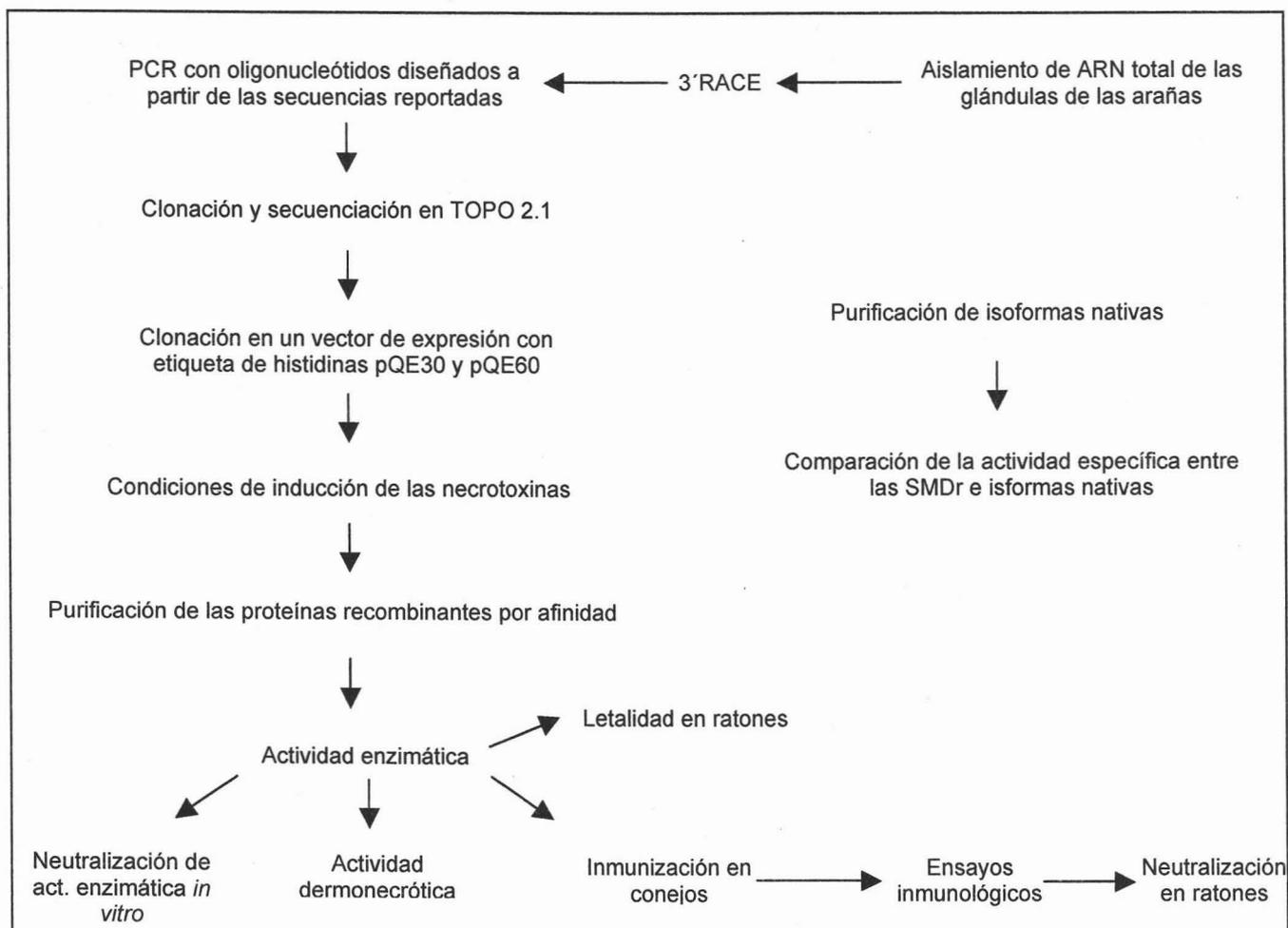


Figura 9. Estrategia experimental seguida a lo largo de todo este trabajo.

- Evaluar las actividades enzimáticas de las toxinas recombinantes.
- Evaluar las capacidades inmunogénicas de las toxinas recombinantes.
- Evaluar las capacidades neutralizantes de los sueros hiperinmunes (inmunidad pasiva), producidos a partir de las proteínas recombinantes.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS.

En el diagrama de flujo que a continuación se ilustra, refleja la estrategia usada a lo largo de este trabajo.

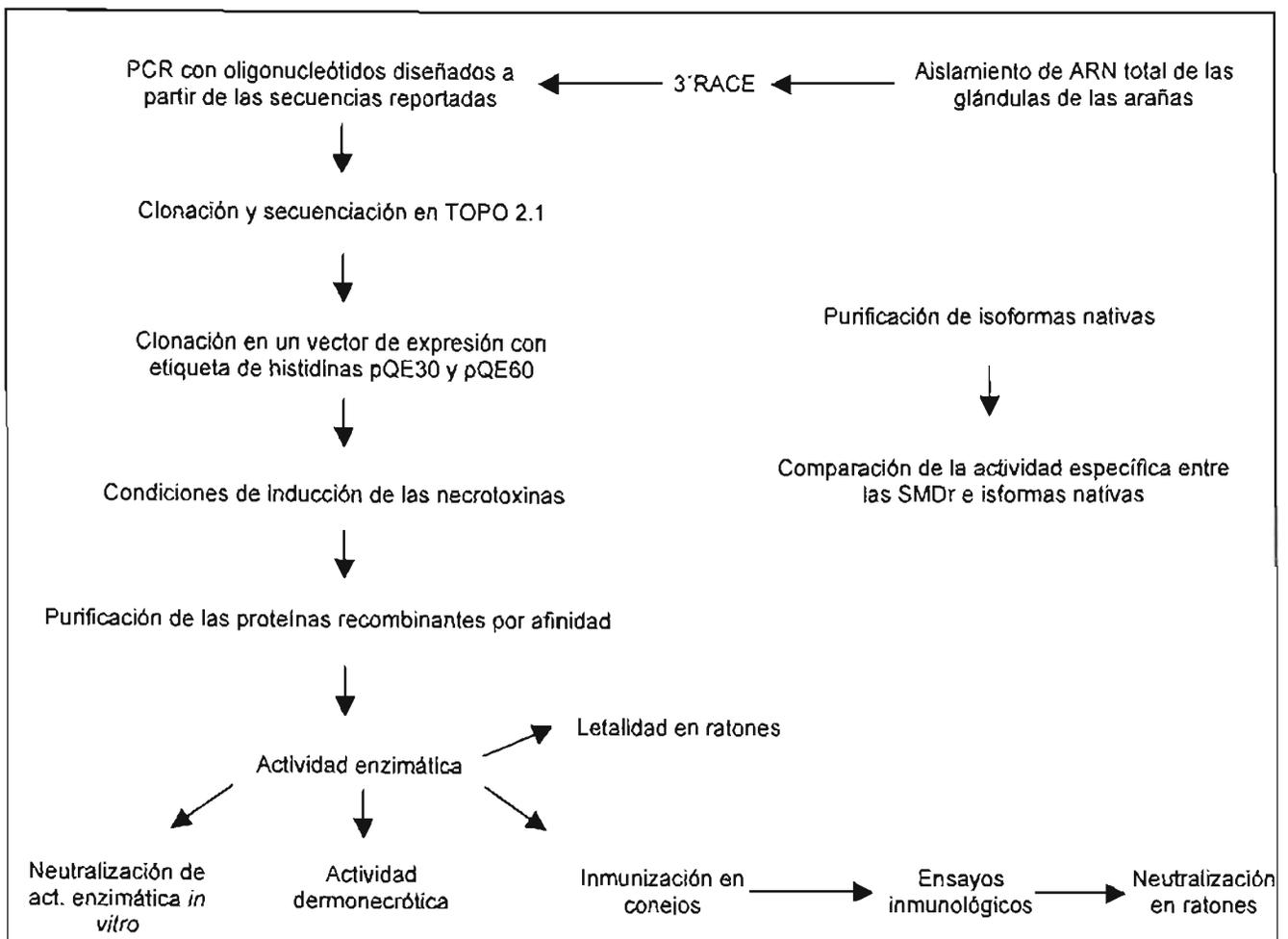


Figura 9. Estrategia experimental seguida a lo largo de todo este trabajo.

VI.I. Materiales.

VI.I.I. Especímenes vivos.

a) Arañas.

a.1 *L. boneti*. Se colectaron en las Comunidades de La Capilla y Corral de Toros, Municipio de Iguala, en la parte centro del estado de Guerrero. Para confirmar que eran *L. boneti* se mandaron 10 hembras y 10 machos al Museo de Historia Natural de New York con el Dr. Norman Platnick, quién las identificó como tales.

a.2 *L. reclusa*. Se colectaron en Stillwater, Oklahoma por los Dres. G. Odell y A. Alagón y el Biól. Cipriano Balderas.

a.3 *L. laeta*. Se colectaron en Lima, Perú por el Dr. Alfonso Zavaleta y la Dra. Maria Salas del Laboratorio de Farmacología, Universidad Peruana "Cayetano Heredia", Lima, Perú.

b) Conejos.

Se usaron conejos de la cepa New Zeland White, proporcionados por el Bioterio del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

c) Ratones.

Se utilizaron ratones de la cepa balb-c entre 18-20 g de peso, comprados a la compañía Harlan.

VI.I.II Reactivos.

Los reactivos de uso general fueron de las casas: SIGMA, Bio-Rad, Merck, Baker, Qiagen, Rockland, Invitrogen, Gibco-BRL, Zymed, Boehringer-Mannheim y Molecular Probes.

VI.I.III. Filtración en gel.

Las moléculas de interés pesan alrededor de 32 kDa, por lo que la matriz seleccionada para empacar la columna fue Sephadex G-75 (Sigma Chemical Co.) debido a que su límite de exclusión es de 70 kDa.

VI.I.IV. FPLC.

La columna que se utilizó para llevar a cabo la cromatografía de intercambio iónico fue del tipo Mono S HR 5/5 (Pharmacia LKB Biotech), la cual es un intercambiador catiónico muy fuerte, basado en resinas hidrofílicas. Las dimensiones de la columna fueron las siguientes: 5 cm de altura X 0.5 cm de diámetro. El tamaño de las partículas de la resina fue de 10 μm . Los grupos cargados son metil sulfonatos. La capacidad de pegado de proteínas de esta columna esta en el rango de 20-50 mg/ml.

VI.I.V. Oligonucleótidos.

Todos los oligonucleótidos usados en este trabajo los sintetizó la casa comercial SIGMA.

VI.I.VI. Enzimas.

Las enzimas de restricción utilizadas se adquirieron en la casa New England, Bio-Labs. La Taq polimerasa y la enterocinasa en Boehringer-Mannheim. Tanto la T4 DNA ligasa como la fosfatasa alcalina fueron de Roche.

VI.I.VII. Vectores.

El vector de secuenciación que se usó en este trabajo fue el pCR2.1-TOPO de Invitrogen. Éste posee un tamaño de 3.9 kb y tiene la particularidad de estar linearizado por la acción de la topoisomerasa dejando una T sobresaliente en el lado 5' de ambas cadenas.

El primer vector de expresión que se usó fue el pTcrHis-Topo®TA de Invitrogen, mismo tiene un tamaño original de 4.39 kb, un promotor de *trc* y un gen de resistencia a la ampicilina. El vector adiciona una etiqueta de seis

histidinas en el lado amino terminal de la proteína expresada para su recuperación y 29 residuos más que incluye un sitio de corte a enterocinasa.

Posteriormente los vectores de expresión que se utilizaron fueron: pQE30 y pQE60 de Qiagen, que permiten la expresión de proteínas recombinantes y presentan las siguientes características: un tamaño de 3.4 kb, un promotor del colifago T5 (P_{N25}) fusionado al operador *lac* (P_{N25}/O). La transcripción de este promotor puede ser controlada por el represor *lac* (producto de *lac I*) (Bujard, *et al.*, 1987).

La proteína recombinante se expresa con cuatro aminoácidos adicionales y una etiqueta de 6 histidinas (6His-tag) ya sea en el N-terminal (pQE30) o C-terminal (pQE60).

VI.I.VIII. Kits.

Para purificar los fragmentos de ADN obtenidos en la amplificación por PCR, se separaron por electroforesis en agarosa, se usaron tanto el kit: Qiaquick Gel Extraction (Qiagen), como el High Pure PCR product purification kit (Roche).

Para la obtención de plásmido a pequeña escala se usaron los siguientes kits: Plasmid Miniprep kit (Bio-Rad) y Qiaprep Spin Miniprep kit (Qiagen). El último ofrece una alto grado de pureza por lo que se usó para la secuenciación.

VI.I.IX. Células competentes.

Se utilizaron dos cepas de *E. coli* en el transcurso de esta tesis. Para clonar las construcciones se usó la cepa XL1-blue (Stratagene), y para su expresión se subclonaron en la cepa BL21 DE3. Las bacterias competentes se prepararon de acuerdo a protocolos estandarizados del laboratorio (Sambrook, *et al.*, 1989).

VI.I.X. Adyuvantes.

El término adyuvante procede del latín *adjuvare* que quiere decir ayudar. Un adyuvante es una sustancia que estimula inespecíficamente la respuesta

inmunitaria frente a un antígeno. Una de sus funciones primordiales es crear un reservorio o depósito de antígeno que perdure el tiempo suficiente para estimular la respuesta inmune, ya que un antígeno libre normalmente difunde con mucha rapidez hacia los tejidos locales que rodean el sitio de la inoculación. Los adyuvantes activan a los macrófagos promoviendo la respuesta inmune por un incremento en la presentación del antígeno a los linfocitos. Por otro lado los macrófagos también liberan factores solubles que potencian la proliferación de linfocitos.

El adyuvante de laboratorio que mejor se conoce, y que se ha utilizado por más de 50 años en la producción de antisueros en animales, es el adyuvante de Freund del cual existen dos versiones:

- El completo (CFA).
- El incompleto (IFA).

Ambos son aceite mineral, sin embargo el primero va acompañado de células inactivadas de *Mycobacterium tuberculosis* (Morris *et al.*, 1999).

En este trabajo se usaron ambos adyuvantes (Rockland); la primera inmunización fue con CFA y las subsecuentes con IFA. Se usaron formando una emulsión compuesta por adyuvante y solución antigénica acuosa en proporción 1:1.

VI.II. Metodología.

VI.II.I. Obtención del veneno.

Las glándulas venenosas de las arañas se extrajeron mecánicamente, jalando los quelíceros con unas pinzas para desprender el par de glándulas. Cincuenta aparatos venenosos se colocaron en 1 ml de acetato de amonio 20 mM pH 4.7 y se maceraron con un homogenizador de teflón. El macerado se centrifugó por dos minutos a 14,000 rpm, con el fin de quitar residuos sólidos y restos celulares. Los sobrenadantes (extractos de glándulas) se almacenaron a -70°C hasta su uso.

VI.II.II. Cromatografía en gel.

Con el fin de obtener distintas fracciones del veneno de *L. boneti* y *L. reclusa* se llevaron a cabo separaciones por cromatografía en gel, la cual resuelve a las proteínas en función de su tamaño. La columna que se usó mide 170 cm de largo por 1.4 cm de diámetro. El buffer de corrida fue acetato de amonio 20 mM a pH 4.7. La velocidad de flujo fue de 50 ml/h.

A la columna se le aplicaron 36 mg ($1U_{A_{280nm}}=1\text{mg/ml}$) de veneno de *L. boneti*, en 2 ml. Se colectaron 90 fracciones de 5 ml. Para el caso de *L. reclusa* se aplicaron 29 mg de veneno en 4 ml. Se colectaron 90 fracciones de 4.5 ml.

Las muestras de ambas corridas se leyeron en un espectrofotómetro (Beckman Du650I) a dos longitudes de onda: 260 y 280 nm.

VI.II.III. Cromatografía de intercambio iónico (FPLC).

La cromatografía de intercambio iónico o de alta resolución se realiza sobre una matriz de material insoluble que posee grupos cargados y iones móviles de carga contraria. Éstos últimos pueden ser intercambiados reversiblemente por otros iones móviles con la misma carga.

Una vez que se obtuvo la fracción necrotóxica de los venenos por filtración en gel, se procedió a purificar sus isoformas, para comparar posteriormente las actividades enzimáticas de éstas con las proteínas recombinantes obtenidas.

Los buffers utilizados fueron los siguientes:

- ☛ Fase móvil: acetato de amonio 20 mM pH 4.7
- ☛ Buffer de elución: acetato de amonio 20 mM pH 4.7 + 2M cloruro de sodio.

La separación se hizo en una columna Mono S 5/5. Una vez que la columna estaba equilibrada se procedió a inyectar la muestra, previamente centrifugada durante dos minutos a 14,000 rpm con el fin de quitar precipitados. El buffer en

el que estaban las muestras fue acetato de amonio 20 mM pH 4.7. La muestra de *L. boneti* contenía 520 µg en 7 mL, en tanto que la de *L. reclusa* 427 µg en 4 mL. En este caso la proteína se cuantificó con el kit de BCA (Pierce).

Las isoformas se separaron con un gradiente lineal de 0 a 0.6M de NaCl (1ml/min), en buffer acetato de amonio 20mM pH 4.7. La columna se regeneró lavando con 2M NaCl y reequilibrada en el buffer inicial.

VI.II.IV. Extracción de ARN total de las glándulas venenosas de araña por el método de Piotr Chomczynski y Nicoleta Sacchi, 1987.

Soluciones:

- a) Sarcosil al 10%
- b) Citrato de sodio 0.75M pH 7.0
- c) Acetato de sodio 2M pH 4.1
- d) Dodecil sulfato de sodio 10%
- e) 2-mercaptoetanol
- f) Solución stock (4M tiocianato de guanidinio, 25 mM citrato de sodio a pH 7, 0.5% sarcosil). 250 gr de tiocianato de guanidinio + 17.6 ml citrato de sodio (0.75M pH 7.0) + 26.4 ml de sarcosil al 10% a 65°C. Llevar a 500 ml con agua/DPC al 0.1%)
- g) Solución D (4M tiocianato de guanidinio, 25 mM citrato de sodio a pH 7, 0.5% sarcosil + 101.6 mM 2-mercaptoetanol). Agregar 0.36 ml de 2-mercaptoetanol a 50 ml de la solución stock.

Procedimiento:

- a) Se colocó 1 ml de solución D en un homogenizador de teflón, previamente tratado con 1M hidróxido de sodio durante 1 hora y se lavó con agua DPC. Se usaron 25 glándulas venenosas de *Loxosceles* para la extracción. Es importante mencionar que el homogenizado se mantuvo en hielo durante todo este proceso.

- b) Se centrifugó 2 minutos a 14,000 rpm. Se extrajo el sobrenadante y se le agregó 0.1 ml de acetato de sodio 2M pH 4.1 + 1 ml de fenol ácido saturado en agua + 0.2 ml de una mezcla (49:1) de cloformo:isopropanol. Se agitó durante 10 segundos en un vórtex y se mantuvo en hielo durante 15 minutos.
- c) Se centrifugó a 10,000 rpm durante 20 minutos a 4°C. Se dejó durante una hora a -20°C para precipitar al ARN.
- d) Nuevamente se centrifugó a 10,000 rpm durante 30 minutos a 4°C, se tiró el sobrenadante y la pastilla se disolvió en 0.3 ml de solución D. Posteriormente se precipitó con 0.3 ml de isopropanol, manteniéndose a -20°C durante una hora.
- e) Pasado el tiempo se centrifugó a 14,000 rpm por diez minutos a 4°C y la pastilla se lavó con 1 ml de etanol frío al 75% y se secó por 15 minutos a 37°C.
- f) Finalmente se solubilizó en agua/DPC y se almacenó a -70°C hasta su uso.

VI.II.V. 3' RACE - (Rapid amplification of cDNA Ends; Gibco-BRL).

Es una estrategia molecular que permite el aislamiento tanto del extremo 5' (5'RACE) como del 3' (3'RACE) de un ARN mensajero cuya secuencia es parcial o totalmente desconocida, pero que codifica para una proteína con dominios conservados (Forman, *et al.*, 1998). Esta técnica combina la síntesis del ADNc de interés con su amplificación por PCR.

Para el caso del 3' RACE el ADNc se sintetiza, de manera general, utilizando un oligonucleótido poli-dT, mismo que se utiliza para la reacción de PCR (oligonucleótido anti-sentido). Generalmente, el oligonucleótido sentido es degenerado y diseñado en base a la secuencia de dominios conservados o, de ser el caso, en la secuencia peptídica conocida.

Mientras que en el 5' RACE, se le agrega una secuencia mononucleotídica (poli-dG) al extremo 5' del ADNc con apoyo de la enzima polinucleótido transferasa terminal (TdT). La amplificación se da hacia el extremo 5' del ADNc, y la especificidad de dicha amplificación la confiere el oligonucleótido anti-

sentido específico o degenerado, según la información disponible.

El ARN que se tenía de las glándulas venenosas de las tres especies *Loxosceles* era total, para seleccionar el ARNm se usó el oligonucleótido poli-dT y mediante la reverso transcriptasa se obtuvo el ADNc. Para eliminar el ARNm de las cadenas heterodúplex ARNm:ADNc se adicionó RNAsa H la cual degrada específicamente el ARNm de estas cadenas, obteniéndose únicamente el ADNc.

Se tenían las secuencias parciales de las isoformas 1 de *L. boneti* y *L. reclusa*. Como se mencionó anteriormente les hacían falta los primeros cuatro aminoácidos del amino terminal, por lo que se procedió a hacer un oligonucleótido específico: 5'Lb1-completo (Tabla 5), para tener las secuencias completas de ambas especies.

Los otros dos oligonucleótidos: 3'NCTx I y II se diseñaron de tal manera que en los extremos 3' agregaran un sitio *Sal* I y un sitio *Bgl* II, con la finalidad de clonarlos en los vectores de expresión pQE30 y pQE60 respectivamente.

Tabla 5. Diseño de los oligonucleótidos para obtener la secuencia completa de los genes de las isoformas de las esfingomielinasas de *L. boneti* 1 y *L. reclusa* 1.

Nombre	Secuencia (5'- 3')	Posición y sitios de restricción
5'Lb1-completo	AAA GGA TCC GCG AAC AAA CGC CCG GCG TGG ATC ATG	5' <i>Bam</i> H I
3'NCTx I	GGGG GTC GAC TTA ATT CTT GAA TGT TTC	3' <i>Sal</i> I
3'NCTx II	GGGG AGA TCT ATT CTT GAA TGT TTC CCA	3' <i>Bgl</i> II

Tanto *L. boneti* como *L. reclusa* son idénticas en los residuos amino y carboxilo terminales por lo que estos oligonucleótidos son útiles para obtener las secuencias completas de ambas especies. Las secuencias van del 5' al 3' y los sitios de restricción están en negritas.

Por otro lado el ADNc de *L. laeta*, se amplificó usando oligonucleótidos específicos (LI-1, LI-2, LI-3) (Tabla 6) para obtener el ADN de doble cadena.

Con el programa Oligo 4.03 (National Biosciences, Inc.) fueron diseñados estos oligonucleótidos en base a la secuencia de *L. laeta* H17 (Brasil), que ya se conocía.

Tabla 6. Diseño de oligonucleótidos para amplificar el ADNc de las esfingomielinasas de *L. laeta* (Perú)

Nombre	Secuencia (5'- 3')	Posición y sitios de restricción
5'LI-1	AAA GGA TCC GCT GAT AAC CGT CGT CC	5' <i>Bam</i> H I
3'LI-2	GGGG GTC GAC CTA ATT TTT AAA AGT CTC CCA	3' <i>Sal</i> I
3'LI-3	GGGG AGA TCT ATT TTT AAA AGT CTC CCA TG	3' <i>Bgl</i> II

El modelado de todas las construcciones se hicieron con el programa Gene Construction kit® 1.03.1 (Textco Inc.). Las secuencias van del 5' al 3' y los sitios de restricción están en negritas.

El ADN de doble cadena obtenido a partir del ADNc, se separó electroforéticamente en geles de agarosa, se cortaron bloques que contenían al ADN correspondiente al peso esperado (\approx 800 pb), y se purificaron por Qiaquick Gel Extraction kit.

Cabe señalar que la Taq DNA polimerasa usada durante la amplificación, tiene la peculiaridad de adicionar una deoxiadenosina en los extremos 3' en ambas cadenas del ADN, lo cual es de gran utilidad para el siguiente paso que fue la clonación.

VI.II.VI. Clonación y secuenciación de los genes de las esfingomielinasas D de *Loxosceles*.

El fragmento amplificado de ADN (\approx 800 pb) se clonó en el vector de secuenciación pCR2.1-TOPO (Invitrogen) de acuerdo a instrucciones del proveedor. La ventaja de esta clonación es que se da en pocos pasos evitando la defosforilación del vector y posteriormente la ligación. Como se mencionó

anteriormente, pCR2.1-TOPO tiene una T sobresaliente en los extremos 5' la cual hibrida con la A de los extremos 3' del producto de PCR. La transformación se llevo a cabo en *E. coli* XL1-blue y se purificó plásmido de las clonas por Qiaprep Spin Miniprep kit (Qiagen) de acuerdo a instrucciones del proveedor. Obtenido el plásmido se analizó por reestricción y su inserto se secuenció por el método de dideoxinucleótidos terminadores de la síntesis de cadena (Sanger, *et al.*, 1977), en la Unidad de Secuenciación del Instituto de Biotecnología, UNAM. La secuencia que se obtuvo se comparó *in silico* con las secuencias incompletas que se habían obtenido anteriormente.

VI.II.VII. Análisis de las secuencias y alineamientos.

Las secuencias nucleotídicas se analizaron con el paquete GeneWorks® 2.5.1 (Intelligenetics, Inc.). Para la traducción de las secuencias se usó el programa *translate* y para alinear las secuencias se usó el programa *Protein Alignment* del mismo paquete. Las secuencias de *L. laeta* (de Brasil: H17, H13 y H10) se obtuvieron de NCBI web server (Genbank Accesion numbers AAM211154, AAM211155, y AAM211156, respectivamente). Igualmente, las de *L. arizonica*, *L. intermedia* (LiD1, LiP1 y LiP2) se extrajeron de la misma fuente (Genbank Accesion numbers Q7Z1Y7, P83045, AAP97091 y AAP97092, respectivamente). Las secuencias de *L. boneti* (Lb1 y Lb3) y *L. reclusa* (Lr1 y Lr2) se obtuvieron en el laboratorio y recientemente se publicaron (Ramos-Cerrillo, *et al.*, 2004) (Genbank Accesion numbers AAT66073, AAT66074, AAT66075 y AAT66076, respectivamente) Las identidades se calcularon por el programa GeneWorks® 2.5.1 (Intelligenetics, Inc.).

VI.II.VIII. Electroforesis.

a) ADN.

Los geles usados para el análisis de ADN fueron de agarosa al 1 % con 0.5 g/ml de bromuro de etidio (EtBr). El equipo usado fue Mini-Sub® Cell GT (Bio-Rad). Las separaciones electroforéticas se llevaron a cabo en TAE 1X a 100 volts. El buffer de carga para cada

muestra fue loading buffer (1 μ l/10 μ l de muestra). Los marcadores de peso molecular fueron λ Hind III de Bio-labs.

b) Proteínas (SDS-PAGE).

SDS-PAGE es un método para separar proteínas dependiendo de su tamaño y de la carga eléctrica negativa dada por el SDS cuando se colocan en un campo eléctrico (Laemmli, 1970).

El equipo utilizado para éste método fue el Mini-Protean III (Bio-Rad).

La separación de proteínas se realizó en geles de poliacrilamida al 12.5% en condiciones reductoras (2-mercaptoetanol a una concentración final de 2.5%). Los marcadores de peso molecular fueron de Biolabs, Inc. Para cada muestra sometida a electroforesis se utilizaron distintas concentraciones. Todas las muestras, incluyendo al marcador de peso molecular, se desnaturalizaron en agua hirviendo durante 5 minutos. La corrida se llevo a cabo a voltaje constante (90 mV). La tinción para cada gel fue con azul Brillante de Coomassie durante 1 hora y se destiñó con una solución 10% ácido acético y 25% metanol durante una hora con agitación constante.

VI.II.IX. Construcciones en vectores de expresión.

Los modelados de las construcciones se hicieron con el programa Gene Construction kit® 1.03.1 (Textco Inc.).

Los secuencias obtenidas a partir de los vectores de clonación se subclonaron en los plásmidos pTrc-His-TOPO, pQE30 (6His-tag NH₂) y pQE60 (6His-tag COOH), de la siguiente manera:

1. Los plásmidos pTrc-His-TOPO y pQE30 se digirieron con las enzimas de restricción *Bam*H I/*Sa*I I. Para el caso de pQE60 se usaron las enzimas *Bam*H I/*Bg*I II.

Una vez linearizados se defosforilaron con 1 unidad de la enzima fosfatasa alcalina (Roche), en un volumen final de 35 μ l durante 75 minutos a 37°C.

2. A estos vectores defosforilados se les adicionó el fragmento de ADN (gen) y se ligó a 16°C durante 16 horas. La relación equimolar usada para las ligaciones fue 1:9 (plásmido:inserto) en un volumen final de 15 μ l.
3. Transcurrido el tiempo se procedió a transformar en células *E. coli* XL1-blue y posteriormente en *E. coli* BL21 DE3.

VI.II.X. Transformación.

- a) A toda la ligación se le adicionó 100 μ l de células competentes y se mantuvo durante 30 minutos en hielo.
- b) Posteriormente se les dió un choque térmico a 37°C, durante un minuto e inmediatamente después se pasaron a hielo y se mantienen en éste por cinco minutos.
- c) Para recuperar las células, se les adiciona 200 μ l de medio SOC y se incubaron durante una hora a 37°C.
- d) Pasado el tiempo se sembraron en placas de agar con 100 μ g/ml de ampicilina.

Se analizaron varias clonas por restricción. Para esto se les extrajo plásmido con Plasmid Miniprep kit (Bio-Rad), de acuerdo a instrucciones del proveedor, encontrando algunas clonas positivas. De éstas, se tomó plásmido superenrollado (10 ng) y se transformó en *E. coli* BL21 DE3 como se indicó anteriormente.

VI.II.XI. Expresión y purificación de proteínas recombinantes.

Una vez obtenidas las clonas que poseían el gen, se procedió a buscar las condiciones óptimas para su inducción como: la densidad celular de cultivo, la cantidad de inductor (IPTG), el tiempo y la temperatura de inducción. Se llevaron a cabo cinéticas de inducción con las clonas XL1-blue y BL21 DE3; se determinaron las condiciones óptimas de expresión y se procedió a purificar las proteínas de interés (SMDr-Lb1NH₂, SMDr-Lb1COOH, SMDr-Lr1NH₂, SMDr-LI1NH₂ y SMDr-LI2COOH). La purificación se hizo por afinidad al níquel con la resina Níquel-nitriloacético (Ni-NTA) como se describe a continuación:

a.1. Cultivo celular.

- a) Se creció un cultivo de 50 mL LB conteniendo 100 µg/ml ampicilina inoculado con alguna de las clonas positivas.
- b) Se deja creciendo durante 12 horas a 37°C con agitación constante.
- c) Posteriormente el inóculo se transfiere a un cultivo de 1 lt conteniendo 100 µg/ml de ampicilina. Se dejó creciendo a 37°C con agitación constante, hasta que alcanzó una O.D. de 0.6.
- d) Una vez que el cultivo llegó a la densidad óptica correspondiente, se indujo con 0.1 mM IPTG. Se dejó creciendo durante 16 horas a 22°C con agitación constante.

a.2. Extracción.

- a) El cultivo se centrifugó a 8,000 rpm por 15 minutos a 4°C.
- b) Se tiró el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 20 ml PBS y se dividen en dos partes iguales (10 ml) colocándose en 2 recipientes.
- c) Las partes se sonicaron con el equipo VC505-VC750, Sonics. La sonicación consistió en seis pulsos de 30 segundos por cada uno (amplitud 80% y 20 kHz de frecuencia). Entre cada pulso, el cultivo se mantuvo 1 minuto en hielo, con el fin de que la proteína de interés no se desnaturalizará por calor.
- d) El producto de la sonicación se centrifugó a 10,000 rpm por 25 minutos a 4°C para quitar restos celulares, y se extrajo el sobrenadante.
- e) Posteriormente se procedió a la purificación.

a.3. Purificación.

- a) La purificación se llevó a cabo en dos pasos con el fin de no exceder la capacidad de pegado de la resina.
- b) Se colocan 2 ml de resina Ni-NTA (Qiagen) en la columna (12 cm X 1.5 cm con capacidad para 20 ml) y se equilibró con PBS. La capacidad de pegado por ml de resina está entre 5-10 mg de proteína.
- c) Una vez que se equilibró la columna el sobrenadante se acopló por 10 minutos.

- d) Pasado el tiempo se recirculó, y el sobrenadante se vuelve a reincorporar dentro de la columna con un flujo muy lento.
- e) Posteriormente se lavó la columna con 20 ml de PBS con el fin de quitar proteínas unidas inespecíficamente.
- f) Después se lavó con 20 ml de la solución PBS + 25 mM imidazol, para hacer más estricto el lavado.
- g) Para la elución se utilizó la solución PBS + 250 mM imidazol, agregando 500 µl de esta solución a la columna, manteniéndola por 10 minutos.
- h) Transcurrido el tiempo se continuó con la corrida de la columna, colectándose la primera muestra. Posteriormente se añaden un total de 7 ml de la solución de elución, en tantos de 1 ml, manteniendo constante el flujo de la columna.
- i) Los primeros tres tubos de cada colecta fueron dializadas contra PBS (100 ml) a 4°C (dos cambios de 30 minutos y el último dejó durante 12 horas).
- j) Transcurrido el tiempo se cosecho la proteína y su pureza se evaluó por SDS-PAGE.

VI.II.XII. Plegamiento *in vitro* de la proteína recombinante.

Para plegar la proteína *in vitro* se solubilizó colocándola en presencia de 5M de cloruro de guanidinio más 30 mM DDT por 2 horas a temperatura ambiente. Al cabo de este tiempo, la proteína se dializó contra una solución: 2M cloruro de guanidinio, 4 mM glutatión reducido (GSH), 2 mM glutatión oxidado (GSSG) en PBS 1X pH 7.4, durante 1 h. Estas diálisis se repitieron con concentraciones decreciente de cloruro de guanidinio, manteniendo las de GSH y GSSG

constantes. El último ciclo de tres diálisis se llevo a cabo con 0.5 mM GSH + 0.05 mM GSSG. Finalmente en el último paso se eliminaron de la solución, quedando la proteína en PBS 1X pH 7.4.

VI.II.XIII. Hidrólisis de un fragmento de la proteína recombinante (SMDr) con la enzima enterocinasa (EK).

- a) Se dializó la proteína recombinante renaturalizada contra el buffer de reacción (50 mM Tris-HCl pH 8 + 1 mM CaCl₂ + 0.1% Tween-20).
- b) Para disolver y almacenar la EK, se preparó: 1 ml de 100 mM Tris-HCl pH 8 + 500 mM NaCl + 1 ml de glicerol. Se disolvió 250 µg de EK con 250 µl de buffer EK (1 µg/µl). Se guardó la enzima a -20°C.
- c) Se prepararon diluciones seriadas de EK desde 0.5 hasta 0.01563 µg/µl con buffer de reacción.
- d) Se prepararon las mezclas de reacción poniendo a cada dilución de EK (4 µl), 36 µl de proteína recombinante (2 µg/µl) de *L. boneti*. Como controles se usaron: la proteína recombinante sin digerir y la EK sin sustrato.
- e) Se incubaron por 2 horas a 37°C.
- f) Transcurrido el tiempo se sacaron 20 µl de la mezcla de reacción. Los 20 µl restantes se continuaron incubando durante 10 horas más.
- g) Se detuvo la reacción agregando 5 µl de buffer 5X de muestra con 2-mercaptoetanol y calentando por cinco minutos a baño maría.
- h) Se corrieron 20 µl de cada muestra en un gel de poliacrilamida al 12.5%.

- i) Al siguiente día se realizaron los pasos g y h con el resto de cada muestra.

VI.II.XIV. Cuantificación de proteínas.

La cuantificación de proteínas se hizo mediante dos métodos:

- a) Por absorbancia a 280 nm leída en un espectrofotómetro Beckman Du650I, asumiendo que una unidad de absorbancia equivale a 1 mg/ml de proteína.
- b) Por el método del ácido binciconínico por el kit Micro BCA Protein Assay Reagent kit (PIERCE) en el cual el ácido binciconínico (BCA) en su forma sal sodio es un reactivo estable, sensible y muy específico que reacciona con el ion cuproso (Cu^{+1}). La presencia de enlaces peptídicos y la contribución de las cadenas laterales de algunos aminoácidos como (cisteína, triptofano y tirosina) son responsables de la reacción colorimétrica, es decir, la proteína reacciona con el ion cúprico (Cu^{+2}) en un medio alcalino produciendo iones cuprosos (Cu^{+1}) lo cual se manifiesta con la aparición de color púrpura (Smith, *et al.*, 1985).

Para llevar a cabo el ensayo se hace una curva estándar con albúmina sérica bovina (BSA) a concentraciones de 5, 10, 20, 40 y 80 $\mu\text{g/ml}$. La concentración de la proteína a evaluar no debe pasar la concentración más alta ni la más baja del estándar, para que pueda ser cuantificable por éste método. Como control negativo se usó el buffer de carga (PBS). Todas las cuantificaciones se hicieron por duplicado y triplicado y se leyeron a 570 nm en un lector de ELISA (Modelo Bio-Rad 550).

VI.II.XV. Medición de la actividad enzimática de esfingomielinasas.

Se midió mediante el Amplex™ Red Sphingomyelinase Assay kit (Molecular Probes). El método consiste en que mediante varias reacciones enzimáticas se detecta la actividad de esfingomielinasa (C ó D) *in vitro* mediante fluorescencia. La actividad es

monitoreada usando 10-acetil-3,7 dihidroxifenoxazina (Amplex Red) el cual es sensible a peróxido de hidrógeno.

La reacción se lleva a cabo de la siguiente manera:

- a) La esfingomielinasa C hidroliza la esfingomielina para liberar fosfocolina y ceramida.
- b) La fosfocolina será hidrolizada por la fosfatasa alcalina, la colina es oxidada por la colina oxidasa dando como productos finales la betaína y el peróxido de hidrógeno.
- c) Finalmente el peróxido de hidrógeno en presencia de la enzima peroxidasa reacciona con el amplex en proporción 1:1, generando un producto fluorescente llamado resorufina.

La preparación de los reactivos del kit se llevó a cabo de acuerdo a instrucciones del proveedor.

En este ensayo se hace una curva estándar con la esfingomielinasa C de *Staphylococcus aureus* partiendo de 0.06 U/mL en diluciones seriadas hasta 0.001875 U/mL, donde una unidad está definida como la cantidad de esfingomielinasa que hidroliza 1 μ mole de esfingomielina-TNPAL por minuto a pH 7.4 a 37°C.

La actividad enzimática de las esfingomielinasas D de *Loxosceles* se midió haciendo 4 diluciones seriadas partiendo de 1 μ g/ml hasta 0.125 μ g/ml. Como control negativo se usó el buffer de reacción del kit. La incubación de la enzima con su sustrato se hizo a 37°C. Las lecturas se tomaron a los 15 y 30 minutos a partir de la incubación. La medición se hizo mediante el Cytofluor™ 2300 Fluorescence measurement Systems Millipore, usando un rango de excitación de 530-560 nm (filtro C) y uno de emisión de 590 nm (filtro C) en sensibilidad 1.

La curva estándar se hizo extrapolando los puntos de las distintas U/mL contra las unidades de fluorescencia relativas (UFR) correspondientes. Se obtuvieron las

ecuaciones de estas pendientes. Las UFR de las muestras evaluadas (esfingomeilinasas) se extrapolaron con las U/mL del estándar y se obtuvieron las U/mg de las esfingomielinasas D. A cada uno de los valores se les calculó la desviación estándar y el coeficiente de variación. Todas las gráficas se hicieron con el programa (Kaleidagraph™ Albebeck Software 3.0.2) y los cálculos con el programa Excell (Microsoft office 2001).

VI.II.XVI. Inhibición de la actividad enzimática de las esfingomielinasas D de *Loxosceles*.

Este ensayo se llevo a cabo con la SMDrLb1-NH2 y el suero hiperinmune de los conejos que fueron inmunizados con la misma proteína. La actividad enzimática se detectó con el Amplex™ Red Sphingomyelinase Assay kit (Molecular Probes). La manera en que se hizo fue pre-incubando por una hora a 37°C la enzima SMDrLb1-NH2 (desde 1 hasta 0.125 µg/ml) y el anticuerpo en distintas concentraciones (1:1, 1:5 1:20 y 1:100). Como blanco se usó el buffer con la dilución más alta de anticuerpo. Como control positivo se usó a la enzima con su sustrato. Transcurrida la pre-incubación, se adicionó el sustrato con el amplex red, se incubó a 37°C y se tomaron las lecturas a los 15 y 30 minutos como se describió anteriormente.

VI.II.XVII. Inmunización de conejos.

Se inmunizaron tres conejos con la proteína recombinante precipitada. Posteriormente con la proteína plegada y digerida con EK se inmunizaron a dos conejos. El esquema de inmunización fue el mismo para todos los grupos (Tabla 7).

Por otro lado se inmunizaron a grupos de dos conejos con las proteínas recombinantes obtenidas (SMDrLb1-NH2, SMDrLb1-COOH, SMDrLr1-NH2, SMDrLl1-NH2 y SMDrLl2-COOH). El esquema de inmunización fue el mismo para todos los grupos, como se muestra a continuación:

Tabla 7. Esquema de inmunización administrado a los grupos de conejos.

Inmunización	Dosis (μg)/cada conejo	Tipo de adyuvante	μl inyectados por conejo
1	30	CF	500
2	40	IF	500
3	50	IF	500
4	50	IF	500
5	60	IF	500
6	80	IF	500
7	80	IF	500
8	100	IF	500

El antígeno (en PBS), se mezcló a partes iguales con el adyuvante de Freund (Rockland). Cada inmunización fue espaciada por 10 días. A la quinta inmunización se extrajo 1 ml de sangre, por conejo, para monitorear títulos por ELISA. A partir de esa inmunización hasta la octava se procedió de la misma manera. Diez días después de la octava inmunización, los conejos se sangraron a blanco y se extrajo el suero crudo y se almacenó a -20°C hasta su uso.

VI.II.XVIII. Medición de títulos por ELISA (Enzyme Linked Immuno Assay).

La titulación de los anticuerpos a partir de sueros se llevó a cabo por Inmunoensayos enzimáticos. La técnica se basa en la interacción antígeno-anticuerpo. La interacción es detectada por un conjugado, compuesto de un anticuerpo unido covalentemente a una enzima que permite generar una señal colorida (Roitt, 2001). Los títulos se definieron como la dilución del suero hiperinmune, en la cual se encuentra la mitad de la absorbancia máxima.

La prueba de ELISA según González, 1997 consistió en:

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

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

- b) Una vez concluída la incubación, la placa se lavó tres veces con 200 μ l de solución de lavado. Este proceso se repitió entre cada paso a lo largo de todo el protocolo.
- c) Posteriormente se bloquearon las uniones inespecíficas con 200 μ l de solución de bloqueo, durante dos horas a 37°C.
- d) Se hicieron diluciones seriadas de los sueros, comenzando con 1:30 en buffer de reacción para ELISA. En cada pozo se adicionaron 100 μ l de la solución de reacción para ELISA y se mezclaron 50 μ l/pozo de la dilución del veneno en la columna 1, para proceder a las diluciones seriadas hasta la columna 10 dejando la 11 y 12 como controles. Se incubó por una hora a temperatura ambiente.
- e) Después se incubó el segundo anticuerpo anti-conejo conjugado a la enzima peroxidasa diluído 1:1000 en solución de reacción para ELISA, poniendo 100 μ l/pozo. Se incubó una hora a temperatura ambiente.
- f) La reacción se reveló con 100 μ l/pozo de sustrato ABTS (Boehringer), incubándose por 10 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo la reacción se detuvo con 100 μ l de SDS 10%, quedando a una concentración final de 5% y se procedió a leer la placa en un lector de ELISA (modelo BIO-RAD 550) a 405 nm.

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

VI.II.XIX. Pruebas de Western-blot.

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

Los Western-blot se hicieron siguiendo el protocolo de Mathews y Holde (1998).

- a) Se prepararon geles de poliacrilamida al 12.5% que se corrieron de manera acostumbrada para separar los componentes proteicos de la FII y proteína recombinante de *L. boneti*. La cantidad de muestra utilizada para cada ensayo fue de 1 µg por carril.
- b) Una vez terminada la corrida de los geles se realizó la transferencia durante una hora a corriente constante (400 mA) a una membrana de nitrocelulosa (soporte sólido). Para esto se utilizó una cámara de transferencia bajo condición semihúmeda (OWL).
- c) Una vez terminada la transferencia, la membrana se bloqueó durante toda la noche con agitación constante a temperatura ambiente en una solución al 5% de leche descremada/TBST, para impedir el pegado inespecífico de los anticuerpos.
- d) Pasado este tiempo se procedió a lavar las membranas tres veces con TBST (diez minutos cada lavado). Posteriormente se incubó con el primer anticuerpo en 0.1% de leche

descremada en polvo (Carnation o Svelty/TBST) con agitación constante a temperatura ambiente por una hora (se diluyó de acuerdo al título del anticuerpo). La dilución utilizada en este ensayo fue 1:1000.

- e) Concluida la incubación se continuó con tres lavados de diez minutos con TBST 1X cada uno. Se procedió a incubar una hora a temperatura ambiente y con agitación constante con el segundo anticuerpo en 0.1% de leche descremada/TBST. Se utilizó un anticuerpo anti-conejo acoplado a fosfatasa alcalina (ZYMED).
- f) Pasada la hora de incubación, se lavó tres veces por diez minutos con TBST, se eliminó el TBST del último lavado y se agregó el buffer de reacción NTB-BCIP el cual se dejó reaccionar durante cinco minutos.

VI.II.XX. Valoración de la dosis letal media en ratones.

La DL50 está definida como la cantidad de toxina que es capaz de matar a la mitad de una población. Para determinarla, a grupos de cuatro ratones balb-c (18-20g) se les administraron, de manera intraperitoneal, distintas cantidades de toxina (SMDrLb1-NH₂, SMDrLb1-COOH, SMDrLr1-NH₂, SMDrLI1-NH₂, SMDrLI2-COOH y veneno nativo). Después de 72 horas post-inoculación se tomaron lecturas de mortalidad, determinando de esta manera las DL50 mediante el programa GraphPad Prism (Versión 2; GraphPad Software, Inc, San Diego, CA). El punto de inflexión se calculó ajustando los datos experimentales para cada veneno por regresión no-lineal de las curvas sigmoides.

VI.II.XXI. Valoración de la inmunidad pasiva en ratones.

Este ensayo evaluó si ratones balb-c entre 18 y 20g son protegidos por los sueros hiperinmunes de conejos, que fueron inmunizados con la SMDrLb (transferencia de inmunidad).

El ensayo consistió en mezclar cierta cantidad de SMD recombinantes con cantidades variadas de suero hiperinmune anti-SMDrLb. Esta mezcla se incubó durante 30 minutos, a 37°C y se inyectó a grupos de 4 ó 5 ratones vía intraperitoneal. Finalmente se registró el porcentaje de sobrevida por grupo, a las 72 horas después de la inyección.

La capacidad neutralizante del suero se expresó como la cantidad en μl de suero hiperinmune necesaria para que el 50% de la población sobreviviera. Para determinar las DE50 de las lecturas obtenidas, las curvas sigmoideas se generaron con el programa GraphPad Prism (Versión 2; GraphPad Software, Inc. San Diego, CA). El punto de inflexión se calculó ajustando los datos experimentales para cada veneno y antiveneno por regresión no-lineal.

VI.II.XXII. Dermonecrosis en conejos.

La actividad dermonecrótica se evaluó en conejo y se determinó como la describió Furlanetto (Furlanetto *et al.*, 1962). En el lomo de un conejo New Zeland White previamente rasurado se le inyectó de manera subcutánea y asincrónica distintas concentraciones de isoforma Lb1, isoforma Lb3, SMDrLb1-NH2 diluídas en 100 μl de PBS pH 7.4. Como control negativo se usó el buffer vehículo (PBS pH 7.4). El área mínima necrótica se definió como el área de necrosis que cubra 1 cm^2 . Ésta se registró a las 72 horas post-inyección.

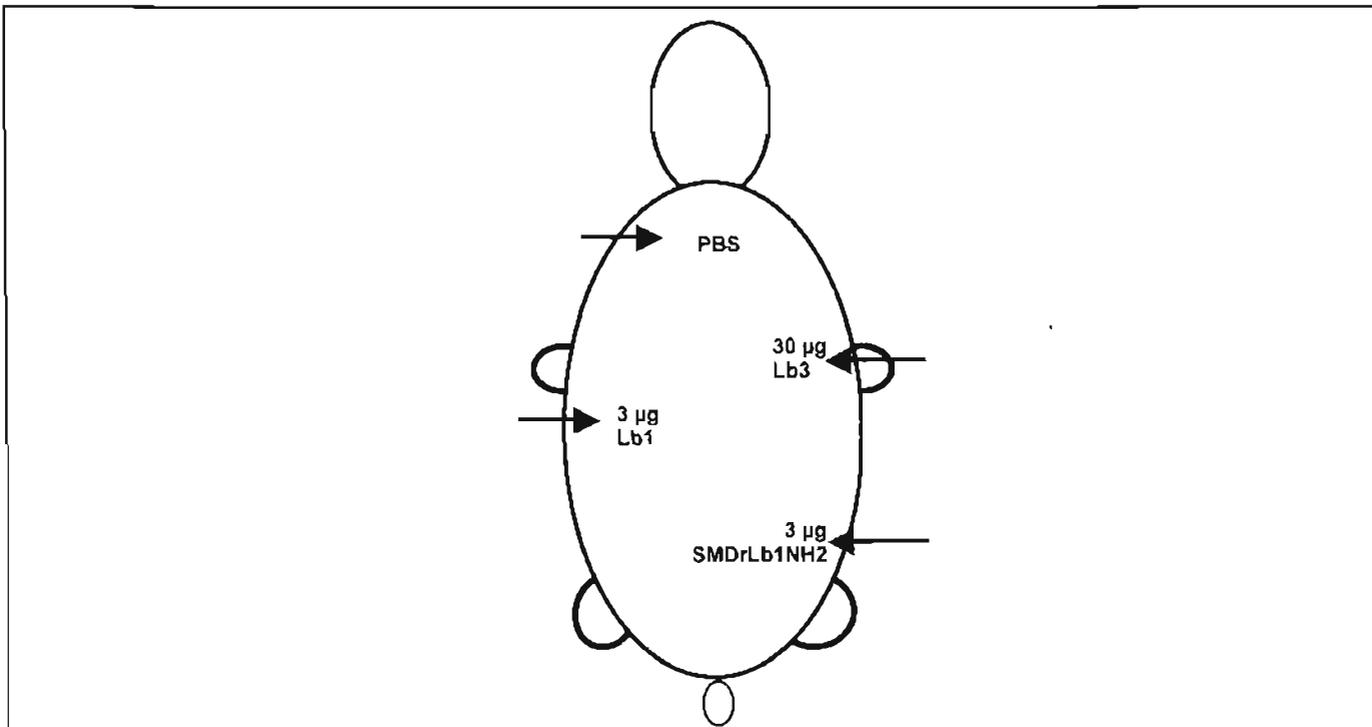


Figura 10. Dosis administradas para la prueba de demonecrosis. El conejo pesó 3.3 kg aproximadamente. En el primer punto se administró PBS (control negativo), en el segundo 30 µg de isoforma 3 nativa de *L. boneti* (30 µg Lb3), en el tercer punto 3 µg de isoforma 1 nativa de *L. boneti* (3 µg Lb1) y en el último punto, 3 µg de SMDrLb1NH2. En todos los casos el volumen administrado fue de 200 µl.

VI.II.XXIII. Escalamiento en bioreactor.

El escalamiento de la SMDrLb1-NH2, SMDrLb1-COOH, SMDrLr1-NH2, SMDrLI1-NH2, SMDrLI2-COOH se hizo en un biorreactor BIOFLO 110 de 5 litros de capacidad, bajo la supervisión de la M. en I.B.B. Hilda Vázquez López. Durante el escalamiento se determinó la duración de la fermentación, el tiempo óptimo de inducción, la cantidad de inductor y el rendimiento de la producción. En cuanto a la extracción de las proteínas se optimizó y estandarizó el tiempo, la amplitud y la frecuencia de la sonicación. La proteínas se purificaron por afinidad y la pureza se evaluó por SDS-PAGE. Posteriormente se cuantificaron las proteínas por BCA (PIERCE), y se les midieron a cada una de las proteínas obtenidas la actividad enzimática.

VII. RESULTADOS

VII.I. Obtención de las esfingomielinasas D nativas de *L. boneti* y *L. reclusa*.

Con el fin de obtener la fracción necrotóxica de *L. boneti* y *L. reclusa* se llevó a cabo una cromatografía de exclusión molecular en gel.

Por cada una de las separaciones, se colectaron 90 muestras de 5 ml aproximadamente.

Las absorbancias a 260 y 280 nm, de cada una de las muestras se graficaron para obtener los cromatogramas correspondientes. En base a los patrones obtenidos en cada filtración, se decidió separar a las muestra en cuatro fracciones principales (Figura 11).

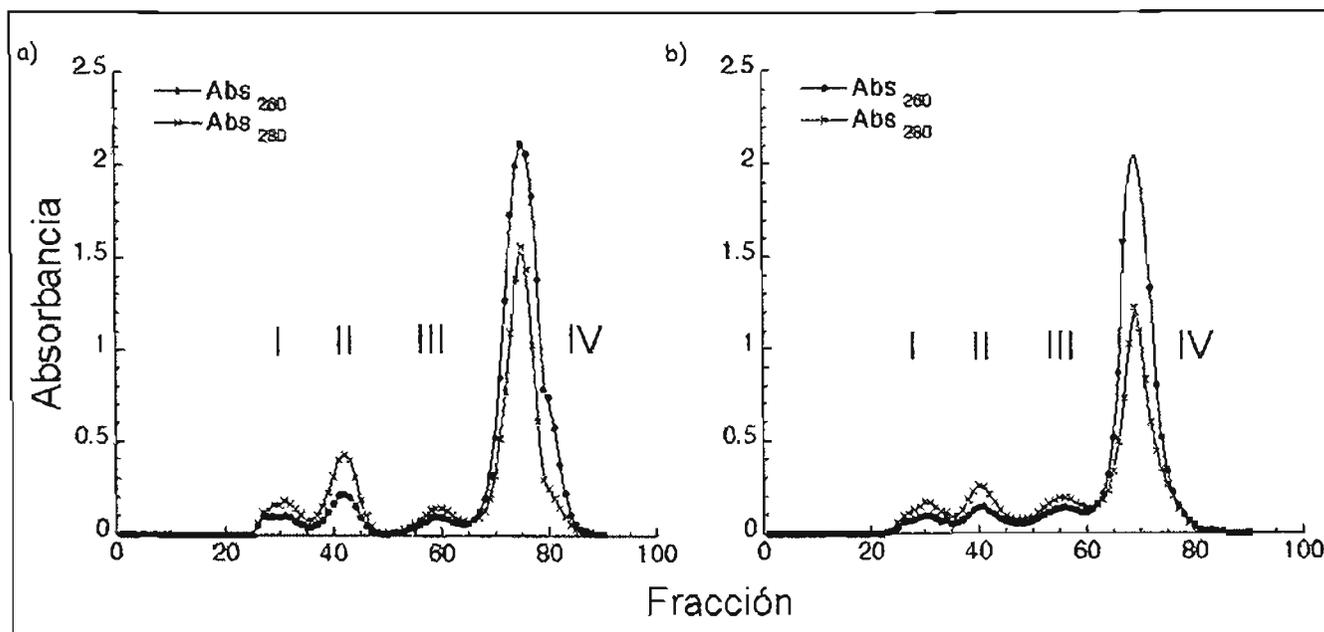


Figura 11. Cromatogramas de las filtraciones de exclusión molecular en gel (Sephadex G-75) de los venenos de a) *L. boneti* y b) *L. reclusa*. Los números romanos corresponden a las cuatro fracciones obtenidas.

Por resultados anteriormente obtenidos se sabía que, para ambos casos, la fracción II (FII) contenía a las necrotoxinas. Las demás fracciones de la filtración en gel se liofilizaron y almacenaron a 4°C.

Con el fin de separar las isoformas de las necrotoxinas, la FII tanto de *L. boneti*, como de *L. reclusa* se sometieron a una cromatografía de intercambio catiónico, con un gradiente lineal de cloruro de sodio de 0.6 M.

Para el caso de *L. boneti* se obtuvieron tres picos principales correspondientes a las isoformas y otros dos picos minoritarios no bien resueltos, los cuales, posiblemente sean algunas isoformas que estén presentes en el veneno en pequeñas cantidades (Figura 12).

En el caso de *L. reclusa*, la FII se resolvió en tres picos mayoritarios. Como se puede observar en el cromatograma de la Figura 12, la separación entre el primero y segundo pico no fue totalmente resolutive, sin embargo no eluyen al mismo tiempo.

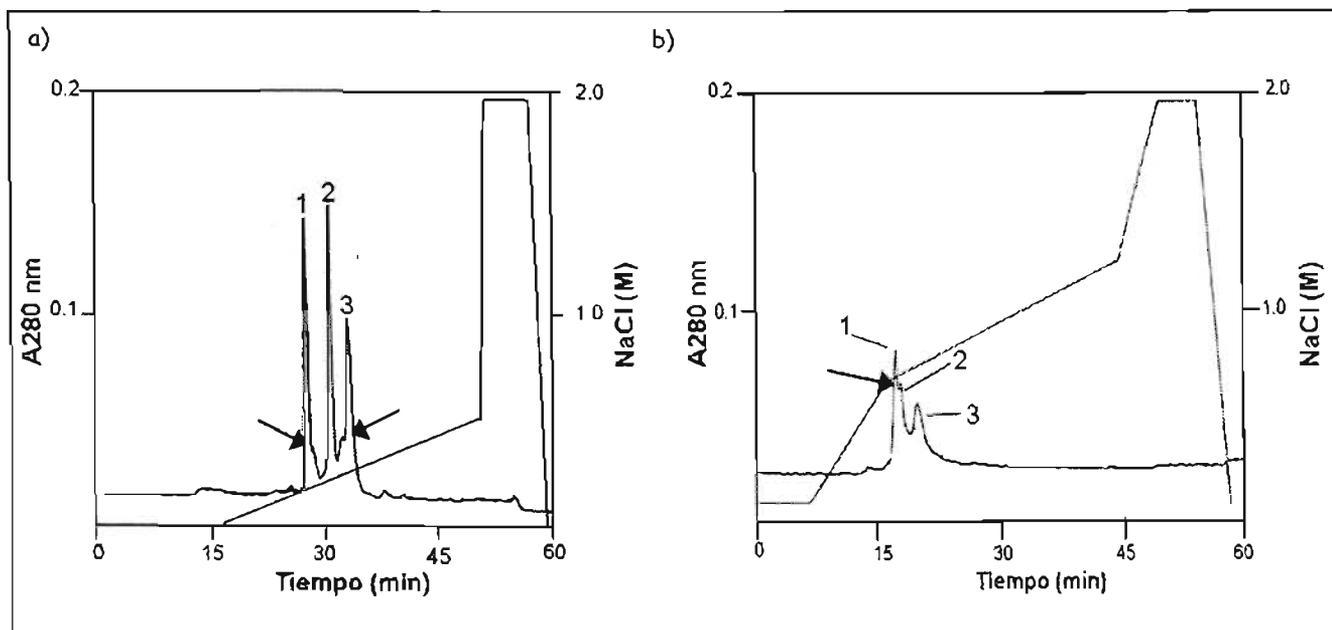


Figura 12. Resultado de la cromatografía de intercambio catiónico de la FII de a) *L. boneti* (520 μg) y b) *L. reclusa* (427 μg). Cada pico representa una isoforma. Para el caso de *L. boneti* las flechas señalan otras posibles isoformas que se encuentran en menor cantidad. En el caso de *L. reclusa* la flecha señala la posible mezcla de dos isoformas (1 y 2). La columna que se usó fue de tipo Mono S. La velocidad de flujo fue de 1 ml/min. La sensibilidad fue de 0.2 AU. El buffer usado fue acetato de amonio 20 mM a pH 4.7, con un gradiente de 0-2 M NaCl. La velocidad de graficación fue de 15 cm/h.

Todos los picos resueltos por FPLC, tanto de *L. boneti* como de *L. reclusa*, se cuantificaron por el método de BCA. Cada uno de los picos obtenidos de la cromatografía de intercambio catiónico, se analizaron en un gel de poliacrilamida al 12.5% con y sin reductor (Figura 13). En los geles, cada muestra se marca con un número que corresponde a los picos encontrados por FPLC.

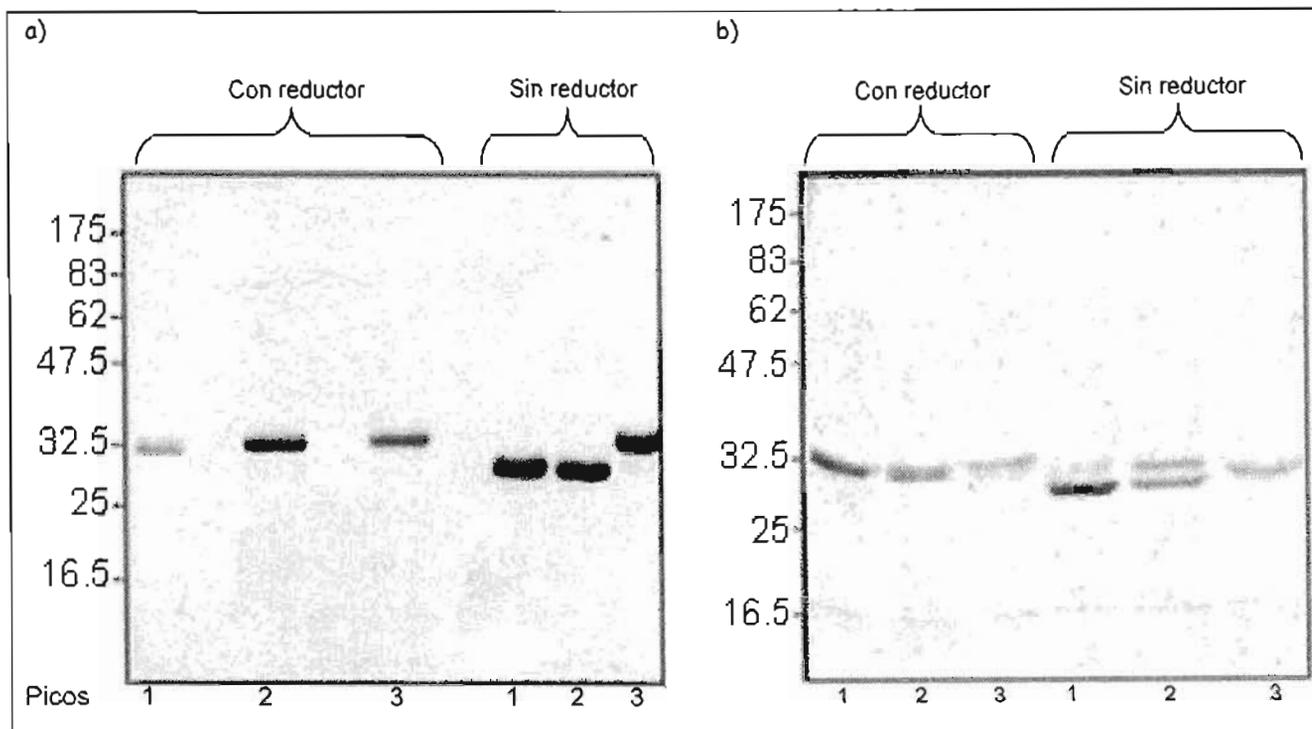


Figura 13. Análisis electroforético de las isoformas encontradas en la FII de a) *L. boneti* y b) *L. reclusa*. A la izquierda se encuentran los marcadores de peso molecular en kDa. Los números que están en la parte inferior de los geles corresponden a los distintos picos obtenidos por FPLC. Las muestras se corrieron en presencia y ausencia de reductores.

Como se puede observar, los picos obtenidos por FPLC de la FII de *L. boneti* se presume que son proteínas únicas correspondientes a las tres isoformas.

Para el caso de la fracción necrotóxica de *L. reclusa*, el segundo pico mostró dos proteínas que posiblemente sean una mezcla del pico 1 con el 2, ya que ambos eluyen muy cercanamente. Las demás muestras (1 y 3) al parecer son proteínas únicas, correspondientes a dos de las isoformas de *L. reclusa*.

Para ambos casos los pesos moleculares de todas las isoformas obtenidas oscilan alrededor de 32.5 kDa.

Las isoformas se guardaron a 4°C hasta su uso.

VII.II. Clonación, expresión y caracterización de la esfingomielinasa de *L. boneti*.

Como se mencionó en los antecedentes, se tenía el gen casi completo, codificante para la isoforma 1 de *L. boneti*. Este gen se subclonó entre los sitios *BamH* I y *Sal* I, del vector de expresión pTrcHis-TOPO®, bajo el promotor *trc*. Dicho vector agrega en el lado amino terminal del inserto una etiqueta de 6 histidinas, 5 aminoácidos como sitio de reconocimiento a enteroquinasa y 24 residuos más. Se hizo dicha construcción (Figura 14) con una relación equimolar inserto:vector 1 a 9. La clona resultante que tiene un inserto de 5218 pb se transformó en células *E.coli* XL1-Blue.

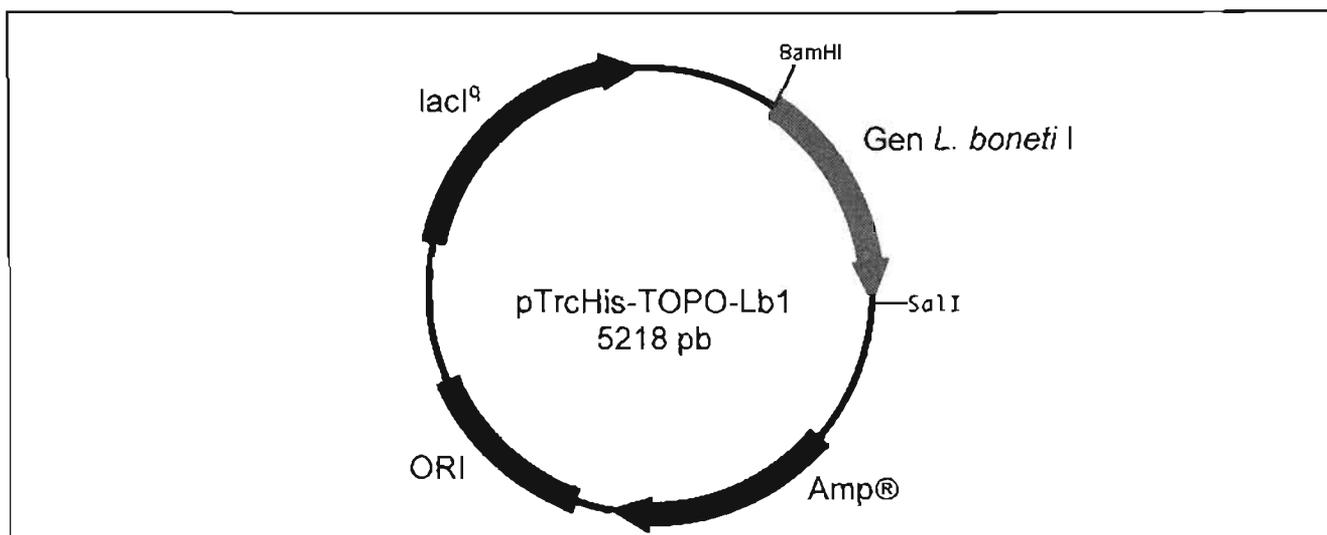


Figura 14. Construcción del gen *L. boneti I* con el vector pTrcHis-TOPO® (5218 pb). Éste vector adiciona una etiqueta de seis histidinas y un sitio de reconocimiento a enteroquinasa en el extremo amino terminal. El gen fue clonado entre los sitios *BamH* I y *Sal* I. El vector tiene un tamaño de original de 4390 pb, promotor *trc* y un gen de resistencia a ampicilina.

Las transformantes *E. coli* XL1-Blue, que por análisis de restricción (*BamH* I/*Sal* I) resultaron ser correctas, se sometieron a cinéticas de inducción (Figura 15), para determinar si la proteína era producida, y al mismo tiempo buscar las mejores condiciones para su expresión. Las condiciones de la cinéticas fueron las siguientes: 1 mM IPTG, a 37°C durante 3 horas con agitación constante, partiendo de una OD de 0.6. Se tomaron muestras antes de inducir y a cada hora posterior a la inducción.

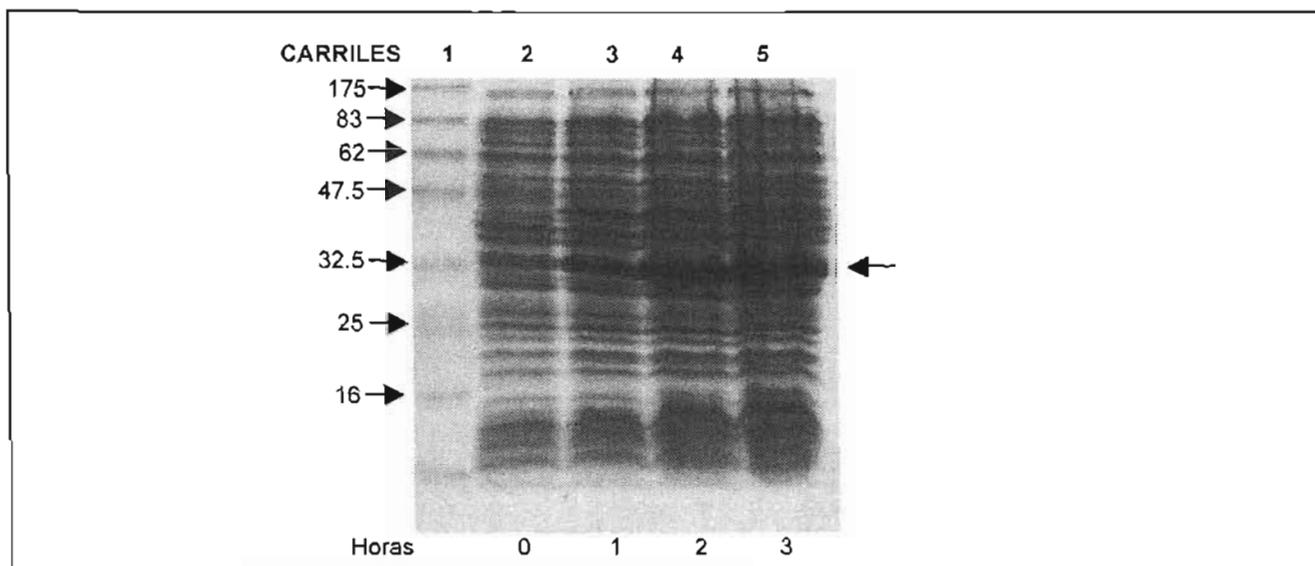


Figura 15. Cinética de inducción de la proteína recombinante de *L. boneti* 1. En el carril 1 se muestran los marcadores de peso molecular. La flecha del lado derecho indica la proteína recombinante expresada. A partir del carril 2 hasta el 5 se encuentran las muestras tomadas de 0 a 3 horas post-inducción. La cinética se llevó a cabo con 1 mM IPTG, a 37°C, con agitación constante, partiendo de una densidad celular de 0.6.

El peso molecular de la proteína recombinante obtenida se encontró alrededor de 32.5 kDa. La proteína de interés no se produce en ausencia de inductor, sin embargo, con inductor hubo una producción máxima a las tres horas. Se determinó que las mejores condiciones para la expresión de la proteína recombinante fueron: inducir con 1 mM IPTG, a 37°C y agitación constante por tres horas partiendo de una densidad celular de 0.6.

La proteína recombinante se purificó por afinidad, tomando en cada paso una muestra para evaluar por electroforesis en gel el rendimiento de dicha purificación. En este análisis se observó que la proteína producida se encontraba en cuerpos de inclusión. Por lo que se usó la solución A que contiene 6M cloruro de guanidinio. Éste es un agente caotrópico que promueve la desnaturalización de las proteínas, solubilizando las cadenas laterales haciendo más favorable la interacción con el agua, lo cual promueve que la proteína se mantenga en forma soluble. Una vez que las células se sonicaron en presencia de dicha solución, se procedió a purificar a la proteína recombinante por cromatografía de afinidad a níquel (Ni-NTA). Se obtuvo un rendimiento máximo de proteína recombinante de 1.7 mg/100 ml de cultivo. El peso molecular y la pureza de la proteína se evaluó por SDS-PAGE (Figura 16).

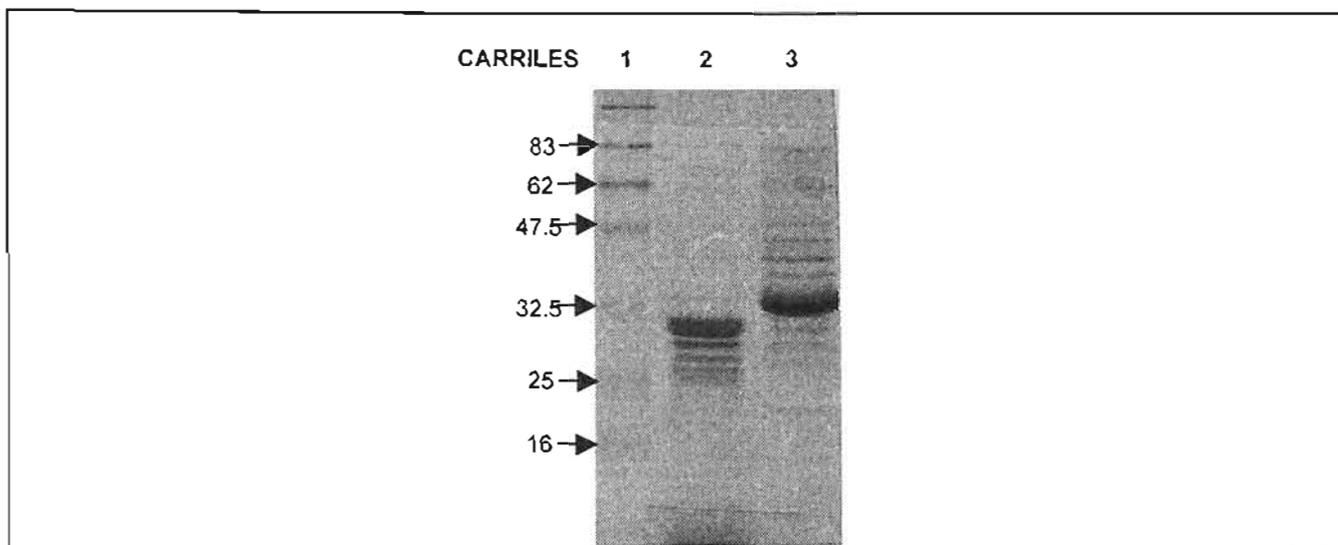


Figura 16. Análisis electroforético de la pureza de la proteína recombinante. 1) MPM. 2) Veneno de *L. boneti* 3) Proteína recombinante Lb1 (\approx 34.5 kDa).

La proteína recombinante purificada tuvo un peso molecular alrededor de 34.8 kDa, que correspondió al teórico y se encontró 87% pura. Ésta se dializó contra PBS pH 7.4, y concentraciones decrecientes de cloruro de guanidinio (desde 4M, 2M, 1M y 0M), evitando de esta manera que la proteína recombinante se saliera de solución. Se observó que toda la proteína precipitaba por debajo de 2M cloruro de guanidinio.

VII.III. Generación de anticuerpos en conejos contra la proteína recombinante precipitada de *L. boneti* y caracterización inmunológica .

La proteína recombinante precipitada de *L. boneti* (recombinante precipitada *L.b.* 1) se usó como inmunógeno en conejos. Para la medición de títulos por ELISA, ésta se solubilizó con 6M cloruro de guanidinio y 25 mM 2-mercaptoetanol. Con esta muestra en buffer 100 mM carbonato/bicarbonato a pH 9.6, se sensibilizaron las placas. Los anticuerpos mostraron títulos altos contra la proteína recombinante solubilizada *L.b.* 1 no así contra la fracción necrotóxica de *L. boneti* (FII *L.b.*). Sin embargo cuando ésta se desnaturalizó, se observó que los títulos aumentaban (Tabla 8).

Tabla 8. Títulos de anticuerpos medidos por ELISA contra la proteína recombinante de *L. boneti*.

Sensibilización de la placa	Suero de conejo contra	Títulos
Recombinante solubilizada <i>L.b.</i> 1	Recombinante <i>L.b.</i> 1	12,200
FII <i>L.b.</i>	Recombinante <i>L.b.</i> 1	1,700
FII <i>L.b.</i> desnaturalizada	Recombinante <i>L.b.</i> 1	8,000
FII <i>L.b.</i>	FII <i>L.b.</i>	37,000
Recombinante solubilizada <i>L.b.</i> 1	FII <i>L.b.</i>	3,800
FII <i>L.b.</i> desnaturalizada	FII <i>L.b.</i>	23,400

Los resultados obtenidos en estos ensayos indican que los anticuerpos generados a partir de la recombinante precipitada *L.b.* 1 reconocen a epítomos lineales de la secuencia peptídica. Para corroborar lo anterior, se hicieron pruebas de Western-blot, ya que en estos ensayos las proteínas se encuentran en conformación primaria debido a las condiciones desnaturalizantes de la electroforesis (SDS-PAGE), y a la presencia del reductor (2-mercaptoetanol). Se probaron dos sueros hiperinmunes: uno dirigido contra la proteína recombinante precipitada *L.b.* 1 y el otro contra la fracción necrotóxica. Estos resultados mostraron que efectivamente los anticuerpos contra la recombinante *L.b.* 1, reconocen esencialmente a su homólogo y a la FII *L.b.* El mismo caso se presentó con el suero dirigido contra la FII *L.b.* En la siguiente Figura se muestran los resultados obtenidos en esta prueba.

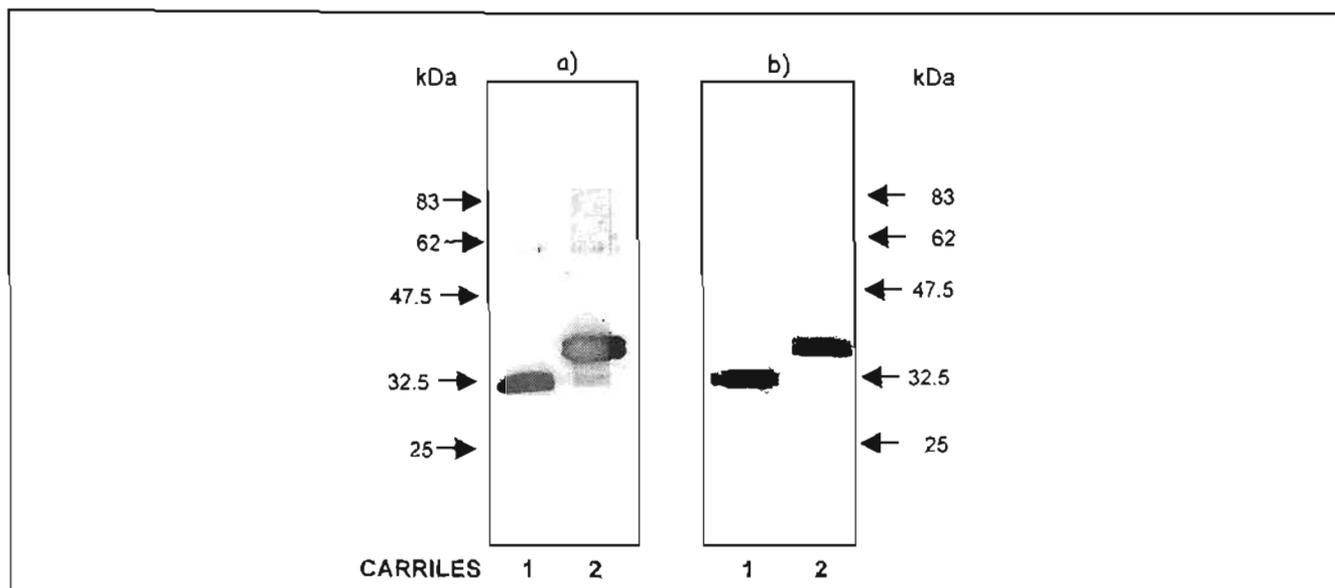


Figura 17. Fracción II y proteína recombinante de *L. boneti* fraccionadas por SDS-PAGE, reveladas por Western-blot con anticuerpos dirigidos contra a) Recombinante precipitada *L.b.* 1 y b) FII *L.b.* En la parte inferior de cada figura se muestran los carriles en los cuales se encuentran 1) FII *L.b.* 2) Recombinante precipitada *L.b.* 1. El total de proteína cargada en cada muestra fue de 1 μ g (A280). La dilución del primer anticuerpo fue 1:1000.

Estos resultados confirman lo obtenido por ensayos de ELISA, es decir, que los anticuerpos generados a partir de la recombinante precipitada *L.b.* 1 reconocen a la secuencia polipeptídica, sin embargo, éstos no son capaces de reconocer epítopos estructurales de las necrotoxinas de *L. boneti*.

Siguiendo con la caracterización inmunológica de los anticuerpos generados a partir de la recombinante precipitada *L.b.* 1, se llevaron a cabo experimentos de inmunidad activa en un conejo que ya había sido anteriormente inmunizado con dicha proteína. El experimento consistió en inyectar de manera subcutánea cantidades crecientes de veneno de *L. boneti* (10, 20 y 30 μ g) en la piel del conejo, esperando que el animal que ya había sido inmunizado tuvieran cierta protección contra la necrosis ocasionada por el veneno. Para la prueba se usó un conejo testigo, es decir, que no había recibido ninguna inmunización y se le aplicó las mismas cantidades de veneno (Tabla 9). Los resultados obtenidos en esta prueba mostraron que el conejo inmune desarrolló una necrosis más severa que el testigo, lo cual confirmaba que los anticuerpos de los conejos no neutralizan el efecto del veneno y además la proteína recombinante precipitada *L.b.* 1 provocó sensibilización del animal.

Tabla 9. Ensayo de inmunidad activa en conejos retados con veneno de *L. boneti*.

		Área necrosada en cm ²	
		Conejo inmunizado	Conejo testigo
Cantidad de veneno en µg <i>L. boneti</i>	10	0.5	0.45
	20	4.4	0.64
	30	6.4	1.05

Con los sueros obtenidos de los conejos inmunizados con la recombinante precipitada *L.b.* 1 se hicieron ensayos de inmunidad pasiva en ratones balb-c entre 18-20 g. Se probó neutralizar el efecto de 3DL50 (92 µg de veneno equivalente a 18.4 µg de fracción necrotóxica) con distintas cantidades de suero, encontrando que los anticuerpos no eran capaces de neutralizar los efectos del veneno, es decir, en la población no hubo sobrevida. En el mismo experimento se incluyó probar el suero hiperinmune contra la FII *L.b.*, encontrando que este suero protege contra los efectos del veneno. En la Tabla 10 se muestran los resultados obtenidos en estas pruebas.

Tabla 10. Ensayos de inmunidad pasiva en grupos de cuatro ratones balb-c entre 18-20g retados con veneno de *L. boneti*, neutralizado con suero hiperinmune contra la recombinante precipitada *L.b.* 1 y contra la Fil *L.b.*

a)

μl de suero vs prot. recomb.	μg de veneno=3DL50	Inyección IP/ratón	% de Sobrevida
400	92	500	0
300	92	500	0
200	92	500	0
100	92	500	0
75	92	500	0
60	92	500	0
50	92	500	0
40	92	500	0
Ratones control	0	92	500

b)

μl de suero vs Fil <i>L. boneti</i>	μg de veneno=3DL50	Inyección IP/ratón	% de Sobrevida
300	92	500	100
250	92	500	100
200	92	500	100
100	92	500	75
75	92	500	0
60	92	500	0
50	92	500	0
40	92	500	0
Ratones control	0	92	500

El inciso a) se refiere a las neutralizaciones hechas con el suero contra la recombinante precipitada *L.b.* 1. El inciso b) se refiere a los ensayos hechos con el suero hiperinmune contra la Fil *L.b.* La DE50 de éste fue de 86.49 μl /ratón con un intervalo de confianza entre 86.18 a 86.80 μl /ratón.

VII.IV. Plegamiento *in vitro* de la proteína recombinante precipitada de *L. boneti* y su caracterización bioquímica.

Debido a que los anticuerpos generados a partir de la proteína recombinante precipitada *L.b.* 1 no neutralizaban el efecto del veneno, se decidió intentar el plegamiento *in vitro* de dicha proteína (Woycechowsky, *et al.*, 2003), con el fin de que su conformación fuera similar o igual al de la proteína nativa, que era de gran relevancia, para generar anticuerpos que fueran capaces de reconocer epítopos neutralizantes del veneno.

La proteína recombinante precipitada *L.b.* 1 se solubilizó con cloruro de guanidinio en presencia de DTT. Posteriormente se dializó contra PBS en presencia de glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG), eliminando gradualmente el agente caotrópico. Se recuperó 60% de proteína soluble.

Por otro lado, esta proteína contaba con un sitio de corte a enterocinasa. Éste se aprovechó para eliminar algunos residuos (31) que no eran propios de la proteína y que probablemente interferían estéricamente provocando un plegamiento incorrecto y

en consecuencia una proteína inactiva. Se digirieron 7 μ g de ésta y el análisis electroforético mostró que la proteína tenía un peso molecular menor (\approx 31 kDa) al de la proteína no digerida (\approx 34 kDa), indicando que la enterocinasa había escindido eficientemente un fragmento del tamaño esperado (Figura 18).

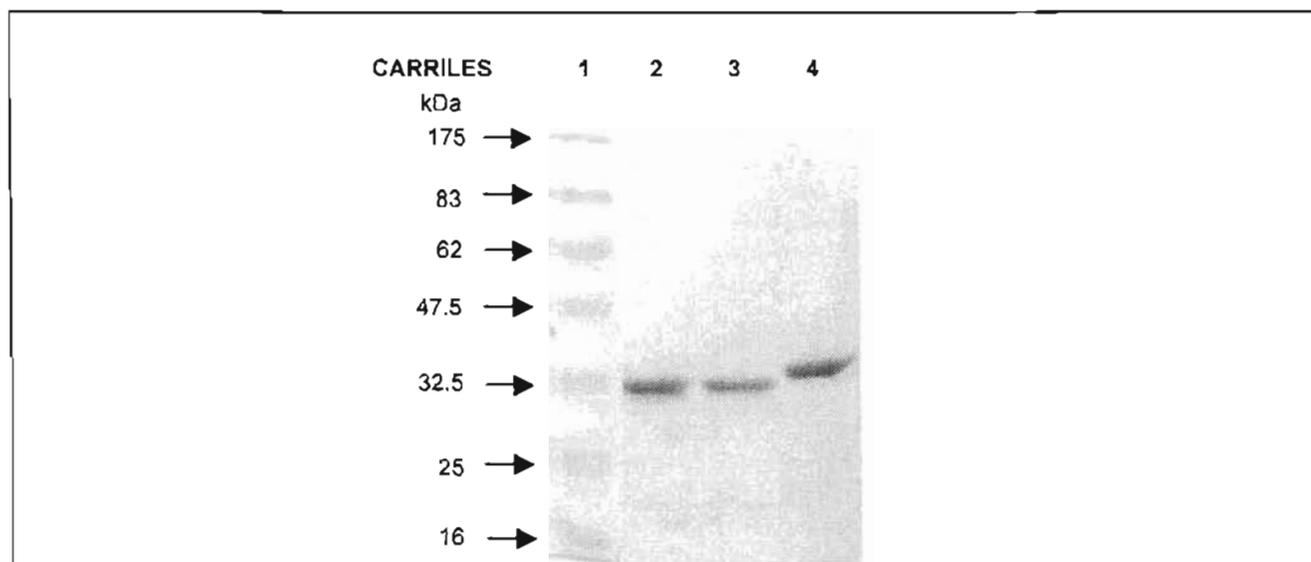


Figura 18. Análisis electroforético de la proteína recombinante plegada y digerida con enterocinasa (EK). 1) MPM. 2) Recombinante *L.b.* 1 plegada y digerida con EK (\approx 31 kDa). 3) Fracción II *L. boneti* (\approx 32 kDa). 4) Proteína recombinante precipitada (\approx 34.5 kDa).

Posteriormente, a la proteína plegada y digerida con la enterocinasa se le midió actividad enzimática (Amplex Red Sphingomyelinase Assay kit). Como control se usó la proteína plegada sin digerir. Estas actividades se compararon con la fracción necrotóxica de *L. boneti*. En la tabla 11 se muestran los resultados generados por éste ensayo.

Tabla 11. Actividad específica de la proteína recombinante plegada y digerida con enterocinasa (EK).

Proteína	Actividad específica (U/mg)	Desviación estándar
Recombinante <i>L.b.</i> 1 plegada y digerida con EK	2.3	± 0.3
Recombinante <i>L.b.</i> 1 plegada	0	
FII <i>L.b.</i>	24.01	± 2.85

Estos resultados mostraron que la recombinante *L.b.* 1 plegada y digerida con EK tenía un 9.6% de actividad específica con respecto a la FII *L.b.*, lo cual sugería que el

plegamiento (definido por la solubilidad y la actividad enzimática específica obtenida) se había llevado a cabo en al menos una fracción de la proteína recombinante y, que tal vez, algunos de los epítopes conformacionales necesarios para producir anticuerpos neutralizantes estarían presentes. De donde se planteó utilizar la recombinante *L.b.1* plegada y digerida con EK para inmunizar dos conejos. Los anticuerpos generados tenían propiedades similares a los de la recombinante *L.b. 1* precipitada, es decir, los títulos de los sueros contra su homólogo fueron altos (14,500), en contraste se observaron títulos muy bajos (2,300) cuando el antígeno era la FII *L.b.*

Todos estos resultados sugirieron que para tener un inmunógeno que generara anticuerpos capaces de neutralizar los efectos del veneno, era necesario obtener una proteína recombinante que tuviera un plegamiento correcto, porque al parecer el plegamiento *in vitro* no le confirió una conformación similar a la proteína nativa, siendo un indicador de esto la baja actividad específica, por lo que se plantearon otra estrategias en base a todos los resultados obtenidos en esta primera parte.

VII.V. Clonación de las esfingomielinasas D completas de *L. boneti*, *L. reclusa* y *L. laeta* (Perú).

Una de las estrategias que se plantearon para obtener inmunógenos recombinantes activos fue clonar el gen completo (con los primeros 4 residuos del extremo N-terminal) de las isoformas 1 de: *L. boneti* y *L. reclusa*.

A partir de las secuencias parciales de éstas, se diseñó un oligonucleótido sentido (5'Lb1-completo), el cual agregaba a los codones de los primeros cuatro aminoácidos y un sitio de restricción *BamH* I. Por otra parte ya se contaba con dos oligonucleótidos antisentido: el 3'NCTx-I que adiciona un sitio *Sal* I y el 3'NCTx-II que agrega un sitio *Bgl* II. El oligonucleótido sentido reconoce al extremo 5' de los genes tanto de *L. boneti* 1 como de *L. reclusa* 1, debido a que ambas secuencias son idénticas en los primeros 16 residuos de aminoácidos. Con los oligonucleótidos antisentido se presenta el mismo caso.

Las amplificaciones por PCR de los genes *L. boneti* 1 y *L. reclusa* 1 se hicieron usando un juego de oligonucleótidos: 5'Lb1-completo/3'NCTx-I. El otro par de oligonucleótidos 5'Lb1-completo/3'NCTx-II fue usado solamente para *L. boneti* 1. Cabe señalar que en dichas amplificaciones se tomó como templado las secuencias incompletas que ya se tenían.

Para el caso de *L. laeta* (Perú) se diseñaron oligonucleótidos específicos a partir de la secuencia ya reportada de *L. laeta* (Brasil) (Fernades Pedrosa *et al.*, 2002). El sentido (5'LI-1) adiciona un sitio de restricción *BamH* I y los antisentidos (3'LI-2 y 3'LI-3) adicionan los sitios *Sal* I y *Bgl* II, respectivamente. Se realizaron dos amplificaciones independientes a partir del ADNc de *L. laeta*. En la primera se usó el juego de oligonucleótidos 5'LI-1/3'LI-2 y la segunda se llevo a cabo con el par 5'LI-1/3'LI-3. El uso de oligonucleótidos para todas estas amplificaciones se muestra en la Tabla 12.

Tabla 12. Uso de oligonucleótidos para las amplificaciones de las esfingomielinasas de las tres especies *Loxosceles*.

Nombre de la secuencia	Juego de oligonucleótidos	Sitios de restricción
Lb1	5'Lb1-completo/3'NCTx-I	<i>Bam</i> H I/ <i>Sal</i> I
Lb1	5'Lb1-completo/3'NCTx-II	<i>Bam</i> H I/ <i>Bgl</i> II
Lr1	5'Lb1-completo/3'NCTx-I	<i>Bam</i> H I/ <i>Sal</i> I
LI1	5'LI-1/3'LI-2	<i>Bam</i> H I/ <i>Sal</i> I
LI2	5'LI-1/3'LI-3	<i>Bam</i> H I/ <i>Bgl</i> II

Se hicieron dos amplificaciones porque se requerían dos sitios de restricción: *Sal* I o *Bgl* II, en el extremo carboxilo terminal, para posteriormente poder clonar los fragmentos en pQE30 y pQE60 respectivamente.

Se obtuvieron dos productos de PCR tanto de *L. boneti* como de *L. laeta*; para el caso de *L. reclusa*, se obtuvo solamente uno, de acuerdo a los oligonucleótidos utilizados (Tabla 12).

Todos los productos obtenidos tuvieron el tamaño esperado (850 pb aproximadamente), que se ilustran en la Figura 19.

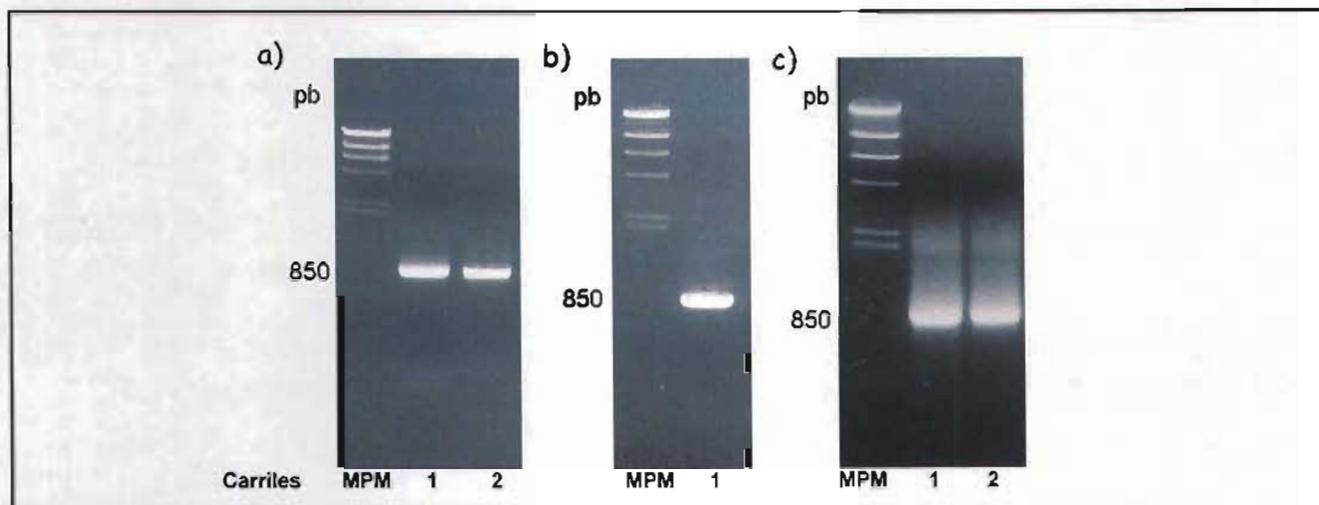


Figura 19. Productos de PCR: a) *L. boneti*. b) *L. reclusa*. c) *L. laeta* (Perú). Las amplificaciones fueron hechas en el caso de a) y b) usando las secuencias parciales que ya se tenían; para el caso de c) se hicieron a partir de ADNc. MPM) Marcador de peso molecular λ *Hind* III. 1) Amplificaciones hechas con los oligonucleótidos que agregan en los extremos N- y C- terminales los sitios *Bam*H I/*Sal* I respectivamente. 2) Amplificaciones que adicionan los sitios *Bam*H I/*Bgl* II en los extremos N- y C- terminales, respectivamente. Todos los productos tiene un tamaño de 850 pb aproximadamente.

Estos productos se clonaron en el vector pCR-TOPO 2.1 (3.9 kb; Invitrogen) y las clonas positivas se analizaron por restricción mostrando que *BamH I/Sal I* o *BamH I/Bgl II* liberaban un inserto de alrededor de 850 pb que correspondía al tamaño esperado (Figura 20).

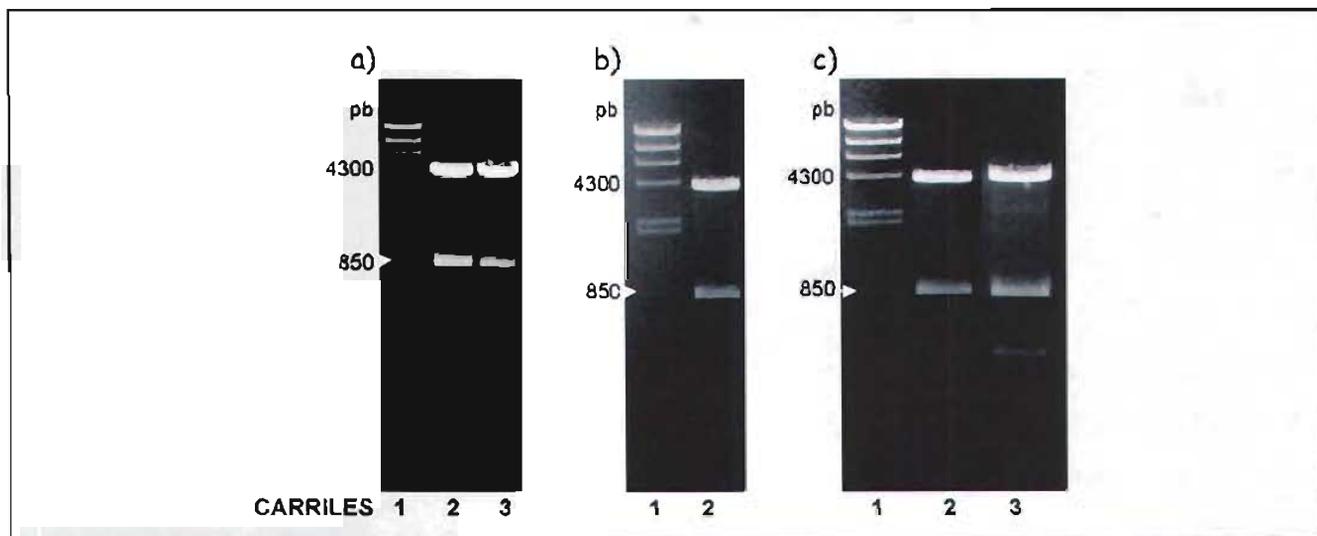


Figura 20. Análisis de restricción de las clonaciones en pCR-TOPO 2.1. a) *L. boneti*. b) *L. reclusa*. c) *L. laeta*. En los carriles de cada panel se indican las enzimas usadas para el análisis de restricción: 1) MPM λ *Hind III*. 2) *BamH I/Sal I*. 3) *BamH I/Bgl II*.

VII.VI. Secuenciación y análisis de comparación de las esfingomielinasas D completas de *L. boneti*, *L. reclusa* y *L. laeta* (Perú).

Los resultados de la secuenciación de las clonas obtenidas, confirmaron la clonación de las secuencias completas (\approx 280 aminoácidos) de las tres especies de *Loxosceles*. Esto se comprobó mediante un análisis de comparación (Figura 21).

Los alineamientos tanto de *L. boneti* como de *L. reclusa*, confirmaron que se obtuvieron las secuencias con los primeros cuatro residuos N-terminales que les hacían falta (Figura 21).

Cabe resaltar que se obtuvieron dos secuencias distintas de *L. laeta* (Perú) llamadas L11 y L12. Éstas comparten 82% de identidad entre ellas (Figura 21).

a)	Lb1 incom	----PAWIMG	HMVNATAQID	EFVNLGANSI	ETDVSFDSSA	36
	Lb1	ANKRPAWIMG	HMVNATAQID	EFVNLGANSI	ETDVSFDSSA	40
		→				
	Lb1 incom	NPEYTYHGIP	CDCGRCTCKW	ENFNDFLVGL	RKATTPDDSN	76
	Lb1	NPEYTYHGIP	CDCGRCTCKW	ENFNDFLVGL	RKATTPDDSN	80
	Lb1 incom	YHEKLVLVF	DLKTGSLYDN	QAYDAGKLA	KSILQHYWNN	116
	Lb1	YHEKLVLVF	DLKTGSLYDN	QAYDAGKLA	KSILQHYWNN	120
	Lb1 incom	GNNGGRAYIV	LSIPNLAHYK	LITGFKETLT	SDGHPPELMDK	156
	Lb1	GNNGGRAYIV	LSIPNLAHYK	LITGFKETLT	SDGHPPELMDK	160
	Lb1 incom	IGYDFSGNDA	IGDVASAYQK	AGVTGHVWQS	DGITNCLLRG	196
	Lb1	IGYDFSGNDA	IGDVASAYQK	AGVTGHVWQS	DGITNCLLRG	200
	Lb1 incom	LSRVREAVAN	RDSSNGYINK	VYFWTVDKRA	STRDALDAGV	236
	Lb1	LSRVREAVAN	RDSSNGYINK	VYFWTVDKRA	STRDALDAGV	240
	Lb1 incom	DGIMTNYPDV	IADVLSESAY	SAKFRIATYD	DNPWETFKN	275
	Lb1	DGIMTNYPDV	IADVLSESAY	SAKFRIATYD	DNPWETFKN	279
		←				
b)	Lr1 incom	----PAWIMG	HMVNAVAQID	EFVNLGANSI	ETDVSFDKNA	36
	Lr1	ANKRPAWIMG	HMVNAVAQID	EFVNLGANSI	ETDVSFDKNA	40
		→				
	Lr1 incom	NPEYTYHGIP	CDCGRCTCKW	ENFNDFLKL	RKATTPGDSK	76
	Lr1	NPEYTYHGIP	CDCGRCTCKW	ENFNDFLKL	RKATTPGDSK	80
	Lr1 incom	YHEKLVLVF	DLKTGSLYDN	QAYDAGKLA	KNILQHYWNN	116
	Lr1	YHEKLVLVF	DLKTGSLYDN	QAYDAGKLA	KNILQHYWNN	120
	Lr1 incom	GNNGGRAYIV	LSIPNLAHYK	LITGFKETLT	SEGHPELMEK	156
	Lr1	GNNGGRAYIV	LSIPNLAHYK	LITGFKETLT	SEGHPELMEK	160
	Lr1 incom	VGYDFSGNDD	IDKVGNAVYK	AGVTGHVWQS	DGITNCLLRG	196
	Lr1	VGYDFSGNDD	IDKVGNAVYK	AGVTGHVWQS	DGITNCLLRG	200
	Lr1 incom	LSRVKEAVKN	RDSSNGFINK	VYFWTVDKRA	STRDALDAGV	236
	Lr1	LSRVKEAVKN	RDSSNGFINK	VYFWTVDKRA	STRDALDAGV	240
	Lr1 incom	DGIMTNYPDV	IADVLSESAY	KANFRIATYD	DNPWETFKN	275
	Lr1	DGIMTNYPDV	IADVLSESAY	KANFRIATYD	DNPWETFKN	279
		←				
c)	L11	ADNRRPTIWNL	AHMVNAVAQI	PSFLDLGANA	LEADVTFKGS	40
	L12	ADNRRPTIWNL	GHMVNAVKQI	PTFLNDGANA	IEADITFKGA	40
		→				
	L11	VPTYTYHGTP	CDFGRDCIRW	EYFNVELKTL	KEYTTPGNAK	80
	L12	VPTYSYHGTP	CDFGRDCIRW	EYFDVFLRTL	REYTPGNSK	80
	L11	YRDGFILFVL	DLKTGSLSD	QVRPAGENVA	KELLQNYWNN	120
	L12	YREKFIPLVL	DLKTGSLNNH	EVRKAGENVA	KGLENYWNN	120
	L11	GNNGGRAYVV	LSLPDIGHYE	FVRGFKEVLK	KEGHEDLLEK	160
	L12	GNNGGRAYVV	LSLPDIAHYE	FIRTFKEVLK	TAGHENLLEK	160
	L11	VGYDFSGPYL	PSLPTLDATH	EAYKKAGVDG	HIVLSDGLTN	200
	L12	VGYDLSGPYW	PSLPSLDSVH	EAFKKAGVDG	HVNLSDGLTN	200
	L11	FSPLGDMARL	KEAIKSRDSA	NGFINKIYYN	SVDKYSTTKA	240
	L12	WAKLGDMARL	KEAIKSRDSE	NGFISKVYYW	SVDKYSTTTR	240
	L11	ALDVGVDGIM	TNHPNVLIGV	LKENGYNKY	RLATYDDNPW	280
	L12	ALDVGVDGIM	TNYPYVITDV	LNENGYKDKY	RLATYDDNPW	280
	L11	ETFKN				285
	L12	ETFKN				285

Figura 21. Comparaciones de las secuencias obtenidas. En el panel a) *L. boneti*, b) *L. reclusa* y c) *L. laeta*. En a) y b) se muestran las secuencias completas (279 residuos) de las isoformas I de *L. boneti* y *L. reclusa* respectivamente. En c) se muestran las dos secuencias obtenidas de *L. laeta* (285 aminoácidos), las cuales tienen 82% de identidad entre ellas. El sombreado gris indica la identidad entre las secuencias. A la izquierda se indica el nombre de las secuencias. A la derecha el número de residuo por línea. Los aminoácidos se indican en código de una letra. Las flechas indican el diseño de los oligonucleótidos: azul: 5' Lb1-completo; rojo: 3' NCTx I; negro: 3' NCTx II; verde: 5' Lr1; morado: 3' Lr2; amarillo: 3' Lr3.

VII.VII. Análisis de comparación entre las secuencias de las esfingomielinasas de *L. laeta* variedad peruana con las esfingomielinasas D de *L. laeta* variedad brasileña.

Las dos secuencias obtenidas de *L. laeta* (Perú) se compararon con las secuencias reportadas de *L. laeta* (Brasil) (Fernades Pedrosa, *et al.*, 2002). Éste grupo reportó tres secuencias distintas las cuales llamaron H17 (true sphingomyelinase), H13 y H10 (like sphingomyelinases). L11 comparada con LI H17 mostró una identidad de 99%, mientras que LI2 contra LIH13 tienen un 82% de identidad. Cabe resaltar que éstas secuencias conservan el número y posición de las cisteínas (Figura 22).

a)				b)							
L11	ADNRRPIWNL	AHMVNAVAQI	PSFLDLGANA	LEADVTFKGS	40	L12	ADNRRPIWNC	GHMVNAVQI	PTFLNDGANA	IEADITFKGA	40
H17	ADNRRPIWNL	AHMVNAVAQI	PDFLDLGANA	LEADVTFKGS	40	H13	ADKRRPIWNL	GHMVNAVQI	PTFLNDGANA	IEADITFKGA	40
		*	*					*	*		
L11	VPTYTYHGTP	CDFGROCIKW	EYFNVFLKTL	KEYTTPGNAK	80	L12	VPTYSYHGTP	CDFGROCIKW	EYFOVFLRTL	REYTTPGNSK	80
H17	VPTYTYHGTP	CDFGROCIKW	EYFNVFLKTL	REYTTPGNAK	80	H13	VPTYSYHGTP	CDFGROCIKW	EYFOVFLQTL	RDYTTPGNSK	80
L11	YRDGFILFVL	DLKTGSLSD	QVRPAGENVA	KELLQNYWNN	120	L12	YREKFIILFVL	DLKTGSLNNH	EVRKAGENVA	KGLLENYWNN	120
H17	YRDGFILFVL	DLKTGSLSD	QVRPAGENVA	KELLQNYWNN	120	H13	YYEKFIILFVL	DLKTGSLNNH	EVRKAGENIA	KGLLKNYWNN	120
L11	GNGGGRAYVW	LSLPDIGHYE	FVRGFKEVLK	KEGHEDLLEK	160	L12	GNGGGRAYVW	LSLPDIAHYE	FIRTFKEVLK	TAGHENLLDK	160
H17	GNGGGRAYVW	LSLPDIGHYE	FVRGFKEVLK	KEGHEDLLEK	160	H13	GNGGGRAYVW	LSLPDIAHYE	FIRRFKEVLK	AEGHENLLDK	160
L11	VGYDFSGPYL	PSLPTLDATH	EAYKAGVDG	HINWLSOGLTN	200	L12	VGYDLSGPPY	PSLPSLDSVH	EAFKAGVDG	HVWLSOGLTN	200
H17	VGYDFSGPYL	PSLPTLDATH	EAYKAGVDG	HINWLSOGLTN	200	H13	VGYDLSGPPY	PSLPSLDSVH	EAFKAGVDG	HVWLSOGLTN	200
L11	FSPLGDMARL	KEAIKSRDSA	NGFINKIYYW	SVDKVSTTKA	240	L12	WAKLGMARL	KEIIKSRDSE	NGFISKVYYW	SVDKYSTTRT	240
H17	FSPLGDMARL	KEAIKSRDSA	NGFINKIYYW	SVDKVSTTKA	240	H13	WAPLGMARL	KEIVERRDSE	NGFISKVYYW	SVDKYSTTRT	240
L11	ALDVGVDGIM	TNHPNVLIGV	LKENGYNDKY	RLATYDDNPW	280	L12	ALDVGVDGIM	TNYPYVIDV	LNENGYKDKY	RLATYDDNPW	280
H17	ALDVGVDGIM	TNHPNVLIGV	LKENGYNDKY	RLATYDDNPW	280	H13	ALDVGVDGIM	TNFPYVIDV	LNENGYKDKY	RLATYDDNPW	280
L11	ETFKN				285	L12	ETFKN				285
H17	ETFKN				285	H13	ETFKK				285

Figura 22. Alineamientos de las secuencias ya reportadas de *L. laeta*, Brasil (H17 y H13, GenBank Accession numbers AAM211154 y AAM211155, respectivamente) comparadas con las secuencias obtenidas SMDrLI1-NH2 y SMDrLI2-COOH. En el panel a) SMDrLI1-NH2 vs H17 mostrando que son 99% idénticas. En el panel b) SMDrLI2-COOH vs H13 que comparten un 94% de identidad. *) Posiciones de las cisteínas en las secuencias, las cuales se conservan. El sombreado gris indica la identidad entre las secuencias. A la izquierda se indica el nombre de las secuencias. A la derecha el número de residuos por línea. Los aminoácidos se indican en código de una letra.

VII.VIII. Alineamiento múltiple de las secuencias reportadas de las esfingomielinasas D de *Loxosceles*.

Se hizo un alineamiento múltiple con las secuencias reportadas y las obtenidas en nuestro laboratorio (Binford, *et al.*, 2003; Fernades Pedrosa *et al.*, 2002; Kalaphotakis *et al.*, 2002, Ramos-Cerrillo, *et al.*, 2004, Tambourgi *et al.*, 2004,). El alineamiento mostró que las esfingomielinasas D de *Loxosceles* son secuencias homólogas, que conservan la posición de las cisteínas. En cuanto al número de éstas, las secuencias de *L. laeta* (excepto la LIH10) tienen dos cisteínas, a diferencia de las otras

secuencias que presentan cuatro (Figura 23). Esta característica puede ser importante ya que la variación en el número de cisteínas y a su vez en la formación de puentes disulfuro (1 ó 2) probablemente les confiere una conformación distinta entre una y otra proteína.

El análisis de comparación mostró que las secuencias de *L. laeta* (LIH17, LI1, LI2 y LIH13) tienen cinco residuos adicionales con respecto a las demás, y se observan cuatro inserciones en las posiciones 169, 201, 205 y 221 (Figura 23). Ésta última inserción también se presenta en la secuencia LIH10 y Lb3. Por otro lado las secuencias *L. laeta* carecen de algunos aminoácidos en la posición 38 y 214 (Figura 23).

Las secuencias **LIH10 y Lb3** son muy particulares, ya que no solamente son las más cortas en cuanto a número de aminoácidos, sino también son las más distintas en cuanto a identidad con respecto a las demás (Tabla 13). Esto concuerda con lo hallado a nivel de actividad enzimática, ya que éstas son inactivas (Fernades Pedrosa, *et al.*, 2002; Ramos-Cerrillo, *et al.*, 2004).

En cuanto a las secuencias de *Loxosceles norteamericanas* (Lr1, Lb1, Lr2 y La) la característica que presentan es la ausencia de algunos aminoácidos, entre ellos los de la posición 2 (Figura 23) y guardan un gran parecido entre ellas (Tabla 13).

LH17	1	ADNRRP	IWNLA	HMVNA	VAQI	PDF	LDL	GANNA	LEA	DVTF
Ll1	1	ADNRRP	IWNLA	HMVNA	VAQI	PSF	LDL	GANNA	LEA	DVTF
Ll2	1	ADNRRP	IWNL	LGHMVNA	VKQI	PTF	LND	GANNA	IEA	DITF
LH13	1	ADKRRP	IWNL	LGHMVNA	VKQI	PTF	LND	GANNA	IEA	DITF
LH10	1	ADSRKP	IWDIA	HMVND	LDLV	DEY	LGD	GANNA	LEA	D LAF
Lb3	1	- - RPKP	IWDVA	HMVND	LELV	DEY	LGD	GANGL	ELE	DVAF
Lr1	1	A - NKRP	AWIM	GHMVNA	VAQI	DEF	VNL	GANNS	IE	TDV SF
Lb1	1	A - NKRP	AWIM	GHMVNA	IAQI	DEF	VNL	GANNS	IE	TDV SF
Lr2	1	A - NKRP	AWIM	GHMVNA	IYQI	DEF	VNL	GANNS	IE	TDV SF
La	1	A - NKRP	IWIM	GHMVNA	NYQI	DEF	VNL	GANNS	IE	TDV SF
LiP1	1	AGNRRP	IWIM	GHMVNA	IGQI	DEF	VNL	GANNS	IE	TDV SF
LiD1	1	AGNRRP	IWIM	GHMVNA	IGQI	DEF	VNL	GANNS	IE	TDV SF
LiP2	1	ADKRRP	IWIM	GHMVNA	IAQI	DEF	VNL	GANNS	IE	TDV SF

LH17	38	- KGSV	PTYTY	HGTP	PCD	FGRD	CIR	WEY	FNV	FLKT	LREY	
Ll1	38	- KGSV	PTYTY	HGTP	PCD	FGRD	CIR	WEY	FNV	FLKT	LKEY	
Ll2	38	- KGAV	PTYSY	HGTP	PCD	FGRD	CIR	WEY	FDV	FLRT	LREY	
LH13	38	- KGAV	PTYSY	HGTP	PCD	FGRD	CIR	WEY	FDV	FLQT	LRDY	
LH10	38	TSDG	TAD	EMY	HGV	PCD	CFR	SC	TRSE	KFST	YMDY	IRRI
Lb3	36	SDDG	TAE	KMY	HGV	PCD	CFR	SC	KRTET	FTKY	MDY	IREL
Lr1	37	DKNA	NPEY	TYHG	I	PCD	CGRT	C	T	KWEN	FND	FLKGLRKA
Lb1	37	DSSA	NPEY	TYHG	I	PCD	CGRT	C	T	KWEN	FND	FLVGLRKA
Lr2	37	DKDA	NPEY	TYHG	V	PCD	CGRS	C	L	KWEY	FSD	FLKGLRKA
La	37	DSSA	NPEY	TYHG	V	PCD	CRGW	C	K	KWEY	FNN	FLKALRKA
LiP1	38	DDNA	NPEY	TYHG	I	PCD	CGRN	C	K	KYEN	FND	FLKGLRSA
LiD1	38	DDNA	NPEY	TYHG	I	PCD	CGRN	C	K	KYEN	FND	FLKGLRSA
LiP2	38	DDNA	NPEY	TYHG	I	PCD	CGRS	C	L	KWEN	FND	FLKGLRSA

LH17	74	TTPG	NAKY	RDGF	I	L	FV	L	D	LKTGS	LSND	QVRP	PAG	ENVA								
Ll1	74	TTPG	NAKY	RDGF	I	L	FV	L	D	LKTGS	LSND	QVRP	PAG	ENVA								
Ll2	74	TTPG	NSKY	REKF	I	L	FV	L	D	LKTGS	LNNH	EV	RK	PAG	ENVA							
LH13	74	TTPG	NSKY	YEKF	I	L	FV	L	D	LKTGS	LNNN	EV	RK	PAG	ENIA							
LH10	75	TTPG	SSNF	RPQML	L	L	I	I	D	LKL	KG	I	EP	NV	AYA	AAGK	STA					
Lb3	73	TTPG	NSKF	NNN	L	L	I	M	D	LKL	NG	I	EP	NV	AYA	AAGK	SVA					
Lr1	74	TTPG	DSKY	HEK	L	V	V	F	D	LKTGS	LYDN	NQA	Y	D	A	G	K	K	L	A		
Lb1	74	TTPD	DSNY	HEK	L	V	V	F	D	LKTGS	LYDN	NQA	Y	D	A	G	K	K	L	A		
Lr2	74	TTPG	DSKY	HAK	L	V	V	F	D	LKTGS	LYDN	NQA	Y	D	A	G	K	K	L	A		
La	74	TTPG	DSKY	HEK	L	V	V	F	D	LKTGS	LYDN	NQA	Y	D	A	G	K	K	L	A		
LiP1	75	TTPG	NSKY	QEKL	V	V	V	F	D	LKTGS	LYDN	NQA	N	D	A	G	K	K	L	A		
LiD1	75	TTPG	NSKY	QEKL	V	V	V	F	D	LKTGS	LYDN	NQA	N	D	A	G	K	K	L	A		
LiP2	75	TTPG	NAKY	QAK	L	I	L	V	V	F	D	LKTGS	LYDN	NQA	N	E	A	G	K	K	L	A

LH17	111	KE	L	L	Q	N	Y	W	N	N	G	N	G	G	R	A	Y	V	V	L	S	L	P	D	I	G	H	Y	E	F	V	R	G	F	K	E	
Ll1	111	KE	L	L	Q	N	Y	W	N	N	G	N	G	G	R	A	Y	V	V	L	S	L	P	D	I	G	H	Y	E	F	V	R	G	F	K	E	
Ll2	111	KG	L	L	E	N	Y	W	N	N	G	N	G	G	R	A	Y	V	V	L	S	L	P	D	I	A	H	Y	E	F	I	R	T	F	K	E	
LH13	111	KG	L	L	K	N	Y	W	N	N	G	N	G	G	R	A	Y	V	V	L	S	L	P	D	I	A	H	Y	E	F	I	R	R	F	K	E	
LH10	112	KK	L	L	S	S	Y	W	Q	D	G	K	S	G	A	R	A	Y	I	V	L	S	L	E	T	I	T	R	Q	D	F	I	S	G	F	K	D
Lb3	110	EK	L	L	S	S	Y	W	Q	N	G	E	S	G	A	R	A	Y	I	V	L	S	L	E	T	I	T	R	P	E	F	I	N	G	F	R	D
Lr1	111	KN	I	L	Q	H	Y	W	N	N	G	N	N	G	G	R	A	Y	I	V	L	S	I	P	N	L	A	H	Y	K	L	I	T	G	F	K	E
Lb1	111	KS	I	L	Q	H	Y	W	N	N	G	N	N	G	G	R	A	Y	I	V	L	S	I	P	N	L	A	H	Y	K	L	I	T	G	F	K	E
Lr2	111	KN	L	L	K	H	Y	W	N	N	G	N	N	G	G	R	A	Y	I	V	L	S	I	P	D	L	N	H	Y	K	L	I	T	G	F	K	E
La	111	KN	L	L	Q	H	Y	W	N	N	G	N	N	G	G	R	A	Y	I	V	L	S	I	P	N	L	A	H	Y	K	L	I	T	G	F	K	E
LiP1	112	KN	L	L	Q	H	Y	W	N	N	G	N	N	G	G	R	A	Y	I	V	L	S	I	P	D	L	N	H	Y	P	L	I	K	G	F	K	D
LiD1	112	KN	L	L	Q	H	Y	W	N	N	G	N	N	G	G	R	A	Y	I	V	L	S	I	P	D	L	N	H	Y	P	L	I	K	G	F	K	D
LiP2	112	KN	L	L	K	H	Y	W	N	N	G	N	N	G	G	R	A	Y	I	V	L	S	I	P	D	L	N	H	Y	P	L	I	K	G	F	K	D

LlH17	148	V L K K E G H E D L L E K V G Y D F S G P Y L P S L P T L D A T H E A Y K
Ll1	148	V L K K E G H E D L L E K V G Y D F S G P Y L P S L P T L D A T H E A Y K
Ll2	148	V L K T A G H E N L L D K V G Y D L S G P Y W P S L P S L D S V H E A F K
LlH13	148	V L K A E G H E N L L D K V G Y D L S G P Y L P S L P S L D S V H E A F R
LlH10	149	A I D A S G H T E L Y E K I G W D F S G N - - - - - E D L G E I R R I Y Q
Lb3	147	A I K A S G H E E L F E K I G W D F S G N - - - - - E D L G D I R R V Y Q
Lr1	148	T L T S E G H P E L M E K V G Y D F S G N - - - - - D D I D K V G N A Y K
Lb1	148	T L T S D G H P E L M D K I G Y D F S G N - - - - - D A I G D V A S A Y Q
Lr2	148	T L K S E G H P E L M D K V G H D F S G N - - - - - D A I G D V G N A Y K
La	148	T L K T E G H P E L M E K V G Y D F S G N - - - - - D N I D Q V A N A Y K
LiP1	149	Q L T K D G H P E L M E K V G H D F S G N - - - - - D D I G D V G K A Y K
LiD1	149	Q L T K D G H P E L M D K V G H D F S G N - - - - - D D I S D V G K A Y K
LiP2	149	Q L T Q D G H P E L M D K V G H D F S G N - - - - - D A I G D V G N A Y K
LlH17	185	K A G V D G H I W L S D G L T N F S P L G D M A R L K E A I - - - - -
Ll1	185	K A G V D G H I W L S D G L T N F S P L G D M A R L K E A I - - - - -
Ll2	185	K A G V D G H V W L S D G L T N W A K L G D M A R L K E I I - - - - -
LlH13	185	K A G V D G H V W L S D G L T N W A P L G D M A R L K E I V - - - - -
LlH10	181	K Y G I D D H I W Q G D G I T N - - C W - - - - - V R D D D R L K E A I K
Lb3	179	K Y G I D E H I W Q G D G I T N - - C L - - - - - P R G D Y R L T E A M K
Lr1	180	N A G V T G H V W Q S D G I T N - - C L - - - - - L R G L S R V K E A V K
Lb1	180	K A G V T G H V W Q S D G I T N - - C L - - - - - L R G L S R V R E A V A
Lr2	180	K A G V T G H V W Q S D G I T N - - C L - - - - - L R G L S R V K D A V K
La	180	K A G V T G H V W Q S D G I T N - - C L - - - - - L R G L D R V R K A V A
LiP1	181	K A G I T G H I W Q S D G I T N - - C L - - - - - P R G L S R V N A A V A
LiD1	181	K A G I T G H I W Q S D G I T N - - C L - - - - - P R G L S R V N A A V A
LiP2	181	K A G I S G H V W Q S D G I T N - - C L - - - - - L R G L D R V K Q A T A
LlH17	215	K S R D S A N G F I N K I Y Y W S V D K V S T T K A A L D V G V D G I M T
Ll1	215	K S R D S A N G F I N K I Y Y W S V D K V S T T K A A L D V G V D G I M T
Ll2	215	K S R D S E N G F I S K V Y Y W S V D K Y S T T R T A L D V G V D G I M T
LlH13	215	E R R D S E N G F I S K V Y Y W S V D K Y S T T R T A L D V G V D G I M T
LlH10	211	K K N D P N Y K Y T K K V Y T W S I D K N A S I R N A L R L G V D A I M T
Lb3	209	K K N D P D Y K Y T E K V Y T W S I D K E A S I R N A L R L G V D A V M T
Lr1	210	N R D S S N - G F I N K V Y F W T V D K R A S T R D A L D A G V D G I M T
Lb1	210	N R D S S N - G Y I N K V Y Y W T V D K R A S T R D A L D A G V D G I M T
Lr2	210	N R D S S N - G F I N K V Y Y W T V D K R A T T R E A L D A G V D G V M T
La	210	N R D S S N - G Y I N K V Y Y W T V D K R Q S T K N A L D A G V D G I M P
LiP1	211	N R D S A N - G F I N K V Y Y W T V D K R S T T R D A L D A G V D G I M T
LiD1	211	N R D S A N - G F I N K V Y Y W T V D K R S T T R D A L D A G V D G I M T
LiP2	211	N R D S A N - G F I N K V Y Y W T V D K R A T T R D A L D A G V D G V M T
LlH17	252	N Y P N V L I G V L K E S G Y N D K Y R L A T Y D D N P W E T F K N
Ll1	252	N H P N V L I G V L K E N G Y N D K Y R L A T Y D D N P W E T F K N
Ll2	252	N Y P Y V I I D V L N E N G Y K D K Y R L A T Y D D N P W E T F K N
LlH13	252	N F P Y V I I D V L N E N G Y K D K Y R L A T Y D D N P W E T F K K
LlH10	248	N Y P E D V K D I L Q E S E F S G Y L R M A T Y D D N P W V K
Lb3	246	N Y P A R V K S I L N E S E F S S T H R M A T Y E D N P W Q K
Lr1	246	N Y P D V I A D V L S E S A Y K A N F R I A T Y D D N P W E T F K N
Lb1	246	N Y P D V I A D V L S E S A Y S A K F R I A T Y D D N P W E T F K N
Lr2	246	N Y P D V I T D V L N E S A Y K A K F R I A T Y D D N P W E T F K N
La	246	N Y P D V I A D V P N E S A Y K A K F R I A S Y D D N P W E T F K N
LiP1	247	N Y P D V I T D V L N E A A Y K K K F R V A T Y D D N P W V T F K K
LiD1	247	N Y P D V I T D V L N E A A Y K K K F R V A T Y D D N P W V T F K K
LiP2	247	N Y P D V I T D V L N E S A Y K N K F R V A S Y E D N P W E T F K K

Figura 23. Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de las esfingomielinas maduras de diferentes especies *Loxosceles*: LlH17, *L. laeta* H17 (AAM211154); Ll1, *L. laeta* isoforma 1; Ll2, *L. laeta* isoforma 2; LlH13, *L. laeta* H13 (AAM211155); LlH10, *L. laeta* H10 (AY093601); Lb3, *L. boneti* isoforma 3 (AAT66074); Lr1, *L. reclusa* isoforma 1 (AAT66075); Lb1, *L. boneti* isoforma 1 (AAT66073); Lr2, *L. reclusa* isoforma 2 (AAT66076); La, *L. arizonica* (Q7Z1Y7); LiP1, *L. intermedia* isoforma 1 (AAP97091); LiD1, *L. intermedia* proteína dermonecrótica 1 (P83045); LiP2, *L. intermedia* isoforma 2 (AAP97092). Las cisteínas están enmarcadas en rectángulos. Residuos conservados. Isoformas de especies: Sudamericanas, Norteamericanas e isoformas inactivas.

Dentro del análisis de comparación, se calculó el porcentaje de identidad entre las secuencias de las isoformas de las esfingomielinasas reportadas hasta el momento (Tabla 13). Cabe señalar que las secuencias pueden ser agrupadas de acuerdo a la identidad que muestran entre ellas:

- a) *Loxosceles* norteamericanas (Lr1, Lb1, Lr2 y La)
- b) Inactivas (LIH10 y Lb3)
- c) *Loxosceles* sudamericanas
 - L. laeta* (LIH17, LI1, LI2 y LIH13)
 - L. intermedia* (LiP1, LiD1 y LiP2)

Estas últimas secuencias son separadas en dos subgrupos, porque a pesar de que tienen origen sudamericano, las *L. intermedia* guardan un parecido mayor con las secuencias *Loxosceles* norteamericanas.

Tabla 13. Porcentaje de identidades entre las esfingomielinasas de *Loxosceles*.

Secuencia	LIH17	LI1	LI2	LIH13	LIH10	Lb3	Lr1	Lb1	Lr2	La	LiP1	LiD1	LiP2
LIH17	-												
LI1	99	-											
LI2	82	82	-										
LIH13	80	80	94	-									
LIH10	42	41	41	41	-								
Lb3	41	40	40	39	78	-							
Lr1	60	59	60	60	44	44	-						
Lb1	57	56	58	57	46	45	91	-					
Lr2	60	59	61	61	45	46	90	84	-				
La	59	58	59	58	43	43	88	86	87	-			
LiP1	60	59	59	59	45	47	84	82	85	81	-		
LiD1	59	59	59	60	44	46	84	82	85	80	99	-	
LiP2	59	58	59	60	44	46	83	82	87	80	90	90	-

Los cálculos de la identidades se llevaron a cabo con el programa *Protein Aligment* del paquete GeneWorks® 2.5.1 (Intelligenetics, Inc.).

VII.IX. Clonación de los genes de esfingomielinasas de *L. boneti*, *L. reclusa* y *L. laeta* en los vectores pQE30 y pQE60.

Una vez que se obtuvieron los genes completos de las esfingomielinasas de las tres especies *Loxosceles*, se decidió clonarlos en los vectores de expresión pQE30 y pQE60. La ventaja de éstos es que agregan solamente 12 residuos más a la proteína recombinante en contraste con el vector pTrcHIS-TOPO que agregaba 35 aminoácidos .

El vector pQE30 adiciona una etiqueta de seis histidinas en el extremo N-terminal de la proteína mientras que pQE60 agrega la etiqueta en el lado C-terminal. En la Figura 24 se esquematizan las construcciones del gen de esfingomielinasa en pQE30 y pQE60.

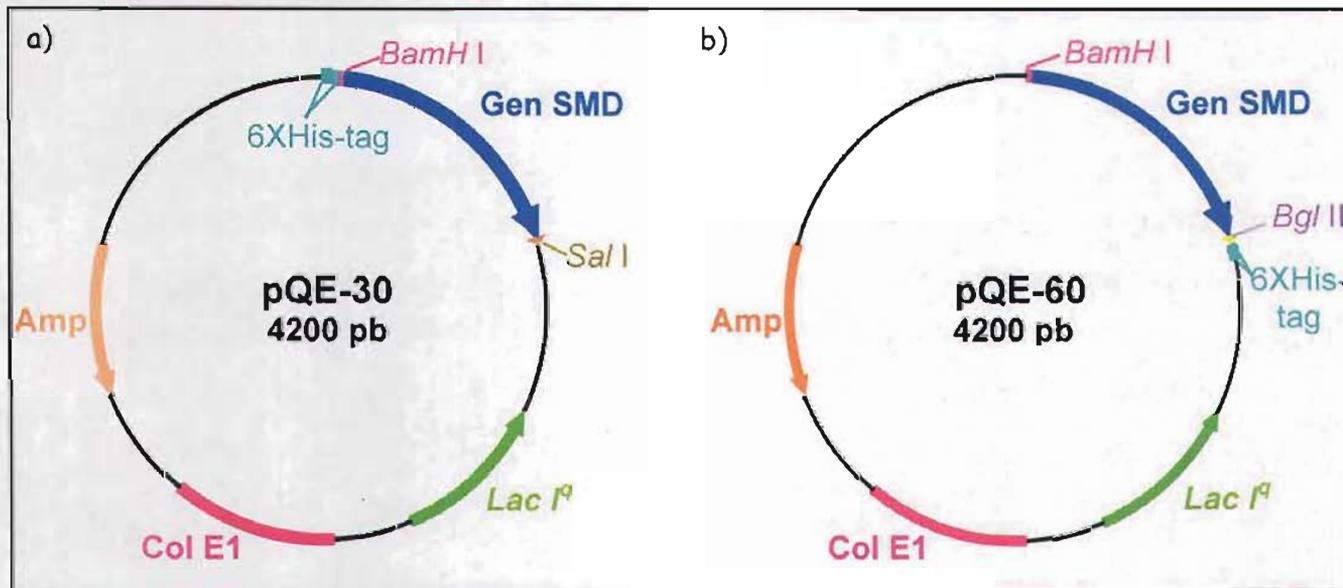


Figura 24. Construcciones en los vectores de expresión pQE30 y pQE60. a) El ADN codificante para esfingomielinasa D fue clonado entre los sitios *Bam*HI y *Sal*I de pQE30 para generar una SMDr con una etiqueta 6XHis en el N-terminal (His_{6x}-SMDr). b) Para expresar una proteína recombinante con una etiqueta 6XHis en el C-terminal (SMDr-His_{6x}), el ADN codificante para la esfingomielinasa D fue clonado en pQE60 entre los sitios *Bam*HI-*Bgl*II. Ambos vectores tienen un tamaño original de 3.4 kb, promotor T5 y un gen de resistencia a ampicilina.

Los genes *L. boneti* 1, *L. reclusa* 1 y *L. laeta* 1 se clonaron en el vector pQE30. *L. boneti* 1 y *L. laeta* 2 se clonaron en el vector pQE60. En la Tabla 14 se enlistan las construcciones hechas con estos vectores.

Tabla 14. Listado de las construcciones en vectores de expresión que agregan una etiqueta de 6 histidinas en el N- o C-terminal de las proteínas.

Espece	Isoforma	Vector	His ₆ tag
<i>L. boneti</i>	1	pQE30	N-terminal
<i>L. boneti</i>	1	pQE60	C-terminal
<i>L. reclusa</i>	1	pQE30	N-terminal
<i>L. laeta</i>	1	pQE30	N-terminal
<i>L. laeta</i>	2	pQE60	C-terminal

VII.X. Expresión de las esfingomielinasas solubles (SMDr) en sistemas bacterianos.

Una vez clonados los genes de las esfingomielinasas en los vectores de expresión (pQE30 o pQE60), se obtuvieron proteínas recombinantes (Tabla 15) utilizando la cepa *E. coli* XLI-blue. Las transformantes se analizaron por restricción (*Bam*H I/*Sal* I o *Bam*H I/*Bgl* II), y se comprobó que los genes estaban en fase.

Estas clonas se sometieron a cinéticas de inducción y se encontró que las necrotoxinas recombinantes eran producidas, sin embargo el rendimiento de la proteína en forma soluble fue mínima. Por lo que se planteó usar la cepa *E. coli* BL21 (DE3), puesto que esta cepa se recomienda para la obtención de proteínas solubles (pET System Manual), y además como antecedente se sabía que Fernandes Pedrosa y col. en el 2002, expresaron en esta cepa una de las esfingomielinasas de *L. laeta* (H17) obteniéndola soluble.

Con el plásmido super enrrollado de las transformantes positivas *E. coli* XL1-blue se procedió a transformar células *E. coli* BL21 (DE3). Se realizó una cinética de inducción a diferentes tiempos con 1 mM IPTG a 37°C. Se observó que las proteínas recombinantes se producen en esta cepa (Figura 25).

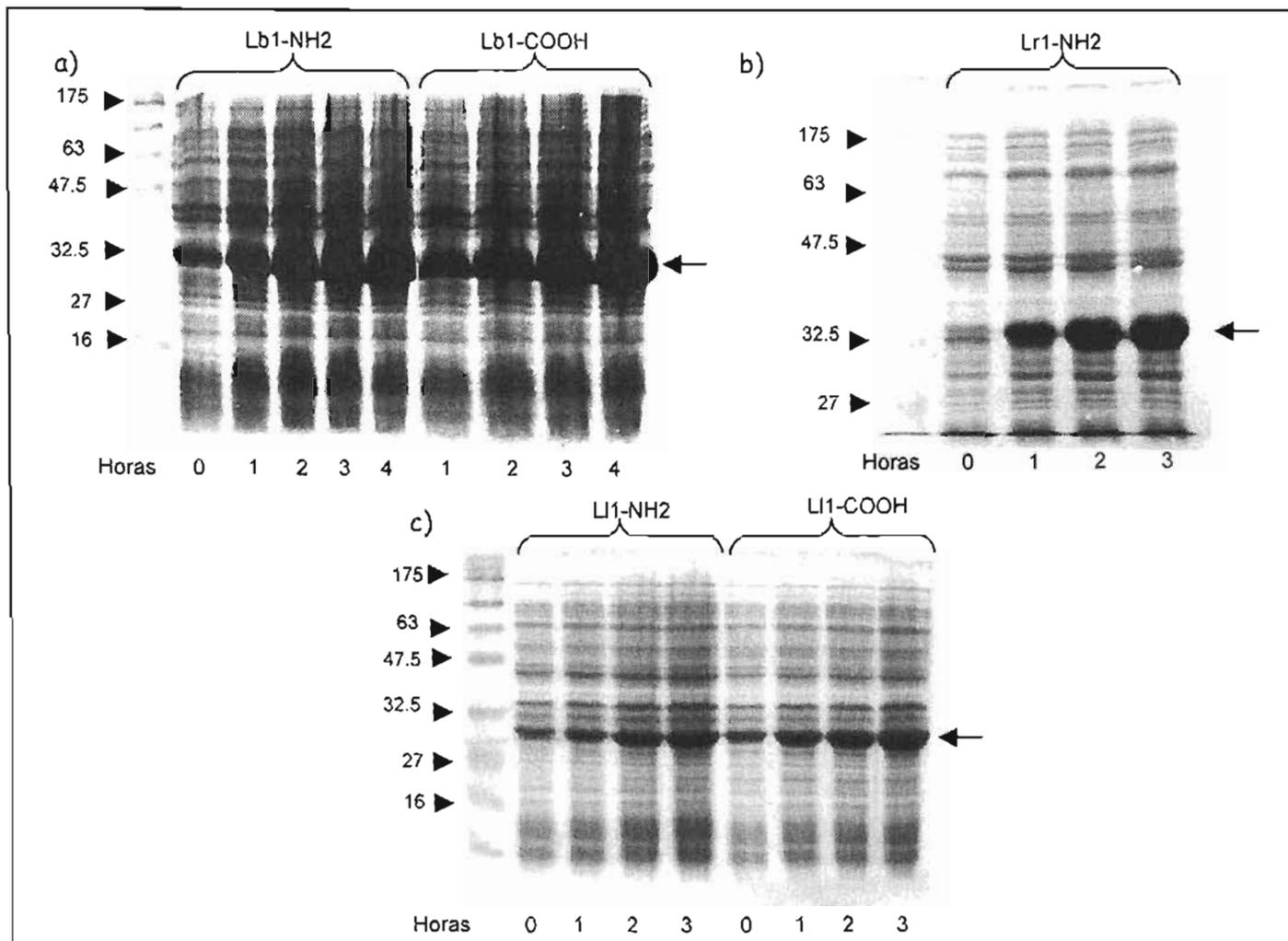


Figura 25. Cinéticas de inducción de las transformantes *E.coli* BL21 (DE3). En el panel a) Lb1-NH2 y Lb1-COOH. b) Lr1-NH2. c) LI1-NH2 y LI2-COOH. En el primer carril se muestran los MPM. La flecha del lado derecho indica la proteína recombinante expresada. Las cinéticas se llevaron a cabo con 1 mM IPTG, a 37°C, con agitación constante, partiendo de un crecimiento celular de 0.6 OD. El tiempo de duración fue de 0 a 3 horas.

Las proteínas recombinantes se produjeron en la cepa *E. coli* BL21 (DE3) (Tabla 15). Utilizando las mismas condiciones que las cinéticas de inducción se observó que los rendimientos eran muy bajos, por lo que se procedió a buscar las condiciones adecuadas para la obtención de la proteína soluble.

Se encontró que las condiciones óptimas de expresión fueron: 0.1 mM IPTG, a 22°C durante 12 horas, partiendo de un crecimiento celular de 0.6 OD.

Las proteínas fueron purificadas por afinidad a níquel (Ni-NTA) obteniendo un rendimiento de 2 a 3 mg por litro de cultivo. La pureza de éstas se evaluó por SDS-PAGE al 12.5 % en condiciones reductoras, encontrándose 90% puras (Figura 26). Las proteínas recombinantes se almacenaron a 4°C hasta su uso.

Tabla 15. Nomenclatura de las SMD recombinantes expresadas

Especie	Isoforma	His ₆ tag	Proteína
<i>L. boneti</i>	1	N-terminal	SMDrLb1-NH2
<i>L. boneti</i>	1	C-terminal	SMDrLb1-COOH
<i>L. reclusa</i>	1	N-terminal	SMDrLr1-NH2
<i>L. laeta</i>	1	N-terminal	SMDrLi1-NH2
<i>L. laeta</i>	2	C-terminal	SMDrLi2-COOH

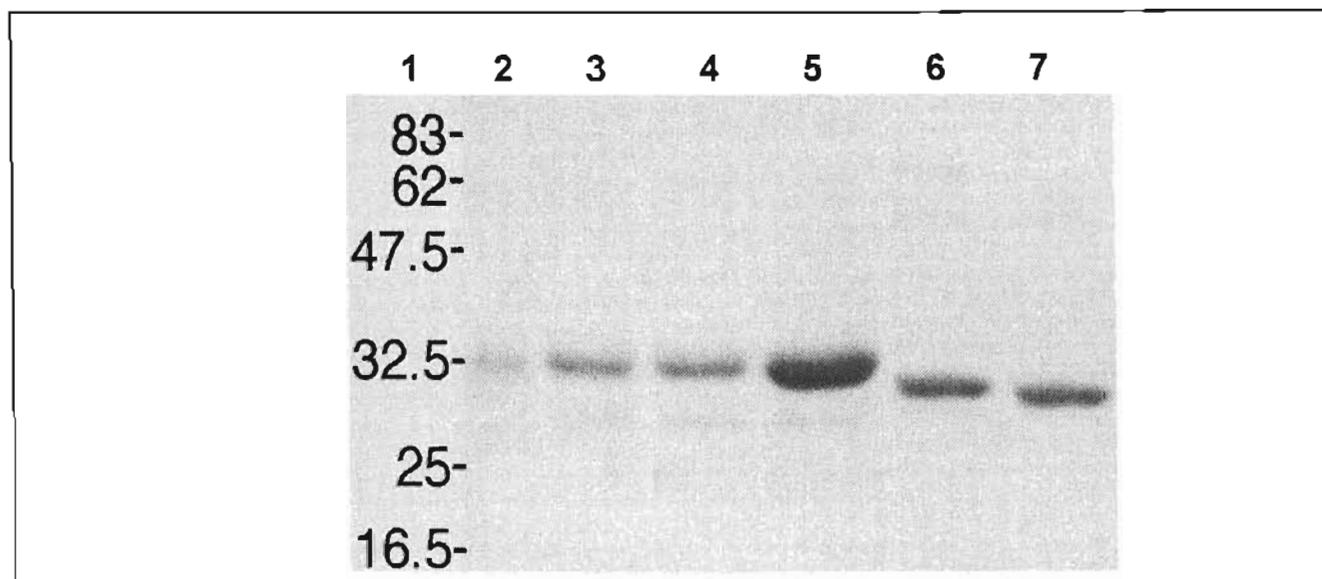


Figura 26. Análisis de pureza mediante SDS-PAGE de las proteínas recombinantes. 1) MPM. 2) FII *L. boneti* (4 µg). 3) SMDrLb1-NH2 (7 µg). 4) SMDrLb1-COOH (7 µg). 5) SMDrLr1-NH2 (30 µg). 6) SMDrLi1-NH2 (10 µg). 7) SMDrLi2-COOH (10 µg).

VII.XI. Medición y comparación de las actividades específicas de las esfingomielinasas recombinantes contra las nativas.

Las mediciones de las actividades enzimáticas se hicieron mediante el Amplex Red Sphingomyelinase Assay kit (Molecular Probes). Para estos ensayos se utilizaron diluciones seriadas desde 1 hasta 0.125 µg/ml y se tomaron lecturas a los 15 y 30 minutos.

Las proteínas recombinantes producidas resultaron ser activas, posteriormente se compararon las actividades específicas de éstas contra las nativas. Se encontró que las esfingomielinasas recombinantes de *L. boneti* y *L. reclusa* tienen actividades muy cercanas a las isoformas 1 nativas de las especies correspondientes (Tabla 16).

Para el caso de *L. boneti* la isoforma que presentó mayor actividad fue la 1, seguida de la isoforma 2 que tuvo un 31% de actividad con respecto a la 1 y finalmente la isoforma 3 no presentó actividad (Tabla 16).

Igualmente para el caso de *L. reclusa* la isoforma con mayor actividad fue la 1, subsecuentemente la 2 (56.4% de actividad con respecto a la 1) y aunque la isoforma 3 presentó actividad, esta resultó ser la más baja (Tabla 16).

Tabla 16. Actividades específicas de las esfingomielinasas nativas y recombinantes de *L. boneti* y *L. reclusa*.

<i>L. boneti</i>	U/mg	Desviación estándar	Coefficiente de variación (%)
Veneno	7.95	±1.67	21.02
Fracción necrotóxica (FII)	27.66	± 7.29	26.38
Isoforma 3 nativa	0	-	-
Isoforma 2 nativa	9.49	± 1.89	19.95
Isoforma 1 nativa	30.45	± 7.19	21.93
SMDrLb1-NH2	31.47	± 8.59	27.29
SMDrLb1-COOH	32.5	± 7.37	22.67
<i>L. reclusa</i>			
Veneno	9.05	±2.1	23.16
Fracción necrotóxica (FII)	15.98	± 5.87	36.71
Isoforma 3 nativa	4.59	-	-
Isoforma 2 nativa	11.47	± 0.21	1.82
Isoforma 1 nativa	20.33	± 6.88	33.83
SMDrLr1-NH2	18.29	± 3.79	20.72

Por otro lado se midieron las actividades específicas de las dos proteínas recombinantes de *L. laeta*, resultando que la SMDrLI2-COOH es 4 veces más activa que SMDrLI1-NH2 (Tabla 17).

Tabla 17. Actividades específicas de las esfingomielinasas recombinantes de *L. laeta* (SMDrLI1-NH2 y SMDrLI2-COOH).

Proteína recombinante	U/mg	Desviación estándar	Coefficiente de variación (%)
SMDrLI1-NH2	56.79	±9.92	17.47
SMDrLI2-COOH	228.21	± 58.67	25.71

VII.XII. Producción de anticuerpos en conejos contra las: SMDrLb1-NH2, SMDrLb1-COOH, SMDrLr1-NH2, SMDrLI1-NH2 y SMDrLI2-COOH.

Con las esfingomielinasas recombinantes activas, se inmunizaron a grupos de dos conejos, siguiendo un mismo esquema de inmunización para todas las proteínas recombinantes. La medición de anticuerpos en los sueros de los conejos se determinó mediante el método de ELISA. Se hicieron un total de cuatro sangrías y a la quinta todos los conejos se sangraron a blanco (Tabla 18). Los títulos se calcularon por el programa GraphPad Prism (Versión 2; GraphPad Software, Inc. San Diego, CA) y éstos se promediaron por grupo de conejos.

Tabla 18. Títulos de los sueros de los conejos inmunizados con las SMDr de *Loxosceles*.

Proteína recombinante	Conejo A	Conejo B	Promedio de títulos por grupo de conejos
SMDrLb1-NH2	36,100	49,500	42,800
SMDrLb1-COOH	31,600	115,400	73,500
SMDrLr1-NH2	87,700	114,100	100,900
SMDrLI1-NH2	27,700	48,800	38,250
SMDrLI2-COOH	34,500	59,600	47,050

Cabe señalar que la respuesta inmune de los conejos por grupo, fue muy uniforme, ya que los títulos de los sueros tuvieron valores similares, excepto el grupo inmunizado con SMDrLb1-COOH ya que el suero de uno de los conejos presentó títulos de 31,600 comparado con el suero del otro conejo que tuvo títulos de 115,400.

VII.XIII. Determinación de reacciones cruzadas.

Para determinar las reacciones cruzadas de los sueros hiperinmunes generados a partir de SMDrLb1-NH₂ y SMDrLb1-COOH, se hicieron pruebas de ELISA. Los sueros de ambos conejos por grupo se mezclaron en proporción 1:1. Los resultados obtenidos mostraron reacciones cruzadas entre los sueros de los conejos, es decir el suero del grupo inmunizado con SMDrLb1-NH₂ reconoció a la proteína SMDrLb1-COOH y viceversa (Tabla 19).

Tabla 19. Reacciones cruzadas de los anticuerpos generados a partir de las proteínas SMDrLb1-NH₂ y SMDrLb1-COOH.

Sensibilización de la placa	Suero de conejo contra	Títulos
SMDrLb1-NH ₂	SMDrLb1-COOH	53,750
SMDrLb1-COOH	SMDrLb1-NH ₂	49,400

VII.XIV. Inhibición de la actividad enzimática de la SMDrLb1-NH₂ con el suero hiperinmune generado a partir de SMDrLb1-NH₂.

Con el suero de conejo hiperinmune anti-SMDrLb1-NH₂, se llevaron a cabo ensayos de inhibición de la actividad enzimática de la SMDrLb1-NH₂. Para medirlos se incubaron cantidades de suero con la proteína recombinante y posteriormente se agregó el sustrato. Como control se usó SMDrLb1-NH₂ sin suero. Los resultados confirmaron que el suero hiperinmune desde la dilución 1:1 hasta la 1:20, inhibe la actividad de esfingomielinasa de la SMDrLb1-NH₂ (Tabla 20).

Tabla 20. Actividad enzimática de SMDrLb1-NH2 inhibida por el suero de conejo hiperinmune generado a partir de SMDrLb1-NH2.

Proteína recombinante	Dilución del suero anti-SMDrLb1-NH2	Actividad específica (U/mg)	Desviación estándar	Coefficiente de variación (%)
SMDrLb1-NH2	1:1	0	-	-
SMDrLb1-NH2	1:5	0	-	-
SMDrLb1-NH2	1:20	0	-	-
SMDrLb1-NH2	1:100	11.16	± 5.67	16.55
SMDrLb1-NH2	-	41.08	± 5.47	13.31

VII.XV. Pruebas toxinológicas e inmunológicas en animales.

VII.XV.I. Dermonecrosis en conejos.

En esta prueba se evaluó si la SMDrLb1-COOH tenía capacidad de inducir necrosis cutánea. En el presente experimento se usó isoforma 1 nativa de *L. boneti* (Lb1) para comparar las áreas que se producían en uno y otro. También se inyectó la isoforma 3 nativa de la misma especie (Lb3). Como control negativo se usó solución PBS pH 7.4.

Se encontró que la SMDrLb1-COOH era capaz de inducir necrosis en piel de conejo comparable con la necrosis ocasionada por la Lb1. La Lb3, no fue capaz de producir necrosis en la piel del conejo, a pesar de que se inyectó mayor cantidad de ésta (10 veces más). Las zonas inyectadas con PBS no presentaron necrosis. En la siguiente foto se ilustra la necrosis en la piel del conejo causada por ambas proteínas.

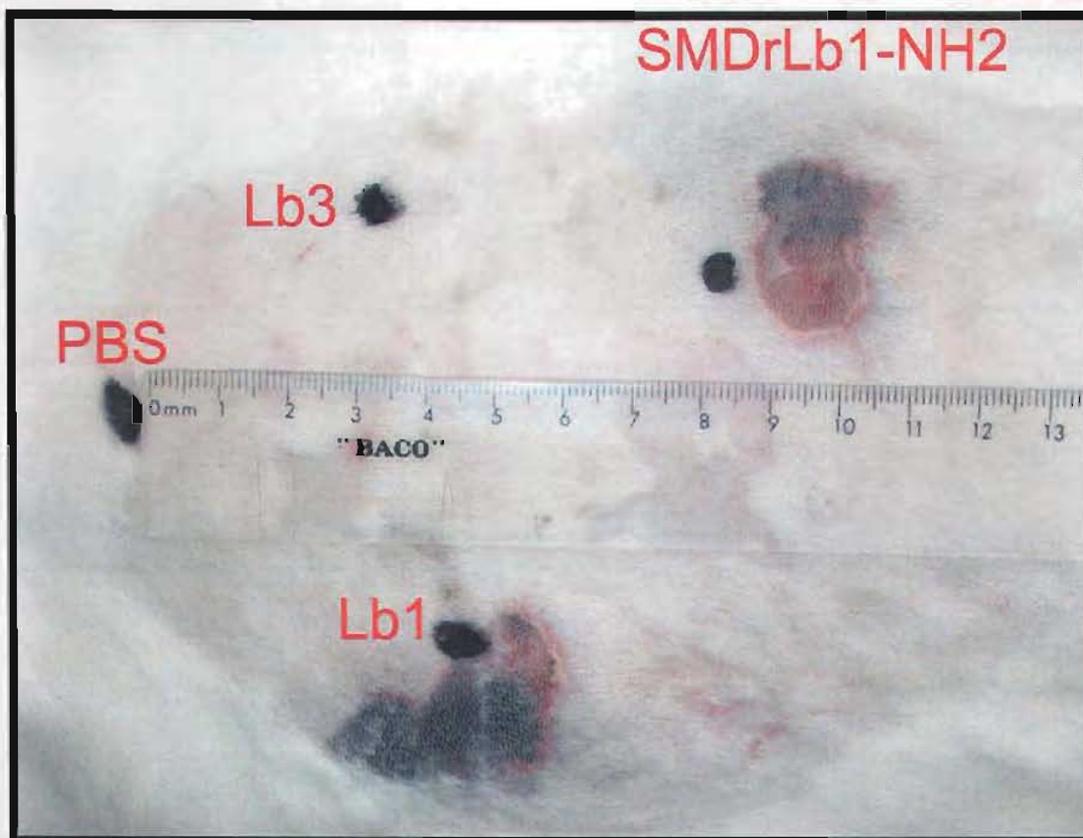


Figura 27. Foto que ilustra la necrosis en piel de conejo (New Zeland White, 2.7 kg). Las dosis administradas fueron 3 μ g de SMDrLb1-NH2, 3 μ g de Lb 1 (isoforma 1 nativa *L. boneti*) y 30 μ g de Lb3 (isoforma 3 nativa *L. boneti*) en 300 μ l de PBS pH 7.4. Como control negativo se inyectaron 300 μ l de PBS pH 7.4. La foto fue tomada 72 horas post-inyección.

VII.XV.II. Determinación de la dosis letal media de las proteínas recombinantes y veneno de *Loxosceles*, en ratones balb-c.

Se determinó la dosis letal media (DL50) de las proteínas recombinantes de *L. boneti*, *L. reclusa* y *L. laeta*, así como del veneno nativo de *L. boneti* y *L. reclusa*. La DL50 está definida como la cantidad de toxina que es capaz de matar a la mitad de una población. Las pruebas se hicieron retando con distintas cantidades de toxina a grupos de cuatro ratones balb-c, entre 18-20 g de peso. 72 horas post-inyección, se tomaron lecturas y se determinó la DL50, utilizando el programa GraphPad Prism (Versión 2; GraphPad Software, Inc. San Diego, CA). En la siguiente Tabla se resumen las DL50 de cada proteína.

Tabla 21. Dosis letal media de las proteínas recombinantes y venenos de *Loxosceles*

Proteína	DL50 (µg/ratón)	Intervalo de confianza
SMDrLb1-NH2	5.0	4.96 – 5.04
SMDrLb1-COOH	4.0	3.83 - 4.20
SMDrLr1-NH2	3.5	3.48 - 3.52
SMDrLI1-NH2	11.3	11.16 – 11.43
SMDrLI2-COOH	2.37	2.36 – 2.38
Veneno <i>L. boneti</i>	30.5	23.80 - 39.14
Veneno <i>L. reclusa</i>	21.0	20.0-22.0

VII.XV.III. Determinación de la dosis efectiva media (DE50) de los sueros anti-SMDr, en ratones balb-c.

Se hicieron ensayos de neutralización (inmunidad pasiva) con los sueros hiperinmunes de conejo contra las toxinas recombinantes (anti-SMDrLb1-NH2, anti-SMDrLb1-COOH, anti-SMDrLr1-NH2, anti-SMDrLI1-NH2 y anti-SMDrLI2-COOH). Se incubaron distintas cantidades de suero con su respectiva toxina homóloga, a 37°C durante 30 minutos, y se inyectaron intraperitonealmente a grupos de cuatro o cinco ratones balb-c entre 18-20 g. Se observó que en todos los ratones controles la sintomatología fue la misma: pelos erizados, dolor abdominal, y dificultad para respirar. 72 horas post-inyección se tomaron las lecturas de sobrevida, y se determinó la DE50 de los sueros utilizando el programa GraphPad Prism (Versión 2; GraphPad Software, Inc. San Diego, CA) (Tabla 22).

Tabla 22. Dosis efectiva media de los sueros generados a partir de las proteínas recombinantes de *Loxosceles*.

Toxina (tx)	µg de toxina inyectados por ratón	DE50 (µl de anti-suero por ratón)	Intervalo de confianza	Cantidad de veneno (µg) que neutraliza 1 ml de suero
SMDrLb1-NH2	8.0	155.0*	148.0 - 161.4	50.5
SMDrLb1-COOH	15.5	259.0*	257.7 - 259.6	60
SMDrLr1-NH2	12	212.2*	211.8 - 212.6	56.5
SMDrLI1-NH2	20	300.0*	297.8 - 302.2	66.5
SMDrLI2-COOH	7.0	204.4*	203.8 - 204.9	35

*Los resultados corresponden a los anti-sueros homólogos para cada uno de los casos.

Por otro lado se llevaron a cabo ensayos de neutralización cruzada. Siguiendo el mismo procedimiento, se incubaron distintas cantidades de sueros con cantidades constantes de toxinas heterólogas, de tal manera que se hicieron varias combinaciones

Se observó que los sueros hiperinmunes anti-SMDrLb1-NH2 y anti-SDrLb1-COOH presentan neutralizaciones cruzadas con las proteínas recombinantes de *L. boneti* y *L. reclusa* (Tabla 23).

Igualmente, el suero anti-SMDrLr1-NH2 fue capaz de neutralizar el efecto de las toxinas recombinantes de *L. boneti* (Tabla 23).

Tabla 23. Neutralizaciones cruzadas de las toxinas recombinantes de *L. boneti* y *L. reclusa* con los sueros hiperinmunes generados a partir de estas proteínas.

Anti-suero

	SMDrLb1-NH2	SMDrLb1-COOH	SMDrLr1-NH2
SMDrLb1-NH2	50.5*	46*	44.5*
SMDrLb1-COOH	65.5*	60*	56.6*
SMDrLr1-NH2	> 60**	107*	56.5*

* La cantidad está expresada como: µg de toxina/ml de anti-suero.

** No se pudo determinar la DE50 del anti-SMDrLb1-NH2 contra la toxina SMDrLr1-NH2, pero se observó que con 200 µl de dicho anti-suero, sobrevive toda la población retada con 12 µg de SMDrLr1NH2.

En cursivas: Neutralizaciones homólogas

Por otro lado, los sueros hiperinmunes contra las toxinas recombinantes de

L. laeta presentaron neutralización cruzada, ya que 1 ml de suero anti-SMDrLI1-NH2 fue capaz de neutralizar 25 µg de SMDrLI2-COOH (Tabla 24). Un caso similar se presenta con el anti-suero SMDrLI2-COOH ya que neutraliza el efecto letal de la toxina SMDrLI1-NH2 aunque pobremente (Tabla 24).

En las neutralizaciones cruzadas de los anti-sueros *L. laeta* se observó menor eficacia que en las neutralizaciones homólogas de la misma especie (Tabla 24).

Tabla 24. Neutralizaciones cruzadas de las toxinas recombinantes de *L. laeta* con los sueros hiperinmunes generados a partir de estas proteínas.

		Anti-suero	
		SMDrLI1-NH2	SMDrLI2-COOH
Toxinas	SMDrLI1-NH2	66.5*	25% de sobrevida con 500 µl
	SMDrLI2-COOH	25*	35*

* La cantidad está expresada como µg de toxina/ ml de anti-suero.

En cursivas: Neutralizaciones homólogas

Por otra parte, las toxinas recombinantes tanto de *L. boneti* como de *L. reclusa* no fueron neutralizadas por los sueros anti-*L. laeta*, así mismo el suero hiperinmune anti-SMDrLb1-COOH no protegió contra las toxinas recombinantes de *L. laeta* (Tabla 25). Esto puede explicarse por lo observado a nivel de secuencia primaria, ya que las toxinas de *L. laeta* tienen características particulares que no presentan las toxinas de *L. boneti* y *L. reclusa*, y que probablemente estas diferencias repercutan en las conformaciones estructurales de las proteínas, de tal manera que los anticuerpos generados a partir de las toxinas de *L. laeta* no reconozcan a los epítomos neutralizantes de *L. boneti* o *L. reclusa* y viceversa.

Tabla 25. Ensayos de neutralización cruzada entre los sueros hiperinmunes anti-*L. laeta*

contra las toxinas recombinantes de *L. boneti* y *L. reclusa* y entre el suero anti-SMDrLb1-COOH contra las toxinas recombinantes de *L. laeta*.

Anti-sueros	Toxinas recombinantes	Neutralización
SMDrLI1-NH2	SMDrLb1-COOH ó SMDrLr1-NH2	Negativo hasta 500 µl de anti-suero
SMDrLI2-COOH	SMDrLb1-COOH ó SMDrLr1-NH2	Negativo hasta 500 µl de anti-suero
SMDrLb1-COOH	SMDrLI1-NH2 ó SMDrLI2-COOH	Negativo hasta 500 µl de anti-suero

Otro ensayo que se llevó a cabo fue neutralizar el efecto de los venenos de *L. boneti* y de *L. reclusa* con los sueros generados a partir de las SMDrLb1-NH2 y SMDrLb1-COOH respectivamente, observándose que éstos fueron eficaces en la protección de ambos venenos (Tabla 26). El mismo caso se presentó con el suero anti-SMDrLr1-NH2, ya que neutralizó muy bien los efectos de los venenos de *L. reclusa* y *L. boneti* (Tabla 26).

Tabla 26. DE50 de los sueros generados a partir de las proteínas recombinantes de *L. boneti* y *L. reclusa* contra los venenos de ambas especies.

Anti-sueros (αS)	Veneno (ven)	µg ven/ml αS
SMDrLb1-NH2	<i>L. boneti</i>	123
SMDrLb1-COOH	<i>L. reclusa</i>	73
SMDrLr1-NH2	<i>L. reclusa</i>	141.3
SMDrLr1-NH2	<i>L. boneti</i>	128.8

VIII. DISCUSIÓN

El envenenamiento por arañas del género *Loxosceles* causa necrosis local y daños sistémicos. Los componentes que causan el loxoscelismo son una familia de proteínas con actividad de esfingomielinasa D.

VIII.I Caracterización bioquímica del veneno de *L. boneti* y *L. reclusa*.

Los venenos tanto de *L. boneti* como de *L. reclusa*, se fraccionaron por cromatografía de exclusión molecular en gel demostrando que la fracción II contenía a las necrotoxinas (32.5 kDa). Los otros componentes fraccionados: hemocianina (FI), péptidos (FIII) y ácidos nucleicos (FIV), no son propios del veneno y tampoco participan en el actividad dermonecrótica. Esto se sustenta en que en estudios anteriores (Ramos, 2002) se pudo ver que la FII producía lesiones necróticas en piel de conejo.

Las fracciones necrotóxicas de ambas especies se sometieron a cromatografías de intercambio catiónico.

La FII de *L. boneti*, se resolvió en tres picos principales, las cuales se nombraron isoformas 1, 2 y 3 de acuerdo al orden de la elución. Se analizaron por SDS-PAGE bajo condiciones reductoras y no reductoras. Si bien su movilidad electroforética relativa cambió en uno y otro caso, los resultados mostraron fracciones homogéneas distinguibles entre sí. Las isoformas 1 y 2 presentaron actividad de esfingomielinasa D contrariamente a la 3 que se encontró inactiva. La isoforma 1 presentó una actividad específica de 30.45 U/mg y la 2 solamente presentó un 31% de actividad (9.49 U/mg) con respecto a la 1.

En la FII de *L. reclusa*, se encontraron tres picos: dos principales (1 y 3) y uno poco resolutivo (2). Por SDS-PAGE, los picos 1 y 3 resultaron ser proteínas únicas las cuales fueron llamadas isoformas 1 y 3, respectivamente. El pico 2 fue resuelto en un par de proteínas.

Todas las fracciones presentaron actividad enzimática. La mayor actividad específica encontrada correspondió a la isoforma 1 (20.3 U/mg), seguida por el pico 2 (11.47 U/mg) y finalmente la isoforma 3 que presentó la menor actividad específica (4.59 U/mg).

La actividad observada en el pico 2 puede corresponder a la combinación de dos isoformas, una que pudiera tener una actividad más alta que la otra, y los resultados observados sean la adición de ambas actividades o que alternativamente, una de ellas fuera lo suficientemente activa para presentar un 56.5% de actividad con respecto a la isoforma 1. Otra posibilidad pudo ser que el pico 2 corresponda a una mezcla en partes iguales de la isoforma 1 y la 3, y la actividad enzimática observada sea el equivalente al promedio de ambas actividades.

VIII.II Análisis de las secuencias de las SMD de *Loxosceles*.

A partir del ARNm de las glándulas venenosas de las tres especies de *Loxosceles*, se obtuvo el ADNc con el fin de amplificar las secuencias codificantes de las esfingomielinasas D. Se amplificaron fragmentos correspondientes al gen que codifica a la proteína madura, que carecían del extremo N-terminal. Dicha región se trató de amplificar con la técnica 5'RACE usando oligonucleótidos degenerados, sin embargo no se pudo amplificar (datos no presentados). Esto pudo deberse a que en el extremo 5' posiblemente se forman estructuras secundarias que propicien que el ARNm sea lábil o inestable, o que alternativamente durante la transcripción el ARNm se haya degradado (Ramos-Cerrillo, *et al.*, 2004). En ninguna de las secuencias se encontró el inicio de la traducción, probablemente por la elongación incompleta de la reverso transcriptasa durante la síntesis del ADNc. Por tanto las secuencias encontradas para *L. boneti* y *L. reclusa* son codificantes para las esfingomielinasas D maduras (275 aminoácidos) y éstas carecían de los primeros cuatro aminoácidos.

Tras un análisis de comparación entre todas las secuencias de esfingomielinasas de *Loxosceles*, las más divergentes fueron las de *L. laeta*. Una de las características distintivas de éstas secuencias es el número y posición de las cisteínas, ya que solamente cuenta con dos. Posiblemente estas cisteínas forman un puente disulfuro que propicia una conformación distinta de la proteína con respecto a cualquier otra esfingomielinasa de *Loxosceles* hasta ahora reportada.

Se obtuvieron dos secuencias distintas de *L. laeta* (SMDrLI1-NH2 y SMDrLI2-COOH) que comparten 82% de identidad. Los análisis de comparación entre las secuencias *L. laeta* (Perú) con las secuencias de *L. laeta* brasileñas, confirmaron que la SMDrLI1-NH2 era prácticamente idéntica a la esfingomielinasa H17, ya que en toda la secuencia se presentaron cuatro cambios, siendo importante uno de ellos en la

posición 253, donde cambia una tirosina por una histidina. La aseveración anterior esta basada en las probabilidades de mutación entre un aminoácido y otro (Schulz, *et al.*, 1979), ya que éste cambio es poco probable que se lleve a cabo (0.0004%).

La SMDrLI2-COOH presentó un 94% de identidad con la proteína H13 brasileña teniendo 18 cambios a lo largo de toda la secuencia. La mayor parte de estas variaciones (14) son importantes debido a que cambian aminoácidos hidrofílicos por hidrofóbicos, lo cual altera las propiedades fisicoquímicas de las proteínas. Las diferencias encontradas entre las mismas especies, pero de zonas geográficas distintas, se puede deber a variaciones alélicas o a la existencia de genes que codifican para otras isoformas de esfingomielinasas.

VIII.III Generación de proteínas recombinantes.

Se contaba con la secuencia parcial de la isoforma 1 de *L. boneti*. A ésta le hacían falta los primeros cuatro aminoácidos en el extremo N-terminal. Este gen se clonó en un vector de expresión que adiciona 35 aminoácidos a la proteína recombinante, la cual se obtuvo precipitada posiblemente por el número de residuos adicionales que pudieran ser los responsables del mal plegamiento de la misma. No obstante con los antecedentes que se tenían con *L. intermedia* (Kalaphotakis, *et al.*, 2002) donde la proteína insoluble fue inmunogénica en conejos y los anticuerpos producidos fueron capaces de reconocer tanto al veneno como a la fracción necrotóxica, se inmunizaron conejos con la proteína recombinante precipitada. Los anticuerpos generados en los conejos tenían capacidad de reconocimiento a su homólogo, no así a la FII de *L. boneti*. Por lo que se decidió desnaturalizarla con agentes caotrópicos y reductores encontrando que efectivamente los anticuerpos estaban reconociendo a epítopos lineales y no conformacionales, lo cual no era suficiente para neutralizar los efectos del veneno confirmado por las pruebas de inmunidad pasiva en ratones. Los anticuerpos estaban manifestando una notable especificidad, la cual era capaz de reconocer pequeñas diferencias en la configuración y en la conformación estérica de los antígenos y por tanto, las consecuencias de ésta especificidad es que los anticuerpos se unen solamente a antígenos o fragmentos que conserven su conformación nativa.

En cuanto a la inmunidad activa probada en conejos se obtuvo que los animales anteriormente inmunizados con la proteína precipitada, desarrollaron una necrosis

mayor a los controles. Probablemente lo que desarrollaron estos conejos fue una sensibilidad tipo Arthus, que se da cuando un individuo ha estado expuesto constantemente a un antígeno. La reacción se lleva a cabo cuando se forman inmunocomplejos antígeno-anticuerpo, los cuales se depositan en la pared de los vasos sanguíneos ocasionando una infiltración de neutrófilos y agregación plaquetaria lo que provoca oclusiones vasculares y necrosis.

Con todos estos resultados se pudo concluir que era necesario producir un antígeno recombinante soluble que tuviera una conformación similar al del nativo, ya que los anticuerpos reconocen no solamente a la secuencia sino a la conformación global del antígeno.

VIII.IV Plegamiento *in vitro* de la proteína recombinante precipitada de *L. boneti*.

La proteína precipitada se plegó *in vitro* en presencia de agentes oxidantes y reductores. Se obtuvo 60% de proteína soluble. La proteína tenía 35 aminoácidos no propios de ella, que probablemente interferían en el plegamiento, por lo que se digirió con enterocinasa para eliminar 31 residuos. Un indicador de que la proteína tuviera un plegamiento parecido o similar al de la nativa, era la actividad de esfingomielinasa D. La proteína plegada presentó un 9.6% de actividad enzimática con respecto a la nativa. Esto sugería que podría ser un buen inmunógeno que generará anticuerpos neutralizantes ya que, probablemente, una porción de la proteína estaba plegada correctamente y tal vez esta porción era suficiente para obtener anticuerpos neutralizantes. Por otro lado se sabe que la interacción antígeno-anticuerpo no implica un acoplamiento perfecto, sino entre los dos existe una flexibilidad complementaria, por lo que el generar un anticuerpo, a partir de una proteína que tuviera una conformación similar a la nativa, podía propiciar el reconocimiento hacia ésta.

Sin embargo cuando se titularon los anticuerpos generados a partir de la proteína plegada, se encontró que éstos reconocían a su homólogo, no así a la FII de *L. boneti*. Probablemente lo que ocurrió fue que, aunque la proteína se solubilizó, ésta no tenía una configuración parecida a la nativa, en consecuencia los anticuerpos generados no fueron capaces de reconocer a la FII de *L. boneti*.

Tras un análisis de todos estos resultados, se concluyó que para obtener un antígeno que fuera capaz de producir anticuerpos neutralizantes, era necesario generar una proteína recombinante con una configuración igual o muy parecida a la de la proteína

nativa, ya que los epítomos neutralizantes estaban dados por la estructura terciaria de ésta. El plegamiento correcto de la proteína recombinante era necesario que se diera de forma natural, es decir, durante la expresión ya que por los resultados anteriores, era poco probable que el plegamiento *in vitro* promoviera una configuración parecida a la de la proteína nativa.

VIII.V. Producción de proteínas solubles y activas.

Los factores que se consideraron para obtener a una proteína recombinante en forma soluble y activa fueron:

VIII.V.I. La secuencia de las proteínas recombinantes de las isoformas 1 de *L. boneti* y *L. reclusa* carecían de los primeros 4 aminoácidos del extremo N-terminal. Como era sabido que los anticuerpos son capaces de detectar pequeñas diferencias en la secuencia primaria, se decidió completar la secuencia. Por otro lado se pensó que estos residuos podían conformar un epítomo fundamental para el reconocimiento del anticuerpo.

VIII.V.II. Como ya se había mencionado el vector en el que estaba la proteína adicionaba 35 aminoácidos, que probablemente le impedían plegarse de manera correcta y similar a la proteína nativa, por lo que se decidió cambiar a los vectores pQE30 o pQE60, ya que estos solamente agregan 12 aminoácidos a la proteína recombinante que corresponden a la etiqueta de 6 histidinas, para la recuperación de la proteína por cromatografía de afinidad, la metionina como inicio de la traducción, tres residuos propios del vector y dos residuos que agregan los sitios de restricción.

VIII.V.III. Es sabido (pET Manual system), que algunas cepas de *E. coli* pueden favorecer el plegamiento adecuado de algunas proteínas recombinantes, además esta cepa carece de las proteasas: Omp T y Lon. La primera es una proteasa de membrana localizada en la monocapa externa que puede romper la T7 RNA polimerasa. La carencia de ésta evita complicaciones en la transcripción. La segunda es una enzima que se encuentra en el citoplasma de *E. coli* que se ha asociado a degradación de proteínas recombinantes

expresadas en este sistema. Por otro lado se había reportado la expresión exitosa de la proteína recombinante correspondiente a una esfingomielinasa D de *L. laeta* en *E. coli* BL21 (DE3) (Fernandes Pedrosa, *et. al.* 2002), por lo que la proteínas se expresaron en esta cepa, obteniéndolas solubles y activas.

Las SMDrLb1-NH₂, SMDrLb2-COOH, SMDrLr1-NH₂, SMDrLI1-NH₂ y SMDrLI2-COOH, se obtuvieron puras en un 90% y el resto corresponde a proteínas de bajo peso molecular propias de la bacteria.

El peso molecular de las recombinantes de *L. boneti* y *L. reclusa* correspondió al teórico (32.0-33.0 kDa), es decir, la movilidad electroforética se afectó por los aminoácidos que se adicionaron en la construcción del gen. Para el caso de las dos isoformas de *L. laeta*, el peso molecular encontrando (30.0-31.0 kDa), no correspondió al teórico (33.3 kDa para SMDrLI1-NH₂ y 33.9 kDa para SMDrLI2-COOH). Para confirmar la ausencia de modificaciones o mutaciones introducidas durante la clonación, los fragmento SMDrLI1-NH₂ y SMDrLI2-COOH clonados en el vector de expression, fueron re-secuenciados en ambos sentidos, asegurándose de cubrir los sitios de clonación. Se encontró que el ADN codificante de las proteínas recombinantes no presentaban ninguna modificación y además las recombinantes se expresaban completas en la bacteria.

Por otro lado se planteó que la proteínas recombinantes estaban sufriendo un procesamiento proteolítico durante la expresión. Con la etiqueta de histidinas en el extremo N- o C-terminal que tienen dichas proteínas, se pudo descartar esta posibilidad, ya que de haberse presentado la proteólisis durante la expresión, alguna de las 2 proteínas no se hubiera podido purificar por afinidad. Todas estas evidencias apuntan a que las proteínas recombinantes de *L. laeta* forman cierto tipo de estructuras que promueve un corrimiento aberrante durante la electroforesis en gel. Una de las alternativas que se plantea, es someterlas a espectrometría de masas para determinar su masa molecular exacta.

En cuanto a las actividades específicas de las proteínas recombinantes de *L. boneti* y *L. reclusa* resultaron comparables con las actividades de sus isoformas nativas correspondientes. Esto presume que la estructura terciaria de las proteínas recombinantes es muy similar al de las nativas.

La SMDrLb1-NH2 indujo necrosis en piel de conejo comparable con el daño causado por la isoforma 1 nativa de *L. boneti*. De acuerdo a los resultados anteriores donde la proteína precipitada no tenía actividad enzimática y además no era capaz de necrosar, se pudo evidenciar que la actividad de esfingomielinasa D es necesaria y suficiente para desencadenar el proceso necrótico.

Por otro lado, comparando las actividades específicas de las proteínas recombinantes se observó que las más elevadas fueron las de *L. laeta*. Esto podría explicarse por lo hallado a nivel de estructura primaria ya que las secuencias de *L. laeta* resultaron ser las más divergentes. Como ya se ha mencionado, el hecho de que tengan características particulares (presencia de dos cisteínas y la inserción de algunos aminoácidos) sugiere que las conformaciones de éstas sean distintas a cualquier esfingomielinasa D encontrada en el género *Loxosceles* y la consecuencia, por estas diferencias estructurales, pudiera ser el mejoramiento en la eficiencia catalítica.

La SMDrLI2-COOH tiene una actividad mayor que la SMDrLI1-NH2, por lo tanto, se presume que debido a su elevada actividad enzimática está involucrada de manera directa en el loxoscelismo causado por la especie *L. laeta*.

VIII.VI. Producción de anticuerpos neutralizantes y pruebas de neutralización.

Las proteína recombinantes de *L. boneti*, *L. reclusa* y *L. laeta* fueron inmunogénicas en conejos. Mediante la medición de títulos por ELISA se pudo evaluar la presencia de anticuerpos contra las toxinas recombinantes. Uno de los conejos inmunizados con la SMDrLb1-COOH presentó títulos muy altos, lo cual puede atribuirse a la inmunología propia del individuo.

Se determinó que las proteínas recombinantes generadas eran capaces de matar ratones balb-c entre 18-20g, observándose variaciones entre las DL50s de cada toxina recombinante; sin embargo, no se pudo establecer una correlación entre las actividades específicas y el efecto letal. Un ejemplo de ello es que la SMDrLI1-NH2 tiene una actividad específica de 56.8 U/mg, correspondiente a una de las más altas, y su DL50 es de 11.3 µg de toxina por ratón, en contraste con la SMDrLr1-NH2 que

presenta una actividad específica de 18.3 U/mg y su DL50 es de 3.5 µg/ ratón. En otras palabras, se necesita menor cantidad de toxina de *L. reclusa* para matar al 50% de la población de ratones aún cuando ésta tenga menor actividad específica comparada con la SMDrLI1-NH2.

El efecto tóxico de las toxinas recombinantes en ratones balb-c es similar al provocado por el veneno de *Loxosceles*, lo cual indicaba de alguna manera que los sueros hiperinmunes generados a partir de dichas toxinas protegerían no solamente contra los efectos de las proteínas recombinantes sino también contra el veneno de *Loxosceles*. Para esto se hicieron pruebas de neutralización en ratones Balb-c (18-20g), encontrando que los sueros hiperinmunes generados a partir de las proteínas recombinantes eran capaces de proteger *in vivo* contra el efecto tóxico de sus proteínas homólogas. Otro de los intereses principales de este trabajo fue saber si se presentaban neutralizaciones cruzadas, para poder generar un antiveneno polivalente. Los sueros anti-SMDrLb1-NH2, anti-SMDrLb1-COOH y anti-SMDrLr1-NH2 presentaron neutralizaciones cruzadas con las toxinas recombinantes de *L. boneti* y *L. reclusa*. La cantidad de toxina que es capaz de neutralizar 1 ml de cada antiveneno oscila entre 40-70 µg, lo cual hace evidente que estos anti-sueros tienen una alta capacidad neutralizante tanto homóloga como heteróloga lo cual confirmaba que aunque se presentan pequeñas diferencias en la secuencia primaria entre las tres toxinas, el reconocimiento del anticuerpo hacia el antígeno no es afectado por éstas.

Sí se inmuniza a un animal con cualquiera de estas proteínas recombinantes (SMDrLb1-NH2, SMDrLb1-COOH y SMDrLr1-NH2), hay una alta probabilidad de que los anticuerpos generados protejan contra las tres toxinas. El valor calculado para el anti-SMDrLb1-COOH contra la toxina SMDrLr1-NH2 es muy alto (107 µg tx/ml anti-suero), incluso que contra su toxina homóloga (60 µg tx/ml αS). Esto pudo deberse a las diferencias estructurales que se presentan entre las proteínas, de tal manera que la SMDrLr1-NH2 tenga una característica particular que favorezca el reconocimiento de los anticuerpos anti-SMDrLb1-COOH.

Para el caso de los anti-SMDrLI1-NH2 y anti-SMDrLI2-COOH también presentaron neutralizaciones cruzadas, pero con menor eficacia. Esto se puede explicar por las diferencias a nivel de estructura primaria ya que, como se mencionó anteriormente,

presentan 14 cambios importantes que probablemente repercuten directamente en la conformación proteica, de tal manera que los epítomos neutralizantes de una proteína no están presentes en la otra. Por tanto, a diferencia del caso anterior, es necesario que estén presentes los inmunógenos SMDrLI1-NH₂ y SMDrLI2-COOH, para la producción de un antiveneno que al menos neutralize el efecto tóxico causado por el veneno de la especie *L. laeta*.

No se presentaron neutralizaciones cruzadas entre las toxinas recombinantes de *L. boneti* y *L. reclusa* con los sueros anti-*L. laeta*, al igual que el suero anti-SMDrLb1-COOH no protegió contra los efectos letales de las toxinas SMDrLI1-NH₂ y SMDrLI2-COOH. Esto es una evidencia de que la etiqueta de seis histidinas de las proteínas recombinantes en el extremo amino o carboxilo terminal no forma un epítomo que reconozcan los anticuerpos, y que la especificidad de los anticuerpos está dada meramente por los epítomos estructurales propios de las toxinas. Un ejemplo de ello es que el suero anti-SMDrLr1-NH₂, no reconoce a la toxina SMDrLI1-NH₂, contrariamente a la SMDrLb1-NH₂ que no solamente es capaz de reconocer, sino también de neutralizar.

El ejemplo anterior también hace pensar que la etiqueta de histidinas no interviene estéricamente en el reconocimiento de los anticuerpos hacia el antígeno o, alternativamente, los epítomos neutralizantes no se encuentran en los extremos de la proteína.

Otro experimento muy importante que se llevó a cabo fue neutralizar los efectos del veneno nativo de *L. boneti* con el antisuero SMDrLb1-NH₂ encontrando que 1 ml de éste fue capaz de neutralizar 615 µg veneno. Éste valor es relativo debido a que en el veneno existen componentes distintos que no son responsables de causar necrosis. Mediante el fraccionamiento del veneno se pudo deducir que 20% de éste corresponde a las esfingomielinasas, por lo que el valor se reduce obteniendo que 1 ml de anti-suero SMDrLb1-NH₂ es capaz de neutralizar \approx 123 µg de fracción necrotóxica de *L. boneti*. El mismo caso se presenta con el suero anti-SMDrLr1-NH₂, el cual fue muy eficaz protegiendo contra los efectos letales de los venenos de *L. reclusa* y *L. boneti*.

IX. CONCLUSIONES

Se expresaron cinco proteínas recombinantes: SMDrLb1-NH₂, SMDrLb1-COOH, SMDrLr1-NH₂, SMDrLI1-NH₂ y SMDrLI2-COOH, correspondientes a algunas esfingomielinasas D de *L. boneti*, *L. reclusa* y *L. laeta*. Éstas se obtuvieron en forma soluble y además enzimáticamente activas. Se escalaron de manera muy eficiente obteniéndose un promedio de 28 mg/5 lt de cultivo con un 90% de pureza.

En cuanto a los estudios de protección se pudo concluir que se obtuvieron proteínas recombinantes, ideales para usarse como inmunógenos, ya que estas son capaces de generar anticuerpos que neutralizan los efectos del veneno nativo de *Loxosceles*. Para tener un antiveneno polivalente que neutralice el efecto del veneno del mayor número de especies, es necesario que en el esquema de inmunización estén contempladas las SMDrLI1-NH₂, SMDrLI2-COOH y cualquiera de las proteínas recombinantes de *L. boneti* o *L. reclusa*.

En todos los antígenos existen epítomos lineales y conformacionales. Los resultados generados en este trabajo confirman que éstos últimos son importantes para generar respuestas inmunológicas protectoras.

Finalmente, la generación de estas proteínas contribuirán a la estandarización en los procesos de producción de antivenenos y además baja los costos de obtención del material suficiente para poder realizar varios estudios que generarán conocimiento para dilucidar y entender los mecanismos por los cuales se desarrolla el loxoscelismo.

X. PERSPECTIVAS

X.I. Iniciar un estudio piloto de inmunización en caballos con estas proteínas recombinantes y comprobar si los anticuerpos producidos son capaces de neutralizar el efecto del veneno.

X.II. Hacer ensayos de inhibición de actividad enzimática *in vitro* y correlacionarlo con la inhibición de la necrosis.

X.III. Hacer un antiveneno polivalente con las tres proteínas generadas en este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- Alvarez del Toro, M. 1992. Arañas de Chiapas, Editado por la Univesidad Autónoma de Chiapas, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. 1^{era} edición, 297 p.
- Barbaro, K.C., Sousa, M.V., Morhy, L., Eickstedt, V.R.D., Mota, I. 1996a. Compared chemical properties of dermonecrotic and lethal toxins from Spiders of the Genus *Loxosceles* (Araneae). *Journal of Protein Chemistry* 15, 337-43.
- Barbaro, K.C., Ferreira, M.L., Cardoso, D.F., Eickstedt, V.R.D., Mota, I., 1996b. Identification and neutralization of biological activities in the venoms of *Loxosceles* spiders. *Brazilian Journal Medical and Biological Research* 29, 1491-97.
- Biagi, F. 1974. Enfermedades Parasitarias. México: Manual Moderno.
- Binford, G.J., Wells, M.A. 2003. The phylogenetic distribution of sphingomyelinase D activity in venoms of Haplogyne spiders. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 135B, 25-33.
- Boletín Semanal de Vigilancia Epidemiológica. Instituto Mexicano del Seguro Social. 2002, Vol II, Semana 52, del 22 al 28 de Diciembre del 2002. 28 p.
- Bujard, H., Gentz, R., Lanzer, M., Stüeber, D., Müller, C., Ibrahimi, I., Häeuptle, M-T., Dobberstein, B. 1987. A T5 promoter-based transcription-translation system for the analysis of proteins *in vitro* and *in vivo*. *Methods Enzimology* 155, 416-433.
- Cevallos, M.A., Navarro-Duque, C., Varela-Julia, M., Alagón, A. 1992. Molecular mass determination and assay of venom hyaluronidases by sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis. *Toxicon* 30, 925-30.
- Chomczynski, P., Sacchi, N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162, 156-59.
- de Oliveira, K.C., Goncalves de A. M., Giusti, A.L., da Silva W.D., Tambourgi, D.V. 1999. Sex linked variation of *Loxosceles intermedia* spider venoms. *Toxicon* 37, 217-21.
- de Roodt, A.R., Salomón, O.D., Lloveras, C.S. y Orduna, A.T. 2002. Envenenamiento por arañas del Género *Loxosceles*. Artículo Especial, *Medicina (Buenos Aires)* 62, 83-94.
- dos Santos, V.L.P., Franco, C.R.C., Viggiano, R.L.L., da Silveira, R.B., Cantao, M.P., Mangili, O.C., Veiga, S.S., Gremski, W. 2000. Structural and ultrastructural of the venom gland of *Loxosceles intermedia* (brown spider). *Toxicon* 38, 265-85.
- Feitosa, L., Gremski, W., Veiga, S.S., Elias, M.C.Q.B., Graner, E., Mangili, O.C., Brentani, R.R., 1998. Detection and characterization of metalloproteinases with gelatinolytic, fibronectinolytic and fibrigenolytic activities in brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. *Toxicon* 36, 1039-51.
- Fernandes-Pedrosa, M.F., Junqueira de Azevedo, I.L., Goncalves-de-Andrade, R.M., Van den Berg, C.W., Ramos, C.R., Ho, P.L., Tambourgi, D.V. 2002. Molecular cloning and expression of a functional dermonecrotic and haemolytic factor from *Loxosceles laeta* venom. *Biochemical Biophysical Research Communications* 298, 638-45.
- Foelix, R.F., 1996. *Biology of Spiders*. Oxford Thieme. USA. 330 p.

- Forman, M.A., Dush, M.K., Martín, G.R. 1998. Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA.* 85, 8998-9002.
- Furlanetto, R.S., Bucherl, W., Rosa, R.R., Saliba, F., Navas, J., 1962. Observacao dos efeitos do veneno loxoscélico e avaliacao de sua atividade. *Ciencia e Cultura* 14, 254.
- Gatt, S., Dinur, T., Barenhoñz, Y. 1978. A spectrophotometric method for determination of sphingomyelinase. *Biochimica et Biophysica Acta* 530, 503-07.
- Gerstch, W.J., Ennik, F. 1983. The spider Genus *Loxosceles* in North America, Central America and the West Indie (Araneae, Loxoscelidae). *Bulletin American Museum Natural History USA* 175, 264-360.
- Gomez, H.F., Miller, M.J., Waggener, M.W., Lankford, H.A., Warren, J.S. 2001. Antigenic cross-reactivity of venoms from medically important North American *Loxosceles* spiders species. *Toxicon* 39, 817-24.
- Gómez-Muñoz, A. 2004. Ceramide-1-phosphate: a novel regulator of cell activation. *FEBS Letters* 562, 5-10.
- Goncalves de Andrade, R.T., de Oliveira C.K., Giusti A.L., Dias da Silva W., Tambourgi, D.V. 1999. Ontogenic development of *Loxosceles intermedia* spider venom. *Toxicon* 37, 627-32.
- Gonzales-Juárez, C.A. 1997. Desarrollo de una prueba diagnóstica para la detección de hipotiroidismo congénito empleando anticuerpos monoclonales. Tesis de Maestría en Biotecnología, UACPyP-UNAM.
- Hoffmann, A. 1976. Relación bibliográfica de las arañas de México (Arachnida: Araneae). Instituto de Biología, UNAM. Publicaciones especiales. 3, 21-23.
- Hoffmann, A. 1997. El maravilloso mundo de los arácnidos. Fondo de Cultura Económica. Serie la ciencia para todos/116. México. 166 p.
- Kalapothakis E., Araujo, C.S., Soares de Castro, C., Melo, M.T., Gomez, M.V., Mangili, O.C., Gubert I.C., Chávez-Olórtegui, C. 2002. Molecular cloning, expression and immunological properties of LiD1, a protein from the dermonecrotic family of *Loxosceles intermedia* spider venom. *Toxicon* 40, 1691-99.
- Kurpiewski, G., Forrester, L.J., Barrett, J.T., Campbell, B.J. 1981. Platelet aggregation and sphingomyelinase D activity of a purified toxin from the venom of *Loxosceles reclusa*. *Biochimica et Biophysica Acta* 678, 467-76.
- Mathews, C., Holde, K. 1998. Bioquímica segunda edición, Editorial Mc-GrawHill Interamericana, España. 1238 p.
- Moye de Alba, C.E. Picaduras y mordeduras. En Aguilar C.S., Chevolve R.J., Saucedo J, Kaplan, S.M., Díaz A., Eraña, G.J., eds. 1997. *Manual de Terapeútica Médica y Procedimientos de Urgencias*. México: Mc Graw Hill- Interamericana; 2835 p.
- Morris, Q.H.J., Manrique, M.C., Díaz, A.R.T., Orama, C.D. 1999. Adyuvantes inmunológicos. Centros de Investigaciones de Energía Solar. Santiago, Cuba. *Revista Cubana de Investigación Biomédica* 18, 130-37.

Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-85.

pET System Manual. Novagen. 9th Edition. 2000. 11 p.

Pineda, D. 2002. Accidentes por animales venenosos. Instituto Nacional de Salud. Bogotá, Colombia. 194 p.

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

Preston-Mafham, R., Preston-Mafham, K., 1996. The Natural history of spiders. The Crowood Press. 160 p.

Ramos-Cerrillo, B., 2002. Comparación bioquímica inmunológica y toxicológica de los venenos de *L. boneti* y *L. reclusa*. Tesis de licenciatura en biología. Facultad de Ciencias, UNAM.

Ramos-Cerrillo, B., Olvera, A., Odell, G.V., Zamudio, F., Paniagua-Solís, J., Alagón, A., 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, 507-14.

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

Rash, L.D., Hodgson, W.C. 2002. Pharmacology and biochemistry of spider venoms. *Toxicon* 40, 225-54.

Rees, R.S., Nanney, L.B., Yates, R.A., King Jr, L.E. 1984. Interaction of brown recluse spider venom on cell membranes: the inciting mechanism? *Journal of Investigate Dermatology* 83, 270-75.

Roitt, I., Brostoff, J., Male, D. 2001. Inmunología. Harcourt. 423 p.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA.* 74, 5463-67.

Schulz, G.E., Schirmer, R.H. 1979. Principles of protein structure. Springer-Verlag New York Inc. U.S.A. 171-174 p.

Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas, SINITOX, dentro del Centro de Informacao Científica e Tecnológica, Brasil. Fundacao Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). <http://www.cict.fiocruz.br/intoxicacoeshumanas/index/htm>

Smith, P., Krohn, R., Hermanson, G., Garter, F., Provenzano, M., Fujimoto, E., Goeke, N., Olson, B., Klenk, D. 1985. Measurement of protein using Bincinchonnic Acid. *Analytical Biochemical* 150, 76-85.

Tambourgi, D.V., Magnoli, F.C., van den Berg, C.W., Morgan, B.P., de Araujo, P.S., Alves, E.W., Dias da Silva, W. 1998. Sphingomyelinases in the venom of the spider *Loxosceles intermedia* responsible for both dermonecrosis and complement-depent hemolysis. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 251, 366-73.

Tambourgi, D.V., Morgan, B.P., de Andrade R.M. 2000. *Loxosceles intermedia* spider venom induces activation of an endogenous metalloproteinase, resulting in cleavage of glicophorins from the erythrocyte surface and facilitating complement-mediated lysis. *Blood* 95, 683-91.

Tambourgi, D.V., Fernandes-Pedrosa, M.F., van den Berg, C.W., Goncalves de Andrade, R.T., Ferracini, M., Paixao-Cavalcante, D., Morgan, P.B., Rushmere, N.K. 2004. Molecular cloning, expression, function and immunoreactivities of members of a gene family of sphingomyelinases from *Loxosceles* venom glands. *Molecular Immunology* 41, 831-40.

van Meeteren, L.A., Frederiks, F., Giepmans, B.N.G., Fernandes-Pedrosa, M.F., Billington, S.J., Helen Jost, B., Tambourgi, D.V., Moolenaar, W.H. 2004. Spider and bacterial sphingomyelinases D target cellular lisophosphatidic acid receptors by hidrolizing lysophosphatidylcholine. *Journal of Biological Chemistry*. 279, 10833-36.

Veiga, S.S., da Silveira, R.B., Dreyfuss, J.L., Haoach, J., Pereira, A.M., Mangili, O.C., Gremski, W. 2000. Identification of high molecular weight serine-proteases in *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. *Toxicon* 38, 825-39.

Watson, W.A., Litovitz, T.L., Rodgers, G.C Jr., Klein-Schwartz, W., Youniss, J., Rose, S.R., Borys, D., May, E. 2003. 2002 annual report of the American Association of Poison Control Centers Toxic Exposure Surveillance System. *American Journal Emergency Medical* 21, 353-421.

Williams, K. 1997. Interactions of polyamines with ion channels. *Biochemical Journal* 325, 289-97.

William, W.J., Beutler, E., Erslev, A.J., Litchman, M.A. 1983. *Hematology*. 3rd edition. New York.

Woycechowsky, K.J., Hook, B.A., Raines, R.T. 2003. Catalysis of protein folding by an immobilized small-molecule. *Biotechnology Progress* 19, 1307-14.

Young, A.R., Pincus, S.J. 2001. Comparison of enzymatic activity from three species of necrotising arachnids in Australia: *Loxosceles rufescens*, *Badumna insignis* and *Lampona cylindrata*. *Toxicon* 39, 391-400.

Zavaleta, M-V, A., 1987. Loxoscelismo, un problema de salud pública en el Perú. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana* 103, 378-86.

APÉNDICE DE SOLUCIONES

TAE 50X

Trizma base (2M)	242 g
Na ₂ EDTA (50 mM)	18.6 g
Bromuro de etidio (25 mg/mL)	2.5 ml (10 mg/ml)
Ácido acético glacial para pH 7	60 ml aprox.
Aforar a 1 lt con agua desionizada.	

Loading buffer

0.25 % Azul de bromofenol	250 mg
0.25% Xilen Cial FF	250 mg
30% Glicerol	28 mL
TAE 50X	2 mL
Aforar con 70 mL de agua	

Medio SOC

Triptona o peptona	20 g
Extracto de levadura	5 g
Cloruro de sodio	0.58 g
Disolver en agua destilada y adicionar 10 mL de cloruro de potasio 250 mM (1.86 g de KCl en 100 mL de agua) ajustar el pH a 7.0 con hidróxido de sodio 5 N (≈ 0.2 mL). Aforar a 1 lt con agua desionizada. Autoclavear a 121 °C por 20 minutos.	
Agregar 10 mL de Cloruro de magnesio 1M (8 g de MgCl ₂ en 90 mL de agua) y 10 mL de Sulfato de magnesio (Mg SO ₄) 1M estéril.	
Agregar 20 mM glucosa filtrada con membranas de 0.22 micras.	

Medio LB (Luria-Bertani)

A 950 mL de agua adicionar :	
Extracto de levadura:	5 g
Bacto triptona	10 g
Cloruro de sodio	10 g
Mezclar. Ajustar el pH a 7.0 con 5N hidróxido de sodio (≈ 0.2 mL) ajustar el volumen a 1 lt con agua desionizada. Esterilizar a 121 °C por 20 minutos.	

SDS-PAGE

REACTIVOS

- Solución de acrilamida - (30% acrilamida + 0.8 bis-Acrilamida). Disolver 50 g de acrilamida y 1.2 de bisacrilamida en un volumen final de 165 mL de agua desionizada.
- Solución espaciadora - (1.5M tris + 0.4% SDS). Disolver 18.17g de Tris en 50 mL de agua desionizada y adicionar 2 mL de 20% SDS. Ajustar a pH 6.8 con HCL concentrado. Aforar a 100 mL.
- Solución concentradora - (0.5M Tris + 0.4% SDS) disolver 6.06 g de Tris en 50 mL de agua desionizada y adicionar 2 mL de 20% SDS. Ajustar a pH 6.8 con HCL concentrado. Aforar a 100 mL.
- Solución de corrida - (0.25M Tris + 0.19M Glicina + 0.1% SDS). Para una solución 10X, disolver 15.2g de Tris y 72.1 g de glicina en 300 mL de agua desionizada y adicionar 25 mL de 20 % SDS. Ajustar a pH 8.6 con 10M NaOH. Aforar a 500 mL.
- Buffer 2X de la muestra (10% glicerol + 2.5% SDS + 50 mM Tris-HCl, pH 6.8 + 5% 2-mercaptoetanol + 0.002% Azul de bromofenol). En un tubo de 15 mL, mezclar los siguientes volúmenes: 1 mL de glicerol; 1.25 mL de 20% SDS; 0.5 mL de 1M Tris-HCl, pH 6.8; 0.5 mL de 2-mercaptoetanol; 0.2 mL de 1% azul de bromofenol. Aforar a 10 mL con agua desionizada.
- 10% Persulfato de amonio. Disolver 0.1g de persulfato de amonio en 1mL de agua desionizada
- Solución de tinción - azul de Coomasie (50% Metanol + 10% ácido acético + 0.2% Azul de Coomasie G250). Disolver 1g de azul de Coomasie G250 en 250 mL de etanol, 50 ml de ácido acético y aforar a 500 mL con agua desionizada.
- Solución de destinción (10% Metanol + 10% ácido acético): mezclar 400 mL de agua desionizada, 50 mL de metanol y 50 mL de ácido acético.

La preparación de los geles de poliacrilamida al 12.5 % (gel espaciador y concentrador) se muestra en los siguientes recuadros.

GEL SEPARADOR AL 12.5 %

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

**GEL ESPACIADOR-CONCENTRADOR
4 %**

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

ENSAYO INMUNOLÓGICO ACOPLADO A ENZIMAS (ELISA)

1) Solución concentrada de PBS

Se disuelven 80 g de NaCl, 2 g de KCl, 14.4 g de Na_2HPO_4 y 2.4 g de KH_2PO_4 en 800 mL de agua destilada. Se ajusta el pH a 7.2 con NaOH 10 N y se afora a 1 lt. Para preparar una solución de trabajo (PBS 1X) se toman 100 mL del stock y se adicionan 900 mL H_2O , se mezclan y se esterilizan por 20 minutos. La esterilización puede hacerse tanto para la solución concentrada como para la de trabajo.

2) 100mM Carbonato/Bicarbonato pH 9.6

Se pesan 0.840 g de NaHCO_3 y se afora a 100 mL. Se pesa 1.059 g de Na_2CO_3 y se afora a 100 mL. Se coloca en hielo la solución NaHCO_3 y se ajusta el pH a 9.6 con la solución Na_2CO_3 . Se recomienda congelar esta solución una vez ajustado el pH.

3) 1M Tris/HCl pH 7.2; 7.5; 8.0 y 8.9

Para preparar cada una de éstas soluciones con diferente pH, se pesan 121.14 g de Tris-(hidroxi)-aminometano base y se disuelven en 800 mL de agua destilada. Se ajusta el pH deseado con HCl concentrado y luego se afora a 1 lt.

4) Buffer de lavado concentrado para ELISA (10X Tris/NaCl/Tween)

Se pesaron 87.66 g de NaCl (1.5M) y se disolvieron en 500 mM Tris/HCl pH 8.0. Se aforó a 1 lt con el mismo buffer y se filtró por 0.2 μ m. para preparar un litro de esta solución de trabajo, se toman 100 mL de la misma y se agregan 900 mL de H_2O , se adicionan 500 μ l de Tween 20 y se mezclan homogéneamente. Esta solución se guardó a 4 °C.

5) Buffer vehículo para la incubación de anticuerpos y conjugados en ELISA (Tris/Gelatina/NaCl/Tween)

Para preparar 100 mL de solución vehículo, se prepara un buffer de 50 mM Tris/HCl pH 8.0 conteniendo 500 mM NaCl, a esta solución se le agregan 100 mg de gelatina (1 mg/mL), la cual se disuelve a baño maría y con agitación constante. Luego de que esta solución alcance la temperatura ambiente se adicionan 50 μ l de Tween 20 y se mezclan bien. Si esta solución no se va a utilizar inmediatamente se recomienda congelar y si su uso es frecuente se puede refrigerar. En ambos casos no se debe olvidar que la gelatina se gelifica y que por lo tanto tiene que disolverse calentando como se menciono anteriormente.

6) Buffer de bloqueo para ELISA (Gelatina/Tween)

Se pesan 500 mg de gelatina (0.5 %) y se agregan en 100 mL de 50 mM Tris/HCl pH 8.0, se disuelven a baño maría con agitación constante. Cuando esta solución alcanza la temperatura ambiente se adicionan 200 μ l de Tween 20 y se mezclan homogéneamente.

7) Buffer de Revelado ABTS (50 mM ácido cítrico pH 4.0)

Se pesan 4.8 g de ácido cítrico y se disuelven en 400 mL de agua destilada, se ajusta el pH a 4.0 con NaOH 10 N. se afora a 500 mL y se guarda en congelación, pero cuando vaya a usarse se recomienda que esté a temperatura ambiente.

8) 40 mM ABTS

Se pesan 22 mg ABTS y se disuelven en 1 mL de agua destilada, se guardan a 4 °C y se cubre de la luz con un papel aluminio. Esta solución es estable hasta por cuatro meses.

ENSAYOS DE WESTERN-BLOT

1) **TBST 10X**

50 mL de Tris-HCl 1 M pH 7.5

150 mL de NaCl 5 M

2.5 mL de Tween 20

Aforar a 500 mL

2) **Solución de bloqueo**

5 gr de leche en polvo

100 mL de TBST 1X

1 mL de azida de sodio al 0.02%

3) **Cloruro de sodio 5 M**

146.1 gr de NaCl y llevarlo a 500 mL con agua

4) **Solución de transferencia**

39 mM glicina → 1.45 gr

48 mM Tris-base → 2.9 gr

0.037 % SDS → 0.185 gr

20 % Metanol → 100 mL

Llevar todo a 500 mL con agua

Genetic and enzymatic characterization of sphingomyelinase D isoforms from the North American fiddleback spiders *Loxosceles boneti* and *Loxosceles reclusa*

Blanca Ramos-Cerrillo^a, Alejandro Olvera^a, George V. Odell^a, Fernando Zamudio^a, Jorge Paniagua-Solís^b, Alejandro Alagón^a, Roberto P. Stock^{a,*}

^aDepartamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 2001, Cuernavaca, Morelos 62210, Mexico

^bDirección de Investigación, Laboratorios Silanes SA de CV, Mexico DF 83100, Mexico

Received 18 March 2004; accepted 14 June 2004

Available online 5 August 2004

Abstract

In this study we report the isolation and characterization of several sphingomyelinase D isoforms from the venoms of the North American spiders *Loxosceles boneti* and *Loxosceles reclusa*, from Mexico and the United States, respectively. We have measured their enzymatic activity, their capacity to induce necrotic lesions in rabbits, cloned the cDNAs coding for the mature forms of two of the isoforms from *L. boneti* and two of *L. reclusa* based on N-terminal sequence information of the purified proteins, and performed a comprehensive comparison of the sequence data generated by us with that reported for other sphingomyelinase genes to date.

© 2004 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: *Loxosceles boneti*; *Loxosceles reclusa*; Sphingomyelinase activity; Cloning

1. Introduction

Loxosceles spiders are cosmopolitan, and are the cause of medical conditions which can range from moderately morbid to life-threatening and fatal. Numerous species of *Loxosceles* have been described, mostly in the Americas and Africa, although European species have been found. The effects of poisoning by *Loxosceles* may range from localized necrotic conditions of varying severity, called cutaneous loxoscelism (CL), to systemic envenomation (VCL, viscerocutaneous loxoscelism) which may be not infrequently fatal, particularly in children (Sezerino et al., 1998).

Loxosceles spiders have venoms with a toxic component for mammals with a rare enzymatic activity, termed sphingomyelinase D (SMD). SMD is a relatively abundant protein component of pure *Loxosceles* venom, comprising a significant portion of venom protein along with components of lower molecular weight (by SDS-PAGE analysis, Binford and Wells, 2003). Sphingomyelinases have a molecular mass of approximately 33 kDa and catalyze the cleavage of sphingomyelin, releasing 1-phosphoceramide and choline (Kurpiewski et al., 1981). Sphingomyelins, in turn, are integral components of many cell membranes (such as erythrocytes and cells of the vascular epithelium), and although the natural targets of SMD action are not known, there is convincing evidence which points to the role of the enzymatic activity in the initiation of events which may lead to extensive necrosis and, on occasion, severe systemic

* Corresponding author. Tel: +52-777-3-291-602; fax: +52-777-3-172-388

E-mail address: rstock@ibt.unam.mx (R.P. Stock).

poisoning. It has been suggested that bacterial cells injected with the venom may enhance, or even be responsible for, the necrotizing effects of the *Loxosceles* bite (Monteiro et al., 2002). While some bacteria may contribute to the necrotic process, there is very strong experimental evidence that SMD activity is sufficient cause for the observed lesions. Besides the fact that SMDs render erythrocytes susceptible to complement-mediated lysis in vitro (Tambourgi et al., 1995), and therefore could conceivably induce damage in other cell types, the most compelling evidence to date for the requirement of SMD in the development of the necrotic wounds characteristic of loxoscelism comes from a study by Fernandes Pedrosa et al. (2002), who reported the cloning and expression of an active sphingomyelinase D from the South American species *Loxosceles laeta*. In their study, they show that heterologously expressed and purified recombinant SMD retains enzymatic activity and is sufficient for induction of necrosis in experimental animals. This necrosis, in turn, was abolished by incubation of the venom or recombinant SMD with antiserum generated against the recombinant toxin. Kalapothakis et al. (2002) have also reported the cloning and characterization of a SMD from another South American species, *L. intermedia*.

The aim of the present study was to characterize SMD from two common North American species of *Loxosceles*, *L. boneti* (abundant in central and southwestern Mexico) and *L. reclusa* from central and southeastern United States. We report the purification of three isoforms of SMD from *L. boneti* and a characterization of their enzymatic activity, as well as of two from *L. reclusa*. From amino-terminal sequencing information of the purified enzymes from *L. boneti* we also cloned and characterized two of the three genes coding for the isoforms isolated from *L. boneti*, as well as two isoforms from *L. reclusa*. A comprehensive comparison of the primary sequence data for all SMD genes available to date is also presented and discussed.

2. Materials and methods

2.1. Spiders

Specimens of *L. boneti* were collected in Tuxpan, Guerrero, Mexico. *Loxosceles reclusa* specimens were collected in Stillwater, Oklahoma, USA. Identification of the species was done by Dr Norman I. Platnick of the American Museum of Natural History, New York.

2.2. Purification of SMD

Purification of SMD was performed by a two-step protocol from whole homogenates of venom glands. Venom apparatuses were dissected and homogenized in 1 ml of 20 mM ammonium acetate pH 4.7 per 50 apparatuses by means of a tight-fitting teflon homogenizer on ice. We observed that contaminating hemocyanin could be removed,

since it precipitated after one freeze/thaw cycle, from the extract by centrifugation at 10,000g for 10 min. After clarification by centrifugation, 3.5 ml of the extract were fractionated on a Sephadex G-75 column and fractions collected. The fractions spanning the molecular weight expected for SMD (Fraction 2) were pooled and loaded onto a Mono-S cation exchange column fitted on a FPLC System (Pharmacia) in 20 mM ammonium acetate pH 4.7, and eluted with a linear NaCl gradient (10–500 mM NaCl in the same buffer). The eluted peaks from *L. boneti* were collected individually and processed for N-terminal sequencing. Part of the eluted peaks of *L. boneti* and *L. reclusa* were used for enzymatic and/or dermonecrotic activity assays.

2.3. Protein determination and measurement of SMD activity

Protein quantitation was done using the Bicinchoninic acid reagent (BCA, Pierce) using the protocols and standards supplied with the reagents. SMD activity of gland homogenates and chromatographic fractions was measured by a coupled assay using the substrate AMPLEX (Molecular Probes) and fluorimetric detection as described by the manufacturer. As control and reference standard, a sphingomyelinase C from *Staphylococcus aureus* was included, in which case alkaline phosphatase was included in the reaction, which was not necessary for the SMD reaction (as the assay utilizes choline oxidase which does not recognize choline phosphate as substrate). Since the fluorogenic substrate detects peroxide generated by the coupled reaction, controls were included which did not contain protein and others which did not contain sphingomyelin to avoid errors due to non-specific peroxide generation. One unit is defined as the amount of activity that will hydrolyze 1 μ mol of TNPAL-sphingomyelin per minute at pH 7.4 and 37 °C.

2.4. Dermonecrosis assay

Dermonecrotic activity was evaluated in New Zealand White (NZW, 2.5–3 kg) rabbits by a single subcutaneous injection of 10 μ g (isoforms Lb1 and Lb2) and 30 μ g (isoform Lb3), all in 300 μ l of phosphate buffered saline (PBS) into separate sites. Lesions were evaluated at 72 h post-injection. A traditional method for quantitation of the extent of necrosis is to measure the two longest perpendicular axes of the necrotic halo for approximate estimation of the area (Rees et al., 1981), however, the technique is inherently very variable, as no two injections are identical, and requires a large number of replicate injections, preferably in several animals, for statistical significance. For this reason, our assays were used only for qualitative assessment of necrosis, that is, presence or absence of a necrotic lesion at the site of the injection 72 h post-injection (p.i.).

2.5. N-terminal sequencing of *L. boneti* isoforms

The amino-terminal sequence of the three main peaks from the cation exchange chromatography of the *L. boneti* Sephadex G-75 fraction 2 were determined by standard procedures (Walsh et al., 1981). The N-terminal sequence data were aligned to those amino terminal sequences reported for *L. laeta*, *L. gaucho*, *L. intermedia* and *L. reclusa* (Barbaro et al., 1996) and *L. deserta* (Gomez et al., 2001).

2.6. Primers for cDNA amplification

Based on the amino acid sequences obtained, degenerate primers were designed in order to amplify the mRNAs coding for them (LbD primers). All possible codons were used as codon usage data is scarce for these spiders. Using the Universal Degenerate Code (I stands for Inosine, Y for C or T, R for A or G, M for A or C and H for A, T or C) the sequences of the primers were as follows:

Name	Sequence	Degeneracy	Use
LbD-1	CCIGCTTGGATHATGGG	3	3'RACE
LbD-1.1	GATHATGGGI-CAYATGGT	6	3'RACE
LbD-3	MGICCIAARCCIATHHTGG	12	3' RACE
Lb-1	CCAGCATCGAGTG-CATCT	None	5'RACE

2.7. General molecular biology

The cDNAs coding for SMD up to the N-terminal sequence determined from *L. boneti* and *L. reclusa* were amplified by the 3' RACE technique (Life Sciences). Briefly, total RNA from glands obtained using the Trizol reagent (Gibco) was reverse-transcribed using oligo-d(T) with an adapter sequence and the resulting cDNAs were amplified by PCR using the degenerate oligos (LbD-1 and the nested LbD-1.1) and an adapter primer to obtain double-stranded DNAs which were cloned in pCR TOPO 2.1 sequencing vectors (Invitrogen) by standard procedures. Sequencing was performed with universal primers by means of an automated system at facilities of the Instituto de Biotecnología. Based on the sequence data obtained from the primary clones, a primer (Lb-1) was designed for sequence confirmation as well as extension into the 5' end of the cDNAs (which had been amplified using degenerate primers) by 5' RACE (Life Sciences). Briefly, total RNA obtained as for 3' RACE were reverse-transcribed with the specific primer designed from the sequence data of the primary clones. Subsequently, a 'tail' of dGTP was added to the 3' end of the cDNAs by means of terminal deoxynucleotidyl transferase, and the cDNAs thus processed were amplified by PCR using the original primer used for

reverse-transcription and an oligo-d(C). The products of amplification were again cloned in the sequencing vector and sequenced as above.

2.8. Sequence analysis and alignments

Sequences were compared using Gene Works 2.5.1 (Intelligenetics, Inc.), and visual alignments generated using SeqVu 1.1 (The Garvan Institute of Medical Research). The sequences of *L. intermedia*, *L. laeta* and *L. arizonica* used in the alignment were obtained from the NCBI web server (GenBank Accession numbers AAQ16123, AAM21154, AAP44735, respectively). Identities were calculated by pairwise alignments and pI values were calculated from deduced amino acid sequences using standard pK_a values for the sidechains of individual residues with Gene Works.

3. Results

3.1. Purification of SMD

Venom apparatuses of 500 specimens of *L. boneti* and 500 from *L. reclusa* were homogenized as described above, and fractionated on a Sephadex G-75 column (170 × 2 cm). The elution profiles are shown in Fig. 1, left panel. Absorbance was monitored at 260 and 280 nm and, from left to right, four peaks were apparent. SMD activity was found in the second peak, which was subsequently fractionated on a cation exchange column using a linear NaCl gradient. As shown in the insets, three major peaks were identified for the *L. boneti* fraction, and what are probably three or four incompletely resolved peaks for the *L. reclusa* fraction. For both species, all corresponded to proteins with molecular weights of approximately 30 kDa by SDS-PAGE (Fig. 1, right panel). The second peak, overlapping partially with the first, of the *L. reclusa* chromatogram contained what are probably two mixed isoforms which were not resolved. Henceforth, the three main peaks from the *L. boneti* chromatogram will be referred to as isoforms 1, 2 and 3, respectively. The *L. reclusa* isoforms, in turn, were classified by identity to isoform 1 of *L. boneti*. As we have no N-terminal sequence data (see below) to identify each peak of the cation exchange chromatography to assign to the sequence data obtained from *L. reclusa* mRNA, we have used letters for the 'chromatographic' isoforms (A, BC and D, respectively). The cation exchange chromatograms of the gel filtration fractions of venom from both species also showed minor peaks, which may represent other rarer isoforms, allelic variants, or truncated or otherwise processed forms (see Section 4).

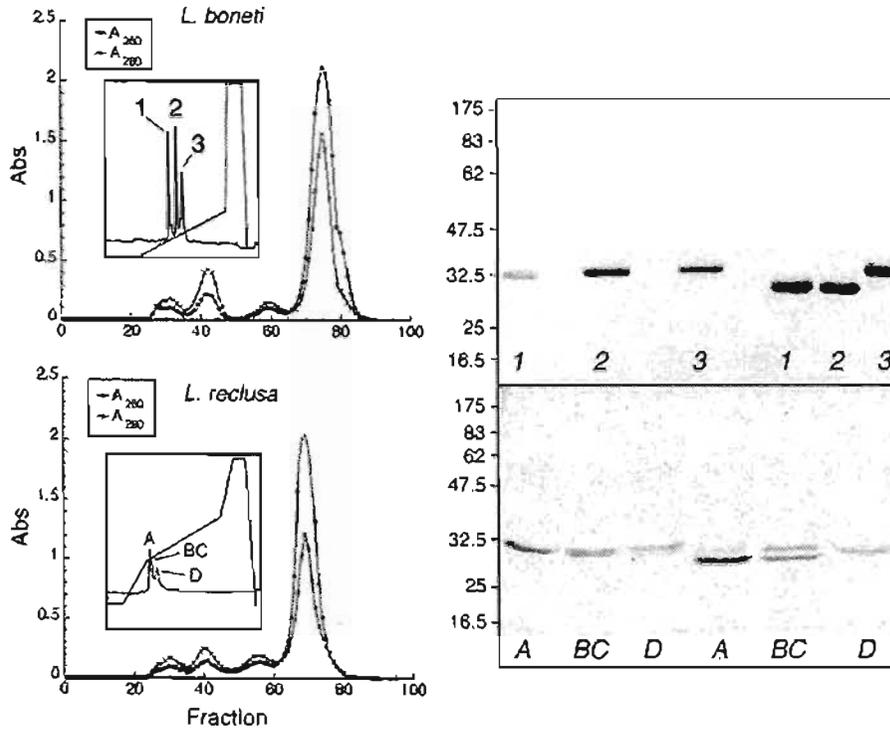


Fig. 1. Purification of SMD from homogenates of *L. boneti* and *L. reclusa* venom glands. Left panel: Top, Gel filtration of *L. boneti* gland extract with cation exchange chromatogram of Fraction 2 (inset); Bottom, gel filtration of *L. reclusa* gland extract with cation exchange chromatogram of Fraction 2 (inset). Ion exchange fractions are indicated. Right panel: SDS-PAGE of cation exchange fractions; Lanes I, II and III are non-reducing, lanes IV, V and VI are reducing. They all correspond to main peaks (indicated below). Molecular weights are in kDa.

3.2. SMD activity of purified *L. boneti* and *L. reclusa* isoforms, and dermonecrotic activity of *L. boneti* isoforms

Sphingomyelinase activity was measured using a coupled assay and fluorescent detection of the products. The assay is exquisitely sensitive, and permits detection of nanograms of enzyme. Of the three *L. boneti* isoforms, isoform 1 showed the highest specific activity, followed by isoform 2 (31% of isoform 1). Interestingly, isoform 3 did not display activity, although its identity to the other isoforms is high enough to warrant its denomination as an isoform (see below). Table 1 lists the specific activities of the three *L. boneti* isoforms, as well as that of the three *L. reclusa* chromatographic fractions.

Both *L. boneti* isoforms 1 and 2 were dermonecrotic when injected subcutaneously in rabbits (Table 1). However, and most interestingly, isoform 3, which is not enzymatically active, was not dermonecrotic when injected at three times the dose of the other isoforms (see Section 4). Similar results were reported for isoforms of *L. intermedia* (Tambourgi et al., 1998).

3.3. N-terminal sequencing of the three main isoforms from *L. boneti*

SDS-PAGE analysis of the individual *L. boneti* fractions showed the proteins to be very pure (Fig. 1, right top panel),

so they were used for N-terminal sequencing. The sequences obtained were congruous with the N-terminal sequence data then reported (Barbaro et al., 1996; Gomez et al., 2001). Isoforms 1 and 2 of *L. boneti* shared an identity of 94% at their N-termini, whereas isoform 3 was the most divergent of the three, with an identity of 36% with respect to isoform 1. In Table 2, the N-terminal sequences of the three *L. boneti* isoforms and percent identities with the then reported N-terminal sequences of several *Loxosceles* species are shown. The amino acids chosen for design of the degenerate primers are underlined and, as those of *L. boneti* isoform 1 perfectly match those of the reported *L. reclusa* sequence, they were also used for amplification of SMD cDNAs of this species.

Table 1

Specific SMD ($n=3$) and dermonecrotic activities of *L. boneti* and *L. reclusa* cation exchange fractions

Name	Specific activity (U/mg)	Necrotic
<i>L. boneti</i> 1	30.5 ± 7.2	+
<i>L. boneti</i> 2	9.5 ± 1.9	+
<i>L. boneti</i> 3	0	-
<i>L. reclusa</i> A	20.3 ± 6.9	NA
<i>L. reclusa</i> BC	11.5 ± 0.2	NA
<i>L. reclusa</i> D	4.59 ± 0	NA

NA, not ascertained.

Table 2

N-terminal sequence data for *L. boneti* isoforms. The percentage of identity is with respect to the sequence of *L. boneti* isoform 1 by pairwise alignment. Amino acids used for degenerate primer design are underlined

Name	Sequence	% Identity	Reference
<i>L. boneti</i> 1	AN <u>K</u> RPVWIMGHMVNAJAQID <u>E</u> FVNLGANSIETDVS	100	This study
<i>L. boneti</i> 2	AN <u>K</u> RPVWIM <u>A</u> HMVNAVAQID <u>E</u> FVNLGANSIETD	94	This study
<i>L. boneti</i> 3	AXR <u>P</u> K <u>P</u> I <u>W</u> XVAH <u>M</u> VNDLELVDEYL	36	This study
<i>L. reclusa</i>	AN <u>K</u> RPVWIMGHMVNAVYQID <u>E</u> FVNLGANSIDTDVS	91	Barbaro et al. (1996)
<i>L. gaucho</i>	ADN <u>K</u> RP <u>I</u> WVVMGGMVNSLAQI <u>K</u> EFVGLGLDNSEKDNKWKYKQ	58	Barbaro et al. (1996)
<i>L. deserta</i>	AN <u>K</u> RP <u>I</u> WIMGHMVNAIYQID <u>E</u> FVNLGANSIETDVS	94	Gomez et al. (2001)
<i>L. laeta</i>	ADNRRP <u>I</u> WNLGHMVNAL <u>K</u> QI <u>P</u> FLXDGANA	55	Barbaro et al. (1996)

The X denotes undetermined amino acids.

3.4. Amplification and sequence of SMD cDNA by RT-PCR with degenerate primers and completion of sequence by 5'RACE

With the N-terminal sequence information, degenerate primers were designed to amplify cDNA from isoforms 1 and 2 on one hand, and isoform 3 on the other. The same primers used for amplification of the *L. boneti* cDNAs were also used to amplify cDNA from total RNA of *L. reclusa*. The RT-PCR yielded bands of the expected size which were cloned and sequenced. In the case of *L. boneti*, the deduced amino acid sequences of two distinct clones showed perfect identity to the N-terminal sequence data, corresponding to isoforms 1 and 3. We were not able to detect primary clones which matched the N-terminal sequence of isoform 2. In the case of *L. reclusa*, two distinct sequences were obtained, which we have tentatively called isoforms 1 and 2 based on sequence identity to isoform 1 of *L. boneti*. All these sequences from the primary clones were in turn used to design additional primers for sequence confirmation and to extend the sequences into the 5' region of the cDNA, with the aim of characterizing the complete coding sequences and removing the potential bias introduced by the use of the degenerate primers in the original amplifications. However, it was not possible to extend the sequences beyond those obtained from the mature protein's N-terminal sequences, although unbiased sequences for the portions spanned by the original degenerate primers were obtained.

3.5. Primary sequence of SMD cDNA and alignments

The complete sequences for mature *L. boneti* isoforms 1 and 3, as well as those of *L. reclusa* isoforms 1 and 2 are available from GenBank (accession numbers AY559844, AY559845, AY559846 and AY559847, respectively). In Fig. 2 a complete alignment of the deduced amino acid sequences of *L. boneti* isoforms 1 and 3, *L. reclusa* isoforms 1 and 2, and reported sequences from other *Loxosceles* species (*L. intermedia*, *L. laeta* and *L. arizonica*) starting from the first amino acid of the N-terminal sequence data. To date, the only complete sequences, that is, starting at the start codon are that of *L. laeta* (from a cDNA library,

Fernandes Pedrosa et al., 2002) and that of *L. arizonica*, which was obtained from a genomic library (Genbank AAP44735). Identity between the two *L. boneti* isoforms is 45% and between the two *L. reclusa* isoforms is 90%. Identities are summarized in Table 2. Consistently, the most divergent sequence is that of *L. laeta* (when considering only enzymatically active SMDs). Variability of *L. laeta* SMD includes two amino acid insertions at positions 168 and 201 not found in any of the other proteins, the first of five amino acids and the second a single phenylalanine. SMD from *L. laeta* shares an insertion at position 2 with SMD from *L. intermedia*, although of different amino acids. The number of conserved cysteines is also different for *L. laeta* when compared to all the other sequences, which may have important implications for the structure and/or function of the protein (see Section 4). All in all, the conservation of SMD in species so widely distributed, in geographic and climatic terms, is remarkable, although variability in some residues is not conservative. Theoretical pIs for different isoforms within *L. boneti* and *L. reclusa*, and compared to those of the other species, show considerable variability (Table 3).

4. Discussion

Spiders of the genus *Loxosceles*, which have been recognized as medically relevant, contain venoms with one component, sphingomyelinase D, shown to be responsible for the typical toxicity observed in humans and some animal models. In order to learn more about the toxic activity of *Loxosceles* venom, we purified sphingomyelinase D from venom gland extracts of the North American *L. boneti* and *L. reclusa* by a two-step chromatographic protocol involving a gel filtration step followed by cation exchange. For *L. boneti*, the latter yielded three well defined peaks of high purity which, upon N-terminal sequencing, showed a high identity with the then reported N-terminal sequence for SMD from other *Loxosceles* species. Of the three isoforms, named 1 to 3 by the order of elution, 1 and 2 displayed SMD activity, whereas isoform 3 was inactive in the conditions of our assay. Of the two active isoforms, isoform 1 exhibited

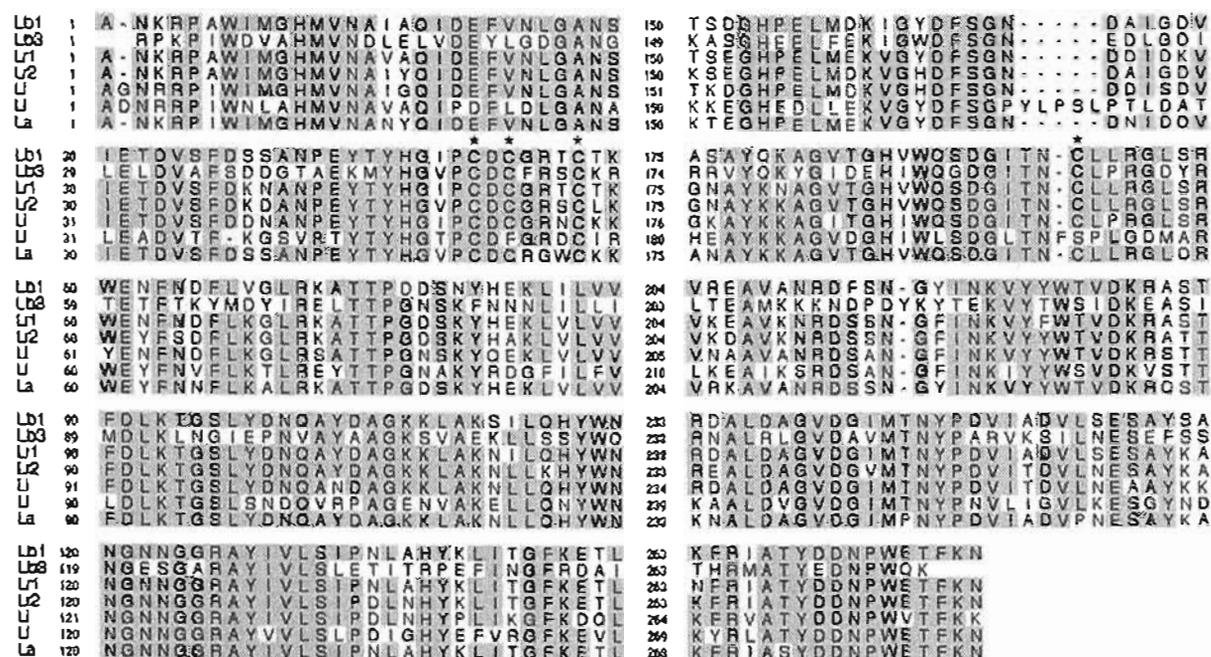


Fig. 2. Deduced amino acid sequences of SMD from *L. boneti* and *L. reclusa* and sequence alignment with all other complete reported sequences for the mature proteins (Lb, *L. boneti*; Lr, *L. reclusa*; La, *L. arizonica*; Li, *L. intermedia*; Ll, *L. laeta*). Cysteines are indicated by asterisks.

the highest specific activity when compared to isoform 2 of the same species. In the case of *L. reclusa*, cation exchange chromatography resulted in two well defined peaks, of which the first seemed to be composed of at least two components which could not be completely resolved. The specific enzymatic activities of the isoforms of *L. reclusa* venom were comparable to those of *L. boneti*. In the case of isoform BC, the activity may correspond to the combination two active isoforms or, alternatively, to one less active and one inactive isoform. Also, the possibility remains that fraction BC corresponds in equal parts to fractions A and D which, if combined in approximately equal amounts (as shown in Fig. 1, bottom SDS-PAGE gel, lanes II and V), would yield a similar average activity.

Interestingly, isoform 3 from *L. boneti*, while clearly a related protein, as determined by sequence alignment, did not exhibit SMD activity while maintaining a high identity with the other isoform of the same species. Consistent with the study of Fernandes Pedrosa et al. (2002), our study supports their assertion that enzymatic activity is necessary and sufficient for, at least, initiation of the necrotic process, as isoform 3 of *L. boneti* venom which is 45% identical to isoform 1, did not exhibit necrotic activity in rabbits. The dermonecrotic assay we used is, at best, semiquantitative, so a fine correlation between enzymatic activity and extent of necrosis can not be, as of yet, unequivocally established.

Although we tried to characterize the complete cDNAs from mRNAs coding for *L. boneti* and *L. reclusa* SMDs, we were not able to obtain cDNAs which contained the amino-terminal sequence absent in the mature protein. A similar

situation is apparent in the case of the SMD cDNA sequence reported for *L. intermedia*. This may be due to secondary structure at the 5' end, an inherent fragility of the specific mRNA or, alternatively, that the mRNA is possibly degraded very soon after, or even during, translation, as we sequenced numerous clones obtained under the most careful conditions of RNA isolation and reverse transcription but could find none that extended to the start codon.

The amino acid sequences of SMDs from different *Loxosceles* species are quite conserved and, interestingly, their theoretical pIs show significant variability among isoforms within a species and between species, ranging from 4.88 in *L. boneti* to 8.23 in *L. arizonica* (Table 3). This variability might be reflected in differences in optimal conditions for SMD activity and/or substrate specificity; characterization of pH and salt optima for activity of pure isoforms will be of use in the understanding of the role of

Table 3
Identities of all reported SMD deduced amino acid sequences

Name (pI)	Lb1					
Lb1 (5.15)	–	Lb3				
Lb3 (4.88)	45	–	Lr1			
Lr1 (6.17)	91	44	–	Lr2		
Lr2 (7.32)	84	46	90	–	La	
La (8.23)	86	43	88	87	–	Li
Li (7.29)	82	46	84	85	80	–
Ll (5.42)	57	41	60	60	59	59

In parentheses are the theoretical isoelectric points. (Lb, *L. boneti*; Lr, *L. reclusa*; La, *L. arizonica*; Li, *L. intermedia*; Ll, *L. laeta*).

SMD in the natural life circumstances of *Loxosceles* spiders. In this regard, in both *L. boneti* and *L. reclusa* cation exchange chromatograms, minor peaks can be observed and although they may correspond to other minor isoforms, our sequencing of numerous clones which showed slight but persistent variability (data not shown) suggests that significant allelic variation within species exists. As the purification of SMD was from a pool of a large number of specimens, as was the extraction of total RNA for cDNA cloning, it is impossible to establish whether these differences are due to allelic variation or the existence of additional genes for SMD within the species used in this study. Further inquiry into the sequence of SMD genes obtained from single specimens of the same species could be of use in the study of natural populations, for fine-tuning of molecular phylogenies, or even for evolutionary studies.

For example, *L. laeta* is possibly the largest of the genus, and it has been claimed to be one of the most dangerous (Fernandes Pedrosa et al., 2002). SMD from *L. laeta* is also the most divergent of those reported (Table 3), most notably, amongst other things, for the potentially different number of disulphide bonds in the protein, since all other sequences have four conserved cysteines while that of *L. laeta* has only two (and those only five amino acids apart), thus precluding the existence of an intramolecular disulphide bond between C50 (C51 in *L. intermedia*) and C196 (C197 in *L. intermedia*) which could join two distant sites in the molecule, possible in all SMDs sequenced from all other species. It would be most informative to carry out comparisons of sphingomyelinase activity with the smaller species in order to determine whether the higher dermonecrotic potential associated to the *L. laeta* bite is due to higher specific SMD activity, other enzymatic peculiarity (such as stability or cofactor dependence, for example), or, alternatively, due to the larger amounts of venom injected per bite.

Necrotic activities of reptile venoms, mostly related to phospholipases and proteinases, have been under scrutiny for some time. The large quantities of active necrotizing toxins injected by, for example, viperine snakes, have generally been considered sufficient by themselves as cause of the extensive necrosis resulting from envenomation. In the case of SMD as a necrotic toxin, it may be necessary to consider alternative and possibly indirect mechanisms, as the quantities of SMD injected in a *Loxosceles* bite could scarcely exceed micrograms. The factors that affect the development of CL and VCL are not known, however, the fact that VCL is most common in children, and that the severity of CL is very variable between patients, suggests that host mechanisms may be at work as consequence of SMD activity. Sphingosine and ceramide metabolites have been known for some time to be important signaling molecules in a variety of cellular systems, and specific enzymes and pathways exist that control their synthesis and recycling in a variety of cellular processes (Huwiler et al., 2000; Van Meeteren et al., 2004). Studies on the role of 1-phosphoceramide released by SMD action are likely to

contribute to our present meager understanding of the cascade of events that can lead from localized direct damage, possibly at the cell membrane level in the site of the bite, to the sometimes very extensive necrotic processes or systemic syndromes observed in some patients.

Acknowledgements

We wish to thank Felipe Olvera for excellent technical assistance, Maricela Olvera and Rene Hernández for sequencing, and the technical staff at the animal facilities of the Instituto de Biotecnología. This work was supported in part by grant PAPIIT-UNAM IN230203 (Mexico).

References

- Barbaro, K.C., Sousa, M.V., Morhy, L., Eickstedt, V.R.D., Mota, I., 1996. Compared chemical properties of dermonecrotic and lethal toxins from spiders of the genus *Loxosceles* (Araneae). *J. Protein Chem.* 15 (4), 337–343.
- Binford, G.J., Wells, M.A., 2003. The phylogenetic distribution of sphingomyelinase D activity in venoms of Haplogyne spiders. *Comp. Biochem. Physiol. B* 135, 25–33.
- Fernandes Pedrosa, M.F., Junqueira de Azevedo, J.L., Goncalves-de-Andrade, R.M., van den Berg, C.W., Ramos, C.R., Ho, P.L., Tambourgi, D.V., 2002. Molecular cloning and expression of a functional dermonecrotic and haemolytic factor from *Loxosceles laeta* venom. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 298 (5), 638–645.
- Gomez, H.F., Miller, M.J., Waggener, M.W., Lankford, H.A., Warren, J.S., 2001. Antigenic cross-reactivity of venoms from medically important North American *Loxosceles* spiders species. *Toxicon* 39, 817–824.
- Huwiler, A., Kolter, T., Pfeilschifter, J., Sandhoff, K., 2000. Physiology and pathophysiology of sphingolipid metabolism and signaling. *Biochim. Biophys. Acta* 1485, 63–99.
- Kalaphothakis, E., Araujo, S.C., de Castro, C.S., Mendes, T.M., Gomez, M.V., Mangili, O.C., Gubert, J.C., Chavez-Olortegui, C., 2002. Molecular cloning, expression and immunological properties of LiD1, a protein from the dermonecrotic family of *Loxosceles intermedia* spider venom. *Toxicon* 40 (12), 1691–1699.
- Kurpiewski, G., Forrester, L.J., Barrett, J.T., Campbell, B.J., 1981. Platelet aggregation and sphingomyelinase D activity of a purified toxin from the venom of *Loxosceles reclusa*. *Biochim. Biophys. Acta* 678 (3), 467–476.
- Monteiro, C.L., Rubel, R., Cogo, L.L., Mangili, O.C., Gremski, W., Veiga, S.S., 2002. Isolation and identification of *Clostridium perfringens* in the venom and fangs of *Loxosceles intermedia* (brown spider): enhancement of the dermonecrotic lesion in loxoscelism. *Toxicon* 40, 409–418.
- Rees, R.S., Shack, R.B., Withers, E.H., Madden, J.J., Franklin, J.D., Lynch, J.B., 1981. Management of the brown recluse spider bite. *Plast. Reconstr. Surg.* 68 (5), 768–773.
- Sezerino, U.M., Zannin, M., Coelho, L.K., Goncalves Jr., J., Grando, M., Mattosinho, S.G., Cardoso, J.L.C., von Eickstedt, V.R., Franca, F.O.S., Barbaro, K.C., Fan, H.W.,

1998. A clinical and epidemiological study of *Loxosceles* spider envenoming in Santa Catarina, Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg* 92, 546–548.
- Tambourgi, D.V., Magnoli, F.C., Von Eickstedt, V.R., Benedetti, Z.C., Petricevich, V.L., da Silva, W.D., 1995. Incorporation of a 35-kilodalton purified protein from *Loxosceles intermedia* spider venom transforms human erythrocytes into activators of autologous complement alternative pathway. *J. Immunol.* 155 (9), 4459–4466.
- Tambourgi, D.V., Magnoli, F.C., van den Berg, C.W., Morgan, B.P., de Araujo, P.S., Alves, E.W., Dias Da Silva, W., 1998. Sphingomyelinases in the venom of the spider *Loxosceles intermedia* responsible for both dermonecrosis and complement-dependent hemolysis. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 251 (1), 366–373.
- Van Meeteren, L.A., Frederiks, F., Giepmans, B.N., Fernandes Pedrosa, M.F., Billington, S.J., Jost, B., Tambourgi, D.V., Moolenaar, W.H., 2004. Spider and bacterial sphingomyelinases D target cellular LPA receptors by hydrolyzing lysophosphatidylcholine. *J. Biol. Chem.* 19, xxx, Jan 19 (electronic publication ahead of print).
- Walsh, K.A., Ericsson, L.H., Parmelle, D.C., Titani, K., 1981. Advances in protein sequencing. *Ann. Rev. Biochem.* 50, 261–284.