

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA
ESFINGOMIELINASA D DEL VENENO DE LAS ARAÑAS
VIOLINISTAS *Loxosceles boneti*, *L. reclusa* Y *L. laeta*

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO
DE MAESTRA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

PRESENTA

BIÓL. LAURA PATRICIA OLGUÍN PÉREZ

TUTOR: DR. ALEJANDRO ALAGÓN CANO



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CONTENIDO

RESUMEN	
INTRODUCCIÓN	1
Generalidades	1
Veneno y loxoscelismo	3
ANTECEDENTES	3
Caracterización del veneno de <i>Loxosceles</i>	3
Efecto celular e inmunológico	4
Bioquímica y acción de las esfingomielinasas	8
Esfingomielinasa D recombinante de <i>Loxosceles</i>	10
JUSTIFICACIÓN	11
OBJETIVOS	11
MATERIAL Y MÉTODOS	11
Esfingomielinasas D recombinantes	11
Sustratos	12
Reactivos	12
Método colorimétrico con Resorufina	12
Método colorimétrico con TNPAL-esfingomielina	15
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17
Actividad enzimática de las proteínas recombinantes	17
Caracterización del efecto de cationes divalentes	17
Efecto inhibitorio del citrato	24
Efecto del pH	26
Actividad enzimática diferencial sobre sustratos	28
CONCLUSIONES	34
PERSPECTIVAS	35
LITERATURA CITADA	37
APÉNDICE	40

RESUMEN

El veneno de la araña *Loxosceles* ha sido caracterizado como dermonecrótico ya que produce lesiones en la zona de la mordedura como consecuencia de la acción de la toxina con actividad de esfingomielinasa D (SMD). Se conoce con bastante profundidad la fisiopatología del loxoscelismo local y sistémico; sin embargo, se desconoce el perfil enzimático de esta toxina. En el laboratorio se han caracterizado las isoformas de la SMD del veneno de *Loxosceles boneti*, *L. reclusa* y *L. laeta*, siendo la isoforma 1 (SMD-1) la más abundante y la que tiene mayor actividad específica. Los genes correspondientes han sido clonados, lo que permitió la expresión de las isoformas recombinantes. Es importante recalcar que todas las proteínas recombinantes, al igual que las naturales, poseen la misma actividad enzimática de esfingomielinasa D, actividad dermonecrótica en conejos y letalidad en ratones.

Se determinó el efecto de cationes divalentes sobre la actividad enzimática, encontrándose estimulación de la actividad en presencia de cloruro de magnesio e inhibición con cloruro de calcio. También se determinó el efecto inhibitorio del citrato, quelante presente en cantidades considerables en los venenos naturales de estas arañas. Se probaron diferentes rangos de pH, observándose un máximo de actividad a pH 8, siendo 60% mayor que la observada a pH fisiológico. Se observó actividad diferencial sobre varios tipos y fuentes de esfingomielina; sin embargo, no se observó actividad preferencial sobre la esfingomielina similar a la encontrada en tejido de mamífero. En el caso de lisofosfolípidos se demostró que la presentación del sustrato es determinante para la actividad, se observó que las micelas libres de Tritón X-100 son más susceptibles de ser hidrolizadas que las micelas mixtas con triton.

INTRODUCCIÓN

Generalidades *Loxosceles*

El phylum Arthropoda es el más diverso y grande en cuanto a número de individuos dentro de los phyla de invertebrados. La diversidad de arañas en el mundo es tan grande que llega a ocupar el séptimo lugar comparado con los cinco órdenes mayores de insectos y el orden Acari (Coddington y Levi, 1991). Todas las arañas producen veneno, sin embargo, son pocas las especies que tienen una verdadera importancia médica por los efectos de su veneno en los humanos (Diaz, 2004). Entre ellas están la araña de embudo *Atrax robustus* de Australia, las viudas negras *Latrodectus spp* con distribución cosmopolita y la araña platanera *Phoneutria* de Sudamérica, cuyos venenos tienen efectos neurotóxicos. También existen aquellas que tienen efectos necrotóxicos como la araña violinista *Loxosceles* y la araña Hobo *Tegenaria*, entre otras. Las arañas del género *Loxosceles* Heineken & Lowe (clase Arachnida, orden Araneae, infraorden Haplogynae, familia Sicariidae), se caracterizan por el patrón de coloración del prosoma en el cual se distingue la forma de un violín, de ahí el nombre común de araña violinista (Fig. 1).



Figura 1. *Loxosceles boneti*. Patrón de coloración del prosoma con forma de violín.

Foto: Dr. A. Alagón-Cano. *L. boneti*; hembra. Gro, Méx.

En América se encuentran registradas 84 especies de *Loxosceles* de las 100 especies descritas a nivel mundial (Fig. 2) (World Spider Catalog. Platnick, versión 5.5). Sólo algunas especies de éste género se encuentran relacionadas con casos de envenenamiento humano, *Loxosceles gaucho*, *L. intermedia* y *L. laeta* en Sudamérica, y *L. deserta* y *L. reclusa* en Norteamérica (Barbaro *et al.*, 2005). Para México hay registros de 35 especies distribuidas heterogéneamente en el territorio (Ramos & Vázquez, 2000; World Spider Catalog. Platnick, versión 5.5). Sin embargo, no ha sido posible asociar a alguna especie en particular con los casos de loxoscelismo registrados en el país, esto debido a la falta del ejemplar al momento de acudir a la atención médica (Dra. C. Sánchez, com. pers.).

Las arañas violinistas son cosmopolitas, generalmente se encuentran en clima tropical y templado; los microhábitats que ocupan incluyen corteza de árboles, entre piedras, dentro de cuevas, además de ser sinantrópicas y encontrarse en hendiduras de paredes, bajo muebles, desperdicios apilados en casas, etc. (De Roodt, 2002).

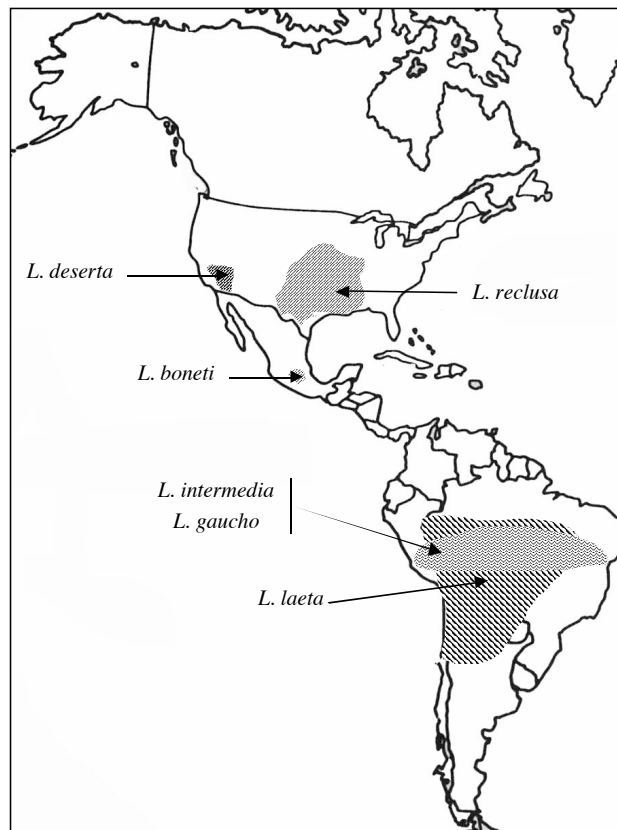


Figura 2. Distribución de las especies de importancia médica del género *Loxosceles* en América.

Veneno y loxoscelismo

En general, los arácnidos utilizan el veneno para inmovilizar a sus presas y así manipularlas sin el riesgo de ser lastimados. La composición química del veneno es variable, entre especies y entre ambos sexos (Oliveira, 2005), principalmente son mezclas de polipéptidos neurotóxicos y enzimas proteolíticas, estas últimas favorecen la digestión externa de las presas (Álvarez del Toro, 1992). El veneno de *Loxosceles* ha sido caracterizado como necrotóxico ya que produce lesiones dermonecroticas en la zona de la mordedura como consecuencia de la acción de una toxina con actividad de esfingomielinasa D (SMD), además presenta baja actividad proteolítica dependiente de una metaloproteinasa y bajísima actividad de hialuronidasa (Moye, 1997; Tambourgi, 2000; Ramos-Cerrillo, 2002).

Al ser arañas sinantrópicas, es decir, que están en contacto con asentamientos humanos, las mordeduras son relativamente comunes en zonas de mayor incidencia de poblaciones de estas arañas, a pesar de ser arañas que evitan el contacto con el humano (De Roodt, 2002). Al accidente producido por esta araña se le conoce como loxoscelismo (Ramos & Vázquez, 2000). Mayormente producen lesiones necróticas en torno al sitio de la mordedura y, raramente, producen efectos sistémicos con hemólisis masiva, coagulación intravascular diseminada, hemoglobinuria e insuficiencia renal aguda (De Roodt, 2002). La mordedura de la especie *Loxosceles laeta* es la involucrada en el mayor número de accidentes provocando los cuadros más severos de loxoscelismo en Sudamérica. En el caso de Norte América, *L. reclusa* es la especie que representa un problema de salud, sobre todo al sur sureste de Estados Unidos. En México están registradas 35 de las 84 especies de *Loxosceles* de América (Ramos, 2000), a pesar de estar ampliamente distribuidas en el territorio nacional, no representan, aparentemente, un problema de salud de alta incidencia como lo es el latroductismo y, sobretodo, el alacranismo.

ANTECEDENTES

Caracterización del veneno de *Loxosceles*

Los venenos de arañas han sido poco estudiados a detalle en cuanto a su composición, no obstante se considera que hay diversos tipos de moléculas bioactivas presentes en éstos. Se conoce someramente la composición del veneno de *Loxosceles* y se han reportado algunas actividades enzimáticas como la de dos metaloproteinasas de 20-28 kDa con actividad fibrinogenolítica

(Loxolisina A) y con actividad fibronectinolítica (Loxolisina B) en el veneno de *L. intermedia* (Feitosa *et al.*, 1998; Silveira *et al.*, 2002). También se reporta una bajísima actividad de hialuronidasa determinada por SDS-PAGE conteniendo ácido hialurónico (Young *et al.*, 2001). Se conoce con exactitud que el efecto dermonecrótico es debido a una proteína de aproximadamente 32 kDa con actividad de la esfingomielinasa D presente en el veneno (Fernandes-Pedrosa *et al.*, 1998; Ramos-Cerrillo *et al.*, 2004). Esta enzima constituye hasta el 50% del material peptídico del veneno, donde se distinguen dos isoformas activas y una inactiva de la SMD; por sí sola es dermonecrótica en conejos y altamente tóxica y letal en ratones (Ramos-Cerrillo *et al.*, 2004) y en caballos (Dr. A. Alagón, com. pers.)

Efecto celular e inmunológico

El mecanismo general de acción del veneno, atribuible fundamentalmente a la SMD, es la inducción de una reacción inflamatoria intensísima a nivel local y variable a nivel sistémico. Las células endoteliales y epiteliales producen quimocinas (GM-CSF, IL-8, MCP-1) que reclutan masivamente leucocitos en el sitio de la mordedura; los niveles de selectinas se elevan en las células endoteliales lo que favorece el desplazamiento de neutrófilos hacia el sitio afectado (Gómez, 1999; Patel, 1994; Tambourgi, 1998b); el reclutamiento es de tal magnitud que se produce una neutropenia a nivel sistémico. Los leucocitos reclutados a su vez liberan citocinas proinflamatorias (TNF, IL-6, IL-10) que elevan varias veces sus niveles normales en sangre, inclusive pueden detectarse concentraciones elevadas de óxido nítrico (Domingos, 2003). La actividad incrementada de los leucocitos resulta en la producción de agentes tóxicos para ellos mismos y las células vecinas (Smith, 1970).

Las plaquetas también son activadas directamente por la SMD agregándose y produciendo microtrombos y zonas de isquemia que agravan el cuadro clínico (Gates, 1990; Kurpiewski, 1981). El resultado es la lesión dermonecrótica que evoluciona a su punto máximo en cuestión de días para luego involucionar, en semanas, dejando pocas huellas. En algunos pacientes la necrosis puede permanecer activa durante varias semanas con destrucción de zonas extensas de tejido (Fig. 3) (De Roodt, 2002).

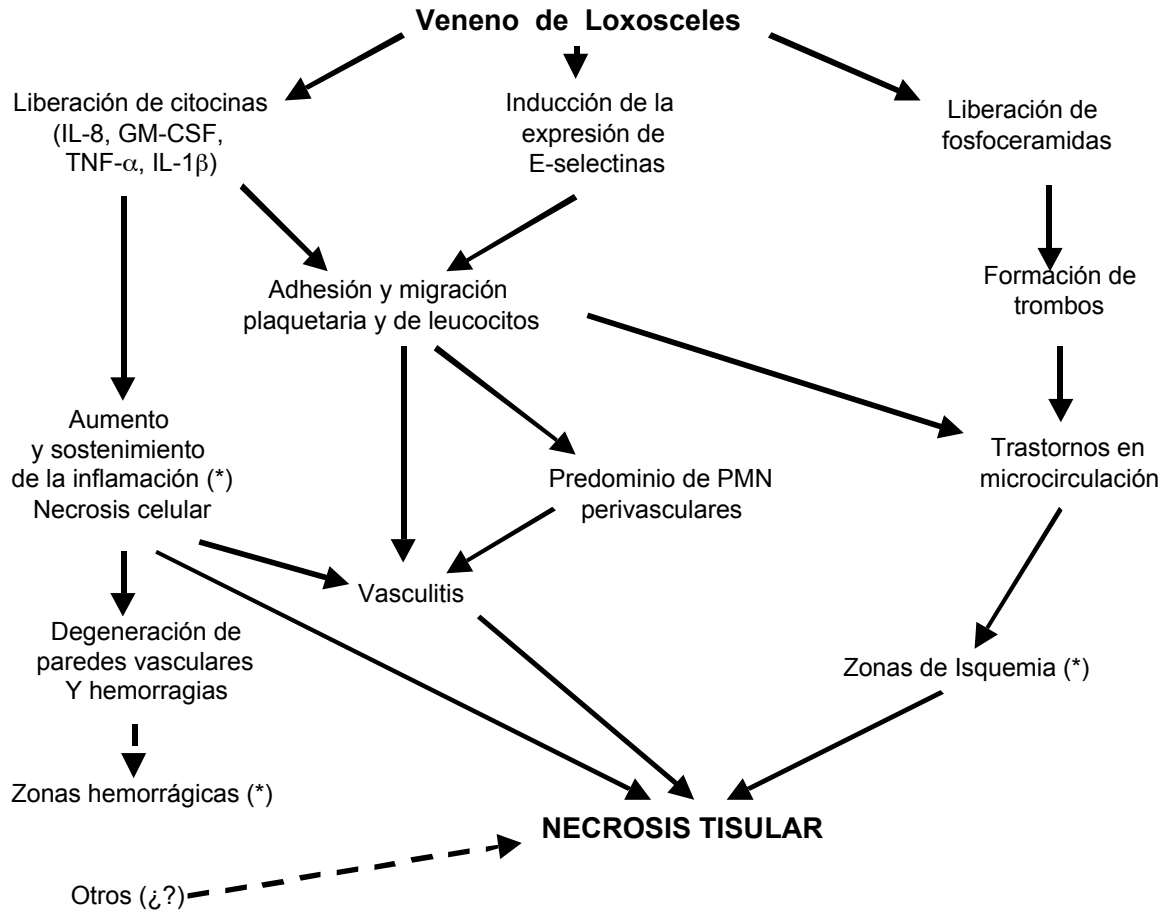


Figura 3. Respuesta fisiológica en el loxoscelismo cutáneo. Modificado de De Roodt, 2002.

En algunas personas, como sucede en el ratón, puede dominar la reacción inflamatoria sistémica que asemeja mucho al llamado shock endotóxico y se caracteriza por hipotermia, postración, caquexia aguda, hipotensión arterial y hemólisis masiva. Esta última puede desencadenar coagulación intravascular diseminada y/o hemoglobinuria masiva que resulta en daño e insuficiencia renal. Estos casos son muy graves y pueden terminar con la vida del paciente (De Roodt, 2002).

Un hallazgo *in vitro* y que pudiera también contribuir al cuadro clínico mencionado es la hemólisis mediada por la vía alterna del complemento (Tambourgi, 1998a; 2002). Al parecer la modificación que ejerce la SMD sobre la membrana eritrocitaria favorece la deposición de C3b que termina con la formación del complejo lítico (Gates, 1990). Asimismo, la SMD activa una metaloproteinasas endógena del eritrocito que remueve a las glicoforinas de la membrana volviéndolo aun más susceptible al ataque por complemento (Fig. 4) (Tambourgi, 2000).

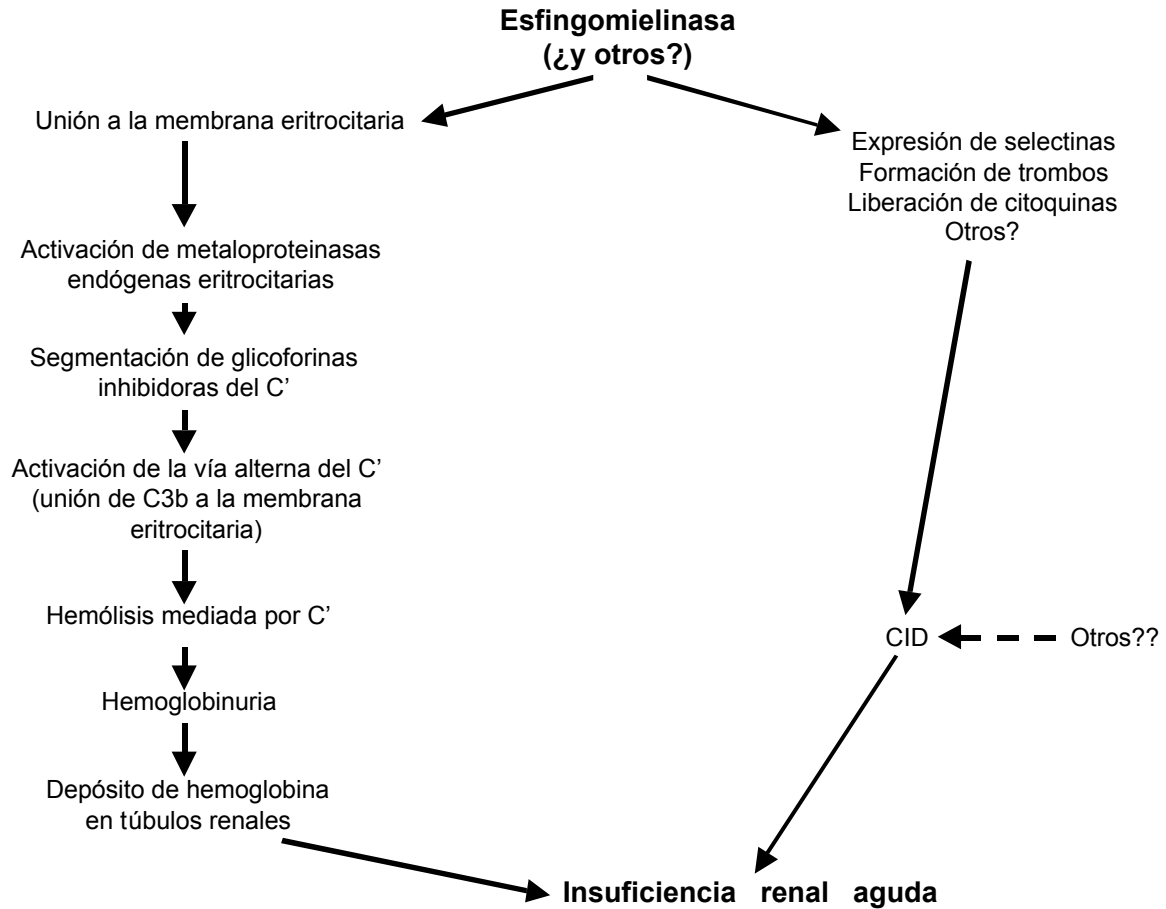


Figura 4. Respuesta fisiológica en el loxoscelismo viscerocutáneo. Modificado de De Roodt, 2002.

Recientemente, se ha propuesto al ácido lisofosfatídico (LPA) como posible molécula mediadora implicada en la fisiopatología del loxoscelismo (van Meeteren, 2004). Los lisofosfolípidos bioactivos, como el LPA y la esfingosina 1-fosfato (S1P), se encuentran involucrados en diversas respuestas celulares como son los procesos proinflamatorios. El LPA y la S1P resultan de la hidrólisis de lisofosfatidilcolina (LPC) y lisoesfingomielina (LSM), respectivamente (Fig. 5). Éstos lisoderivados de fosfolípidos de colina, se encuentran asociados a la albúmina presente en el suero humano en cantidades considerables (Miura, 2004).

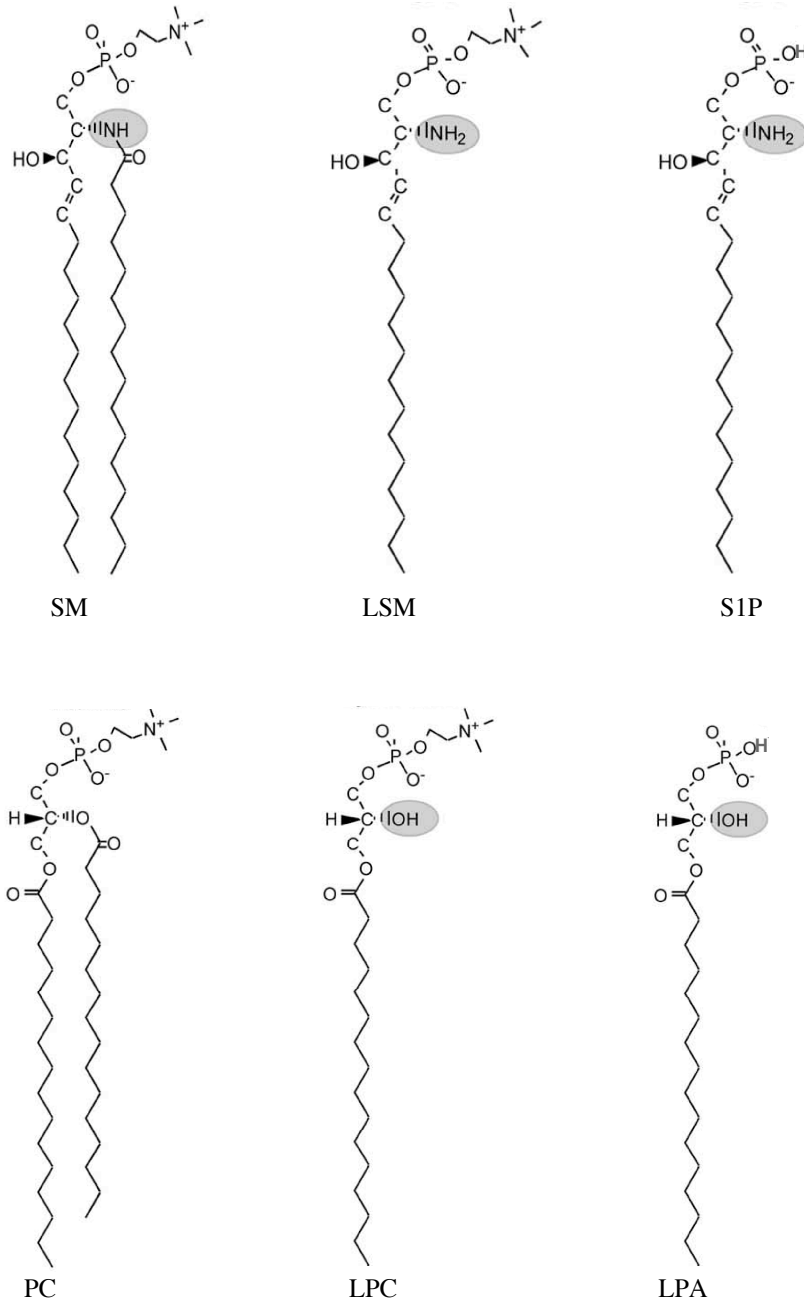


Figura 5. Estructura de fosfolípidos presentes en membrana y sus lisoderivados.

SM: esfingomielina; LSM: lisoesfingomielina; S1P: esfingosina 1-fosfato; PC: fosfatidilcolina; LPC: lisofosfatidilcolina; LPA: ácido lisofosfatídico.

El ácido lisofosfatídico liberado por la hidrólisis de LPC, se une a receptores acoplados a proteínas G de diferentes tipos celulares provocando diversas respuestas, entre ellas agregación plaquetaria (Moolenaar, 1999). Por observaciones *in vitro* de la actividad de la SMD sobre LPC acoplada a la albúmina sérica, se han hecho extrapolaciones a lo que posiblemente sucede cuando la

SMD entra en contacto con la sangre. La LPC presente en la sangre sería hidrolizada generando LPA, el cual entraría contacto con los receptores antes mencionados, lo cual es suficiente para desencadenar respuestas biológicas similares a las observadas en los casos de loxoscelismo (van Meeteren, 2004)

Bioquímica y acción de la esfingomielinasa

La esfingomielina (SM) o ceramida fosforilcolina, consiste de una unidad de ceramida y una molécula de colina unida (Fig. 6). Es un fosfolípido constituyente de la capa externa de la membrana celular, además es el esfingolípido más abundante en diversos tejidos. Puede representar hasta el 50% de los lípidos en ciertos tejidos, pero casi siempre es menos abundante que la fosfatidilcolina. Por ejemplo, en el cerebro representa el 10% de los lípidos totales, mientras que en eritrocitos de varios ungulados reemplaza por completo a la fosfatidilcolina. Generalmente, los ácidos grasos sustituyentes son de cadena hidrocarbonada larga saturados y monoinsaturados. Las proporciones absolutas de cada ácido graso varían notablemente entre tejidos y entre especies (Ramstedt *et al.*, 1999; Ramstedt & Slotte, 2002)

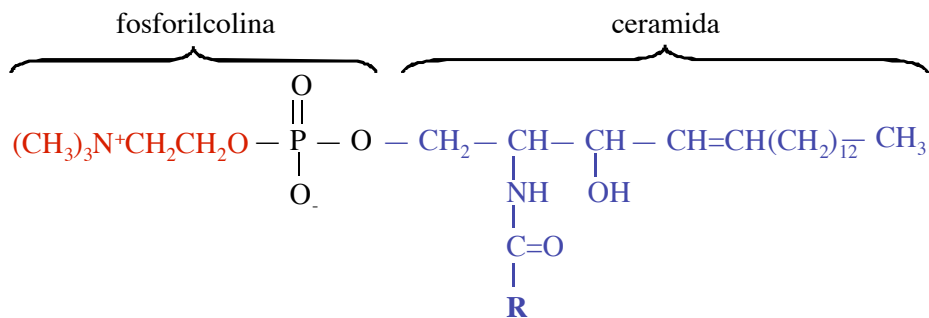


Figura 6. Estructura general de la esfingomielina. **R**: acilo sustituyente variable

Las esfingomielinasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de esfingomielina y son clasificadas de acuerdo con el sitio de hidrólisis sobre el sustrato (Fig. 7). Las esfingomielinasas son bien conocidas desde hace años, pero se ha incrementado el interés en estas a raíz del descubrimiento de la vía de señalización intracelular mediada por esfingomielinasas C endógenas, donde la ceramida es un segundo mensajero en apoptosis, diferenciación y proliferación celular (Levade *et al.*, 1999). La esfingomielinasa D (SMD) hidroliza la esfingomielina liberando colina y ceramida 1-fosfato (Cer-1-P).

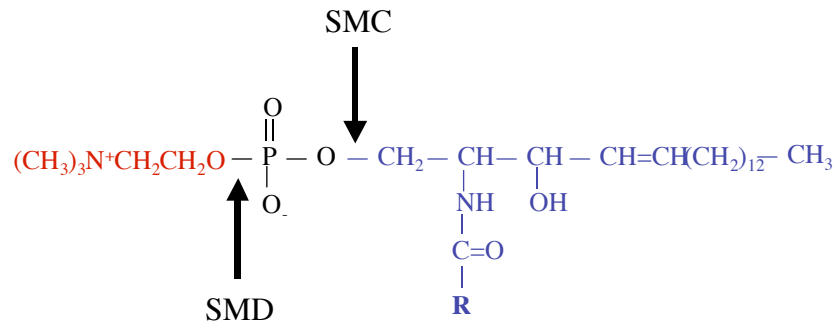


Figura 7. Sitio de hidrólisis de las esfingomielinasas. SMC: esfingomielinasa tipo C hidroliza SM liberando fosfocolina y ceramida. SMD: esfingomielinasa tipo D hidroliza SM liberando colina y fosfoceramida.

Se han caracterizado diversas esfingomielinasas: Goñi et al (2002) reportan cinco tipos de esfingomielinasa C presentes en varios tejidos animales: neutra, ácida, alcalina, dependiente de cationes y secretora; así como una esfingomielinasa-fosfolipasa C bacteriana (α -toxina *Clostridium perfringens* y el producto del gen *pclB* de *Listeria monocytogenes*). Bernheimer *et al.*, (1985) reportan la caracterización de una esfingomielinasa D bacteriana (Cor-PLD de *Corynebacterium pseudotuberculosis*) bioquímicamente similar a la SMD de *Loxosceles* sp. Solo se han reportado actividades de esfingomielinasa D (SMD) con efectos necróticos en el veneno de las arañas del género *Loxosceles* y en la bacteria del género *Corynebacterium*; no se han encontrado registros de actividad de SMD en células de mamíferos (Gómez-Muñoz, 2004). Si bien los mamíferos no cuentan con dicha actividad, pueden sintetizar Cer-1-P a través de la fosforilación de ceramida catalizada por cinasa de ceramida. A la Cer-1-P se le están encontrando importantes funciones bioactivas; por ejemplo, es mitogénica en fibroblastos, bloquea apoptosis en macrófagos y promueve la inflamación a través de la activación de la PLA₂ citosólica (Gómez-Muñoz, 2004).

SMD recombinantes de *Loxosceles*

En el Instituto de Biotecnología se han caracterizado las tres isoformas de la SMD del veneno de *Loxosceles boneti* y dos de *L. reclusa*, siendo la isoforma 1 (SMD-1) la más abundante y la que tiene mayor actividad específica. Los genes correspondientes a las isoformas 1 y 3 de *L. boneti* (accession numbers: AY559844 y AY559845) y de las isoformas 1 y 2 *L. reclusa* (accession numbers: AY559846 y AY559847) han sido clonados y expresados (Ramos-Cerrillo, 2002). Las secuencias de las isoformas 1 y 2 de *L. laeta* se obtuvieron a partir de la secuencia publicada por Fernández-Pedrosa (2002).

La expresión de estos genes permitió la obtención de las proteínas recombinantes, las que son producidas con una etiqueta de seis histidinas, ya sea en el extremo amino o en el extremo carboxilo de la SMD. Esta etiqueta sirve para la purificación de la proteína por cromatografía de afinidad en una columna de agarosa acoplada a níquel.

JUSTIFICACIÓN

Como hemos visto, se conoce con bastante profundidad la fisiopatología del loxoscelismo cutáneo y viscerocutáneo. Sin embargo, se desconoce el perfil enzimático de la SMD presente en el veneno, es decir, la especificidad de sustrato (naturaleza química de la esfingomielina), requerimiento de cofactores y sensibilidad a pH, entre otros. Definir estos parámetros, además de su relevancia desde el punto de vista bioquímico, presentan un potencial para explicar la diferente susceptibilidad al veneno por parte de algunas especies de mamíferos. Esta suposición considera que la respuesta celular desencadenada por la actividad de la SMD pudiera depender, en gran medida, de la naturaleza de los grupos acilo que componen a las fosfoceramidas productos de la reacción enzimática.

OBJETIVOS

General

Caracterizar la actividad enzimática de la esfingomielinasa D del veneno de *Loxosceles*.

Particulares

1. Determinar el perfil de actividad en función del pH.
2. Determinar el perfil de actividad en presencia de cationes divalentes.
3. Determinar el efecto del citrato presente en el veneno natural.
4. Determinar la actividad sobre esfingomielinas purificadas de huevo, de eritrocitos de porcino, y de cerebro y leche de bovino
5. Determinar la actividad sobre esfingomielinas sintéticas con distintos acilos en cuanto a su número de carbonos y grado de saturación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Esfingomielinasa D recombinante

Los Laboratorios Silanes, S.A. de C.V. producen hasta 25 mg/4 L de cultivo de las proteínas recombinantes SMD-1 de *Loxosceles boneti* (rLb Tx 1), de *Loxosceles reclusa* (rLr Tx 1), y dos isoformas activas de *Loxosceles laeta* (rLl Tx 1 y rLl Tx 2) en un laboratorio de alta seguridad, por lo que contamos con abundante material de estudio. Estas proteínas recombinantes se producen con una etiqueta de histidinas, ya sea en el extremo amino [rLb Tx 1 (H6N), rLr Tx 1 (H6N), rLl Tx 1 (H6N)] o con la etiqueta en el extremo carboxilo [rLb Tx 1 (H6C), rLl Tx 2 (H6C)]. La cuantificación de proteína se realiza por el método del ácido bicinconínico (BCA, Pierce) siguiendo el protocolo estándar. Las proteínas recombinantes de *L. boneti* [rLb Tx 1 (H6N) y rLb Tx 1 (H6C)] corresponden a la misma isoforma con la etiqueta de histidinas en el extremo amino o carboxilo, respectivamente; mientras que las proteínas recombinantes de *L. laeta* [rLl Tx 1, rLl Tx 2] corresponden a dos isoformas con secuencias aminoacídicas distintas.

Es importante recalcar que todas las proteínas recombinantes, si bien sus actividades específicas y potencias no son iguales numéricamente, poseen la misma actividad enzimática, dermonecrótica y de letalidad en ratones que las proteínas nativas.

Esfingomielina (tipos, fuentes)

Los sustratos utilizados son de dos tipos: de fuentes naturales compuestos de mezclas de moléculas de esfingomielina (SM) con distintos residuos de ácidos grasos en los sustituyentes (Avanti, Matreya, SIGMA); o moléculas sintéticas 100% puras correspondientes a un solo tipo de SM, fosfatidilcolina (PC) o lisoderivados de fosfolípidos (definidos por su composición de grupos acilo) (Avanti, SIGMA). Tanto las SM naturales como los productos sintéticos fueron preparados considerando la masa molecular reportada por el proveedor (Descripción de los sustratos en el Apéndice I).

Reactivos

Las soluciones stock fueron preparadas utilizando agua destilada. A las enzimas necesarias para la cadena enzimática del ensayo basado en el protocolo del Kit Amplex™ Red (Molecular

Probes) se les midió la actividad específica para corroborar la actividad reportada por el distribuidor y preparar el stock siguiendo las indicaciones del protocolo de este kit.

Medición de la actividad enzimática utilizando como base el protocolo del Kit AmplexTM Red para esfingomielinasa de Molecular Probes.

El método original se basa en la detección de fluorescencia del producto final la resorufina, que absorbe mucho a una longitud de onda de 570nm con un coeficiente de extinción molar de $\epsilon=54,000$. El procedimiento se basa en tres pasos de reacciones enzimáticas acoplados en cadena, que al final produce resorufina como resultado de la oxidación del AmplexTM Red (AR). El primer paso de la reacción es la hidrólisis de la esfingomielina por la esfingomielinasa D, liberando colina y fosfoceramida. La segunda y tercera reacciones consisten en la acción consecutiva de otras dos enzimas: Colina Oxidasa (ChOx) y Peroxidasa (HRP). La colina es sustrato para la ChOx la cual produce betaína y H₂O₂; este último reacciona con el AR en presencia de HRP, en una reacción 1:1 generando una molécula colorida de resorufina (Fig. 8). Este método permite hacer ensayos continuos donde es necesario tomar lecturas a lo largo de un tiempo determinado (cinéticas). Las lecturas de absorbancia se hicieron en un lector de ELISA (Magellan).

Los reactivos del kit contienen MgCl₂, razón por la cual se procedió a preparar una solución stock de cada reactivo con buffer 10 mM Tris-HCl pH 7.5 sin adición del catión. Se midió la actividad enzimática de la colina oxidasa (SIGMA) y de la peroxidasa (Miles) y se preparó el stock respectivo a la concentración y actividad manejadas en el protocolo del kit. Asimismo, el Tritón X-100 y la esfingomielina de huevo (SIGMA) fueron preparados con buffer libre de magnesio. Para la disolución del AmplexTM Red se utilizó DMSO de grado analítico.

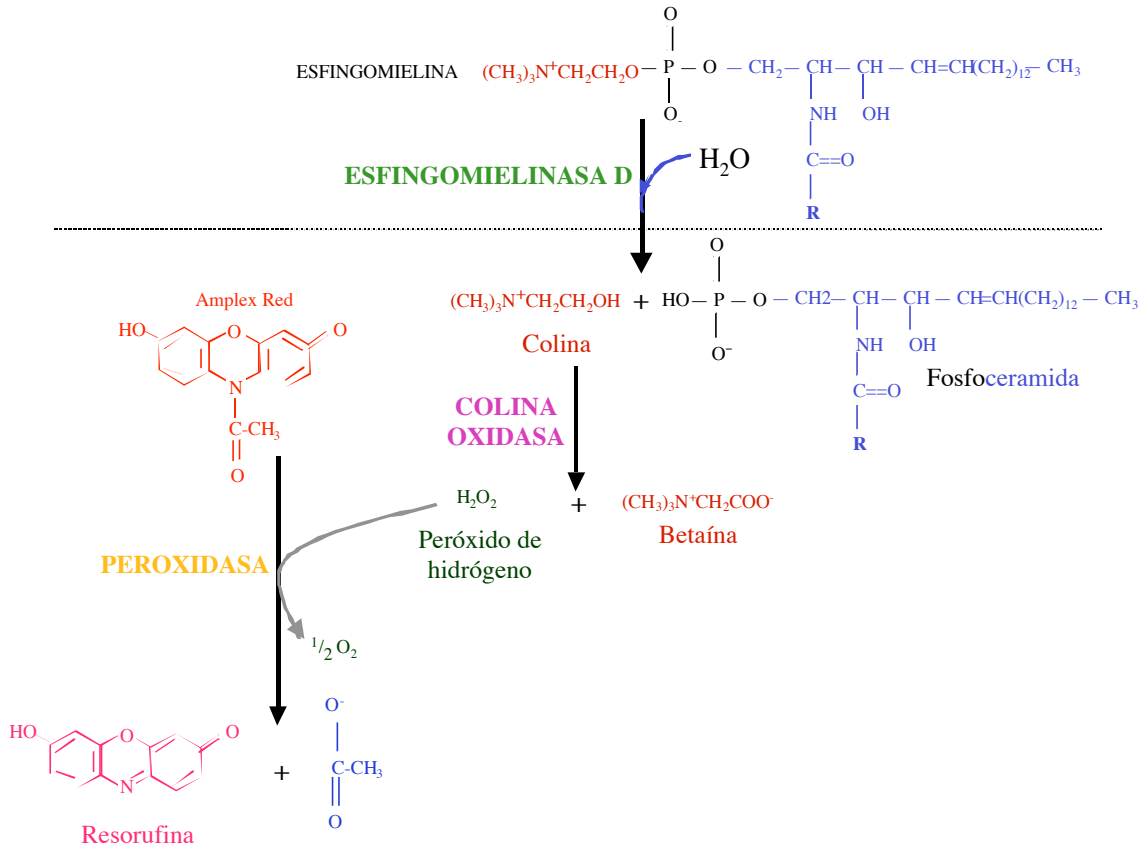


Figura 8. Mecanismo de acción del método colorimétrico con Amplex™ Red.

La línea punteada indica la separación de las dos principales reacciones enzimáticas: la parte superior corresponde a la actividad de SMD y la inferior al resto de la cadena enzimática acoplada.

El ensayo de actividad enzimática de SMD de las proteínas recombinantes se hizo en placas de ELISA de 96 pozos. La SMD recombinante correspondiente se prepara en buffer 10 mM Tris-HCl pH 7.5 a un volumen final de 100 μl por ensayo, la cantidad de enzima utilizada fue de 100 ng/pozo. La mezcla con el resto de las enzimas así como el sustrato, se preparó por separado en un volumen final de 100 μl por ensayo, por lo que el volumen final fue de 200 μl . En la Tabla 1 se muestra la cantidad que se utilizó de cada reactivo así como la concentración final en el ensayo estándar. Entre paréntesis se muestra la proporción que representa cada reactivo respecto del volumen de la mezcla.

Tabla 1. Componentes de la mezcla de reacción utilizada en el ensayo del AR

Reactivos	Cantidad (en 100 μ l)	Concentración final (en 200 μ l)
Colina Oxidasa	1 μ l (1/100)	0.1 U/ml
Peroxidasa	1 μ l (1/100)	12.5 mU/ml
Esfingomielina de huevo	10 μ l (1/10)	0.25 mM
Amplex TM Red	1 μ l (1/100)	0.05 mM
Buffer 5X	20 μ l (1/5)	10 mM
Agua	67 μ l (resto del volumen)	

Para medir el efecto de los cationes así como la actividad sobre distintos sustratos, el protocolo del ensayo estándar fue modificado de acuerdo a las variables de interés. Para el efecto de los cationes se mantuvieron las proporciones de los reactivos del ensayo estándar y se ajustaron las cantidades de los cationes con respecto al volumen final de reacción. La actividad sobre los diferentes sustratos se midió manteniendo la concentración final de éstos como en el del ensayo estándar (0.25 mM), además de la presencia de 0.5mM MgCl₂ en todos ellos.

Medición del efecto del pH sobre la actividad enzimática.

El efecto del pH sobre la actividad enzimática se midió utilizando una modificación del protocolo colorimétrico de Gatt *et al.* (1978). En este método el sustrato es una esfingomielina modificada en el residuo del ácido graso (Fig. 9), al cual está unida una molécula de ácido N- ω -trinitrofenil aminolaúrico (TNPAL-SM) y se mide la absorbancia a una longitud de onda de 330 nm en espectrofotómetro. Este método es apto para medir el efecto del pH específicamente sobre la actividad de la esfingomielinasa, debido a que no involucra una cadena enzimática (como en el protocolo del AR). El protocolo original fue modificado con base en nuestras observaciones previas (ver Tabla 2): utilizando 0.5 mM MgCl₂ (concentración final) en la mezcla de reacción donde originalmente se añade CaCl₂; las concentraciones de Tritón X-100 y esfingomielina se ajustaron de acuerdo a lo utilizado en los ensayos con AmplexTM Red.

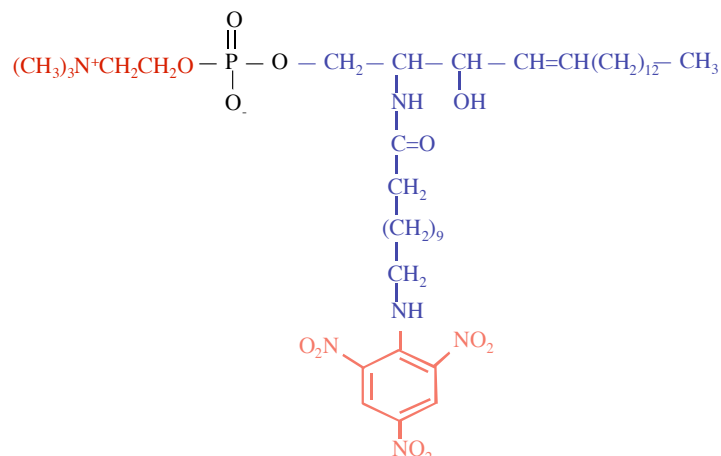


Figura 9. Esquema de una molécula de TNPAL-SM

La mezcla de reacción se preparó utilizando el protocolo modificado mostrado en la Tabla 2 en un volumen final de 200 μ l. La cantidad de SMD recombinante añadida es mayor respecto a la del ensayo con AR utilizando 1.4 μ g/ensayo. Esto es debido a que la sensibilidad de este ensayo es considerablemente menor que el realizado con AR, pues el coeficiente de extinción molar del TNPAL es de $\epsilon=14,000$. Se deja incubar dos horas a 37° C en agitación; la reacción es detenida añadiendo una solución de Isopropanol / Heptano / 5M H₂SO₄ (40:10:1; v/v) y se aplica agitación tipo vortex. Para la posterior separación de las fases, se añadieron 450 μ l de heptano y 400 μ l de agua; se aplicó agitación tipo vortex y se centrifugó a 14000 rpm por un minuto. La fase rica en heptano (superior) fue transferida a otro tubo y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 330 nm.

Tabla 2 Componentes de la mezcla de reacción utilizada en el ensayo con TNPAL-SM.

Reactivos	Protocolo según Gatt et al. (1978)	Protocolo modificado en este trabajo
TNPAL-SM	0.3 mM	0.3 mM
2% Tritón X-100	0.2 %	0.2 %
Buffer 1X (0.1M Tris-HCl pH 7.5)	10 mM	10 mM
CaCl ₂	0.06 mM	SIN CALCIO **
MgCl ₂	----	0.5 mM **
Agua	resto del volumen	resto del volumen

** modificaciones específicas al protocolo

Este protocolo se basa en el hecho de que el TNPAL-SM hidrolizado no presenta cargas y se encuentra en la fase hidrofóbica, debido a que la solución de Isopropanol / Heptano / 5M H₂SO₄, además de detener la reacción, permite mantener protonados los oxígenos presentes en el fosfato de la esfingomielina hidrolizada; mientras que el TNPAL-SM no hidrolizado sí presenta carga en la amina cuaternaria y por ello permanece en la fase hidrofílica (Fig. 10). Las lecturas de A_{330nm} representan los incrementos de absorbancia (Δ) al tiempo en que haya sido detenida la reacción.

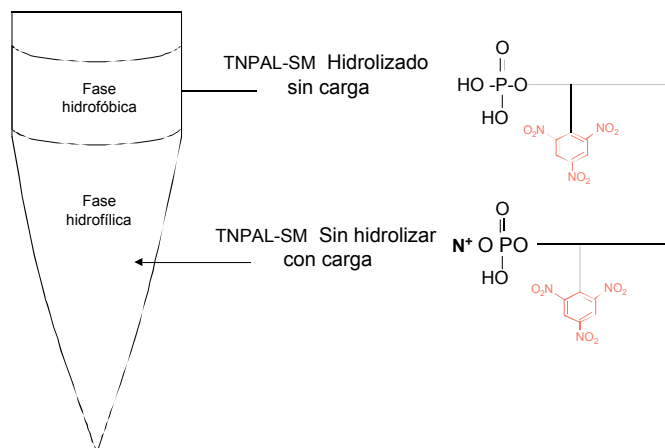


Figura 10. Separación del sustrato hidrolizado y no hidrolizado en el método de TNPAL-SM

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación de la actividad enzimática de las proteínas recombinantes de *Loxosceles*. Para corroborar el plegamiento correcto del material recombinante a utilizar, se midió la actividad de las enzimas utilizando los reactivos del ensayo estándar del método de Amplex™ Red (AR). Se encontró que la rLl Tx 2 (H6C) es la que tiene mayor actividad por mg de enzima; las proteínas rLb Tx 1 (H6C), rLb Tx 1 (H6N), y rLr Tx 1 (H6N) presentaron menor actividad específica. (Fig. 11).

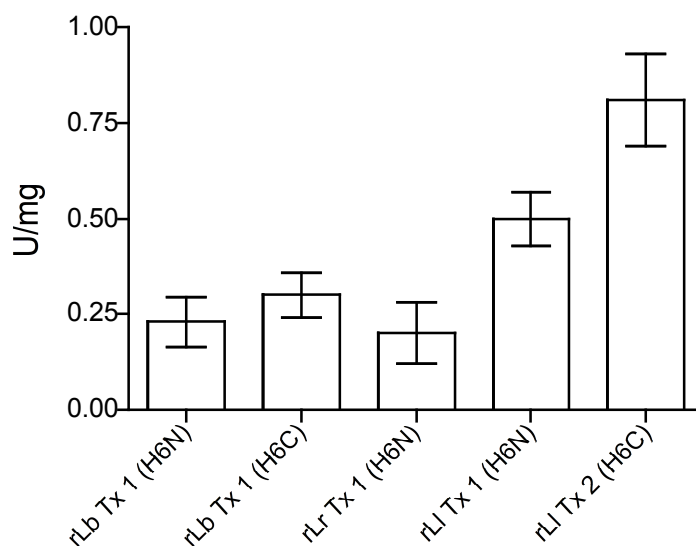


Figura 11. Ensayo de actividad de SMD de las toxinas recombinantes de *Loxosceles*. Proteína recombinante 100 ng/ensayo. Resultados de tres experimentos independientes, cada uno por triplicado.

Como las proteínas recombinantes rLb Tx 1 (H6C) y rLb Tx 1 (H6N) presentaron similar actividad específica y corresponden a la misma isoforma, se decidió caracterizarla utilizando solo la correspondiente a la expresada con la etiqueta en el extremo carboxilo.

Efecto de cationes divalentes sobre la actividad enzimática de las SMD recombinantes de *Loxosceles*. Como parte importante de la caracterización del efecto del veneno de *Loxosceles*, se consideró muy relevante definir varios de los parámetros enzimáticos como los requerimientos de cationes divalentes, por ello se midió su efecto sobre la actividad enzimática de las esfingomielinasas D recombinantes. Se realizaron ensayos de actividad frente a una concentración fija de CaCl₂, MgCl₂, MnCl₂ y ZnCl₂; así como 1mM EDTA. Por tratarse de un ensayo donde hay una cadena enzimática involucrada se probó el efecto de los cationes sobre las otras enzimas, iniciando la reacción a partir de la ChOx con cloruro de colina como sustrato (Fig. 12). Se observó que la presencia de EDTA, Mg²⁺ y

Ca^{2+} no tiene un efecto sobre la actividad de la ChOx, ya que es igual que el control sin adición de cationes o el quelante; y se observó un efecto inhibitorio en presencia de Mn^{2+} y Zn^{2+} . Por lo tanto, se procedió a probar el efecto de EDTA, Mg^{2+} y Ca^{2+} sobre la actividad de SMD (Fig. 13). Se observó un efecto estimulador del Mg^{2+} en relación a la SMD a la que no se le adicionó nada; el Ca^{2+} tuvo un efecto marcadamente inhibitorio mientras que el EDTA inhibió por completo la actividad enzimática.

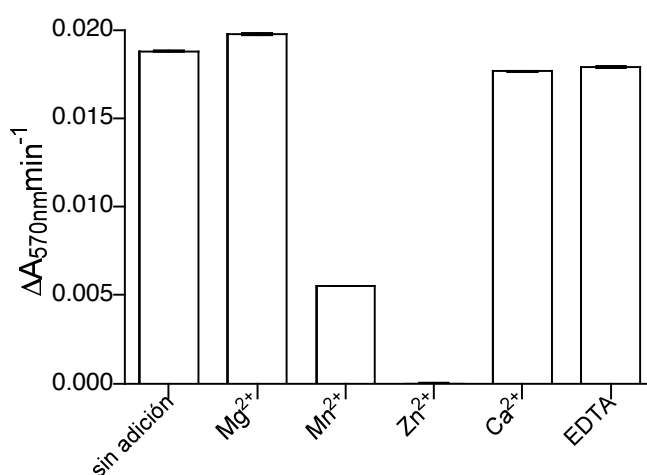


Figura 12. Actividad enzimática de la cadena Colina Oxidasa/ Peroxidasa en presencia de cationes divalentes. Ensayo a partir de Colina Oxidasa 0.01 U/ml por ensayo y Peroxidasa 12.5 mU/ml por ensayo; reacción iniciada al añadir cloruro de colina 1 mM. Los cationes se usaron en una concentración final de 10 mM y el EDTA en una concentración final de 1 mM. Resultados de dos experimentos, cada uno por triplicado.

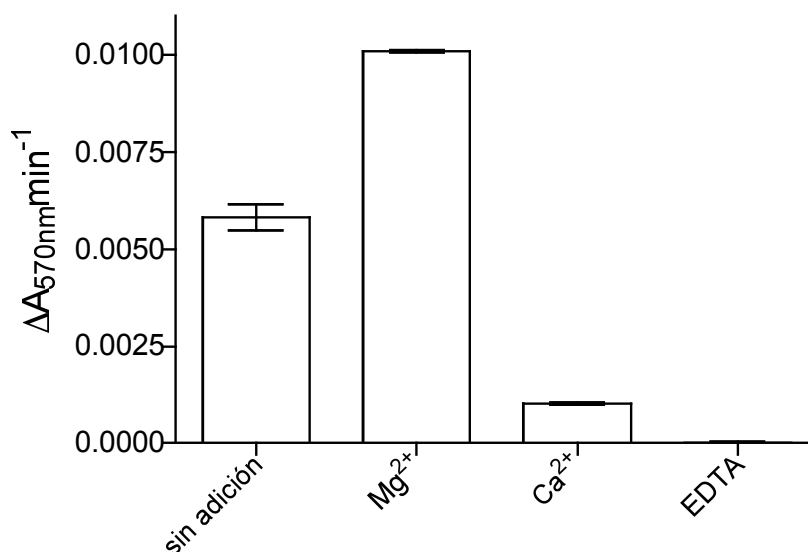


Figura 13. Efecto de cationes divalentes sobre la actividad de SMD de la recombinante rLb Tx 1 (H6C). Proteína recombinante 100 ng/ensayo; los cationes en una concentración de 10 mM y EDTA a 1 mM. Resultados de tres experimentos, cada uno por triplicado.

Efecto de la concentración de Ca^{2+} y Mg^{2+} sobre la actividad enzimática de las SMD recombinantes de *Loxosceles*. Se realizaron ensayos incubando las SMD en presencia de concentraciones crecientes de MgCl_2 (0-1.6mM). Se observó efecto estimulador de la actividad en desde 0.1 mM MgCl_2 (Fig. 14), observando que la máxima actividad se alcanza en un rango de concentración de 0.2 a 0.5 mM, no habiendo mayor estimulación hasta concentraciones de 1.6 mM

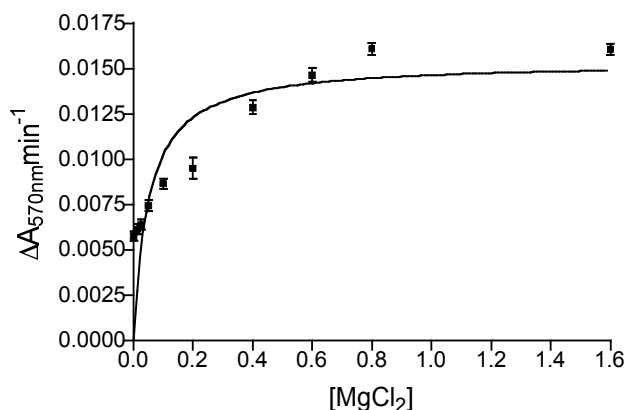


Figura 14. Velocidad enzimática de rLb Tx 1 (H6C) en presencia de MgCl_2 . Proteína recombinante 100 ng/ensayo; concentración variable de MgCl_2 . Resultados de tres experimentos, cada uno por triplicado.

De igual manera se ensayó la actividad frente a concentración variable de CaCl_2 (0-10 mM). El CaCl_2 tuvo un efecto inhibitorio sobre la actividad SMD desde una concentración de 0.5 mM, observándose la máxima inhibición desde 1 mM CaCl_2 (Fig. 15). En la Tabla 3 se muestran las actividades enzimáticas relativas de las cuatro SMD recombinantes donde el máximo de actividad (100%) se dió en presencia de 0.5 mM MgCl_2 . La actividad específica (U/mg) encontrada en condiciones de máxima velocidad también se reporta.

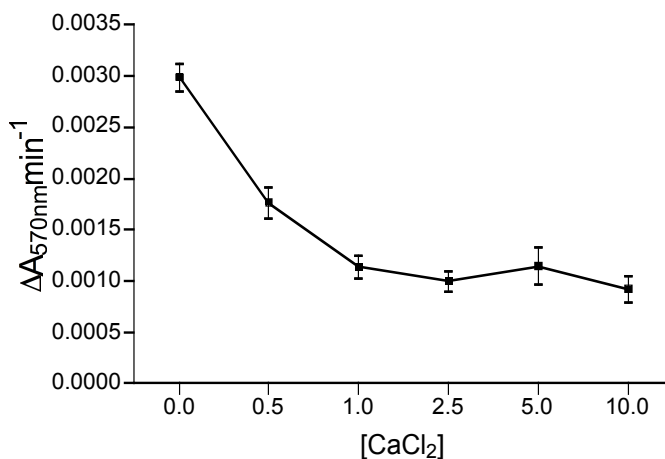


Figura 15. Velocidad enzimática de rLb Tx 1 (H6C) como modelo en presencia de CaCl_2 . Proteína recombinante 100 ng /ensayo; concentración variable de CaCl_2 . Resultados de tres experimentos, cada uno por triplicado.

Tabla 3. Efecto del $MgCl_2$ y $CaCl_2$ sobre la actividad SMD de las recombinantes de *Loxosceles*

	rLb Tx 1 (H6C)	rLr Tx 1 (H6N)	rLi Tx 1 (H6N)	rLi Tx 2 (H6C)
0.5 mM $MgCl_2$	100 %	100 %	100 %	100 %
Sin adiciones	36.4 %	34.1 %	36.8 %	29.4 %
10 mM $CaCl_2$	17.9 %	15.6 %	6.1 %	14.8 %
U/mg	0.7	0.5	0.5	1.6

El comportamiento de la cinética frente a concentración variable de Mg^{2+} muestra que hay una activación considerable de la función catalítica de la enzima, poniendo de manifiesto el requerimiento por Mg^{2+} . Cuando se habla de condiciones de activación, generalmente se refiere al requerimiento de la enzima o del sustrato por compuestos o moléculas para ser catalíticamente activos. Los activadores verdaderos, como los iones metálicos, son comunes en reacciones donde hay moléculas que presentan un grupo fosfato en su estructura; además de poder formar un complejo activo con el sustrato, se pueden combinar con la enzima libre en un sitio activador específico (Segel, 1975).

Determinación de las K_M 's aparentes para Mg^{2+} . Para calcular las constantes cinéticas K_M aparentes de las SMD en presencia de Mg^{2+} se utilizaron los datos obtenidos en los ensayos con concentraciones crecientes de éste. Se obtuvieron las gráficas (Fig. 16), se realizó un análisis de regresión no lineal para calcular los valores de K_M . Este análisis permitió obtener los valores de K_M en un rango de 4.3 a 42.3 μM (Tabla 4), para cada SMD (Fig. 16).

Las constantes cinéticas de K_M para Mg^{2+} , representan la afinidad de la enzima por este catión; los valores de K_M aparente obtenidos en este trabajo indican que el Mg^{2+} actúa como el cofactor natural de la SMD. Es importante notar que las concentraciones fisiológicas en el líquido extracelular, 0.5-0.8 mM (Bussiere *et al.*, 2002; Grau, 2002), son muy superiores a las K_M 's determinadas para las SMD recombinantes, por ello se puede considerar que el magnesio es un activador natural de la enzima.

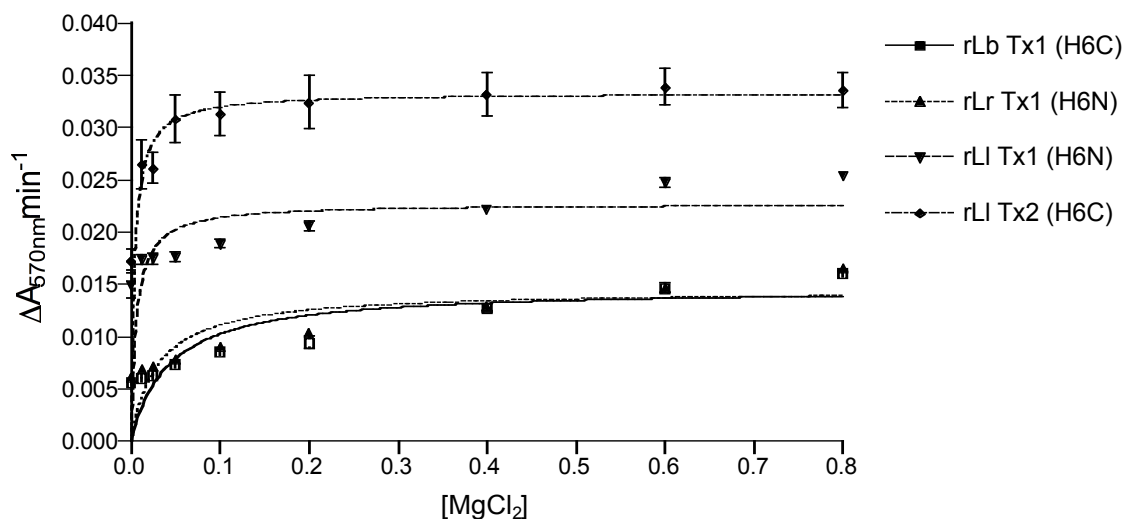


Figura 16. Velocidad enzimática en presencia de concentraciones variables MgCl_2 . 50 ng de rLI Tx 2 (H6C) por ensayo; para el resto de las SMD recombinantes se utilizó 100 ng proteína recombinante/ensayo; concentración variable de MgCl_2 . Resultados de tres experimentos, cada uno por triplicado.

Tabla 4. Valores de K_M aparente para Mg^{2+} de las SMD recombinantes de *Loxosceles*.

SMD recombinante	K_M aparente *
rLb Tx 1 (H6C)	42.3 ± 2.5
rLr Tx 1 (H6N)	29.9 ± 1.8
rLI Tx 1 (H6N)	6.2 ± 0.83
rLI Tx 2 (H6C)	4.3 ± 0.44

* Valores dados en concentración μM

Efecto inhibitorio del Ca^{2+} sobre la actividad de las SMD recombinantes. Con el fin de cuantificar el efecto inhibitorio del Ca^{2+} sobre la actividad SMD, se realizó el análisis de la inhibición enzimática utilizando la SMD-1 recombinante de *L. boneti* como modelo. Se montó un ensayo donde se utiliza CaCl_2 a concentración variable frente a MgCl_2 en concentraciones constantes (Fig. 17).

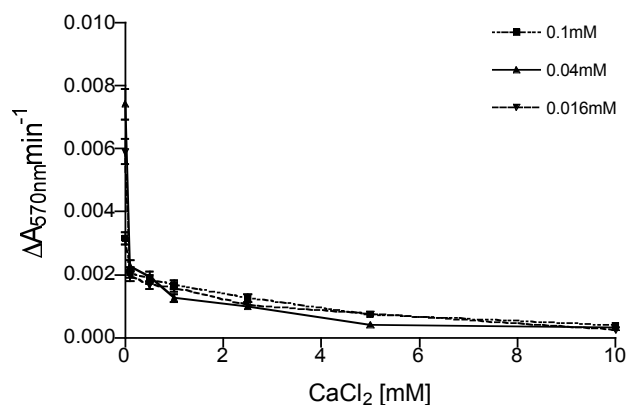


Figura 17. Efecto de Ca^{2+} sobre la actividad SMD de rLb Tx 1 (H6C). Proteína recombinante 100 ng/ensayo; concentración variable de CaCl_2 y concentraciones constantes de MgCl_2 . Resultados de tres experimentos, cada uno por triplicado.

Siguiendo el método de Dixon, se analizaron los ensayos donde se mantiene constante la concentración de magnesio y la concentración de calcio es variable. Se obtiene una gráfica al representar el inverso de la velocidad ($1/V$) frente a la concentración del inhibidor ($[I]$) en las diferentes concentraciones del cofactor, y dependiendo de las pendientes y su punto de intersección entre ellas se puede inferir el tipo de inhibición (Fig. 18).

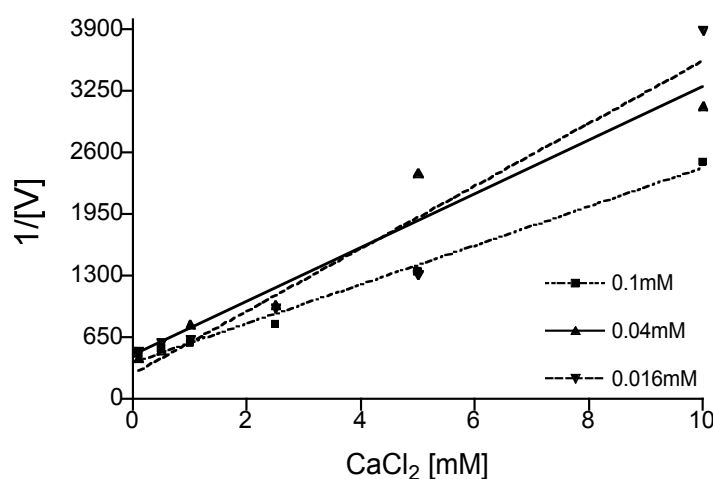


Figura 18. Inhibición de la actividad SMD de rLb Tx 1 (H6C) en presencia de Ca^{2+} . Concentración del inhibidor $[I]$ versus al inverso de la velocidad $1/[V]$; según método de Dixon.

El CaCl_2 actúa como inhibidor, disminuyendo la tasa de la actividad enzimática, sin llegar a la inhibición total. El comportamiento observado, indica que pudiera tratarse de una inhibición de tipo mixto (Segel, 1982), donde el inhibidor se une aleatoriamente a la enzima libre (E) y al complejo enzima-sustrato (ES) de manera reversible, formando el complejo (ESI) resultando en una disminución de la actividad de hasta el 80%. En el caso de una inhibición acompetitiva las rectas resultantes hubiesen sido paralelas entre sí, mientras que en una inhibición competitiva las rectas hubiesen intersectado en un punto. Es posible que el tipo de ensayo empleado (tres enzimas actuando en serie) no haya permitido obtener resultados más limpios.

Está bien explorado el requerimiento de cationes por parte de otras enzimas que hidrolizan ésteres de fosfato. Por ejemplo, la Ribonucleasa H1 de *E. coli* en presencia de Mg^{2+} presenta aumento de la actividad y que en presencia de Ca^{2+} disminuye considerablemente (Satheesan *et al.*, 2000). Se han propuesto modelos de interacción, basados en enlaces de coordinación entre los cationes, moléculas de agua y los residuos de aminoácidos situados cerca del sitio activo de la enzima además de factores cinéticos que favorecen la unión con Mg^{2+} . De esta manera, los enlaces con magnesio

favorecen la ubicación espacial de una molécula de agua cerca del grupo fosfato, lo que permite el ataque nucleofílico por parte de ésta y la posterior hidrólisis de la molécula de RNA. Al contrario, el calcio presenta comportamientos de sobre-coordinación, haciendo dos enlaces con un mismo residuo de la enzima y no con una molécula de agua, lo cual disminuye considerablemente la actividad (Satheesan *et al.*, 2000; Mordasini *et al.*, 2003). Murakami *et al.*, (2005) determinaron la estructura tridimensional de la SMD de *Loxosceles laeta* basados en cristalización y refracción de rayos X, y describen la interacción con el sustrato así como el sitio de unión a Mg^{2+} . En este se observa que el magnesio está octaédricamente coordinado con los oxígenos del carboxilato de los residuos Glu₃₂, Asp₃₄, Asp₂₉ y tres moléculas de agua, dos de las cuales también coordinan con el grupo fosfato del sustrato, lo cual concuerda con las propuestas de los modelos de interacción y coordinación propuestos para otras enzimas.

Inhibidores naturales presentes en el veneno de *Loxosceles*. Fenton *et al.*, (1995) reportan el efecto inhibitorio del citrato sobre la acción de fosfolipasa A₂ del veneno de abeja; en esta publicación también reportan la presencia de citrato (16mM) en el veneno de *Loxosceles reclusa*, sin embargo no indican si tiene efecto inhibitorio sobre la actividad SMD. Se procedió a probar el efecto del citrato sobre la actividad SMD de la rLb Tx 1 (H6C) como modelo, preincubando con concentraciones variables de citrato desde 2mM hasta 16mM. Se observa la disminución de la actividad de SMD conforme aumenta la concentración de citrato (Fig. 19). A 16 mM hubo una inhibición de la actividad mayor de 95% respecto a la actividad en condiciones de estimulación en presencia de magnesio. Las otras SMD's recombinantes también fueron inhibidas más de 95% con 16 mM de citrato con excepción de la rLl Tx 2 (H6C) que solo fue inhibida 80%.

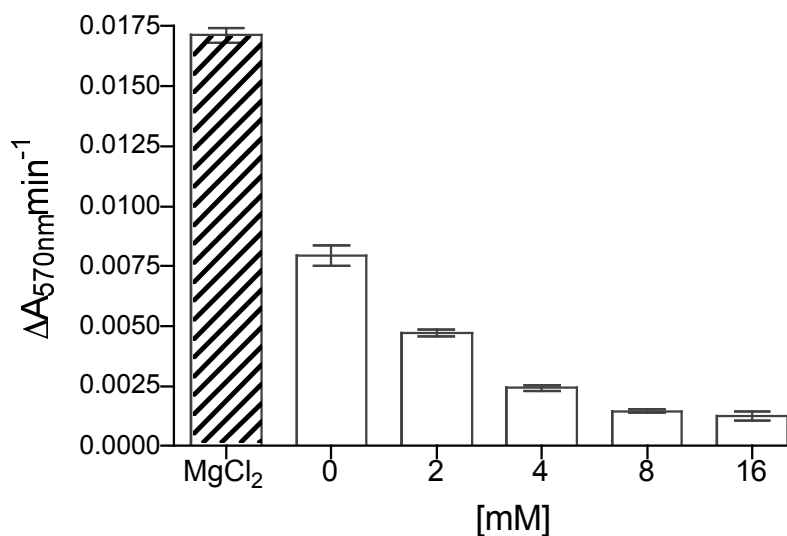


Figura 19. Efecto del citrato sobre la actividad SMD de la recombinante rLb Tx 1 (H6C) como modelo. Proteína recombinante 100 ng/ensayo; 0.5 mM MgCl₂; citrato de sodio en concentración variable (0-16 mM). Resultados de tres experimentos, cada uno por triplicado.

El citrato es un quelante con diferentes afinidades por los distintos cationes divalentes. Al parecer actúa quelando los iones metálicos que están unidos a la enzima de manera residual. El citrato tiene efecto inhibitorio sobre la actividad SMD recombinantes en la concentración reportada por Fenton *et al.* (1995) para el veneno de *L. reclusa*.

Con el fin de determinar la presencia de algún otro inhibidor natural en el veneno completo de *Loxosceles*, se procedió a probar el efecto de otras fracciones del veneno. Se utilizaron las fracciones de veneno obtenidas por cromatografía de exclusión molecular (Tabla 5), donde se distinguen cuatro fracciones principales (Ramos-Cerrillo, 2002).

Tabla 5. Relación de las fracciones de veneno obtenidas por cromatografía de exclusión molecular.
(Ramos-Cerrillo, 2002)

FRACCIÓN (Veneno de <i>L. boneti</i>)	TAMAÑO MOLECULAR ESPERADO (kDa)	COMPOSICIÓN	% RESPECTO AL VENENO TOTAL (100%=68.4 mg peso seco)
I	62	Hemocianina	8.39
II	32.5	SMD's	19.7
III	16	Proteínas pequeñas	9.74
IV	<16	Sales y nucleótidos	62.2

Se procedió a preincubar la toxina recombinante con 10 o 100 μg de las fracciones III y IV. Se incluyó un control sin adiciones como referencia de la actividad basal y un control en condiciones de estimulación de la actividad en presencia de 0.5mM MgCl_2 . No se observó disminución de la actividad SMD respecto a la actividad basal al preincubar con las fracciones III y IV (Fig. 20).

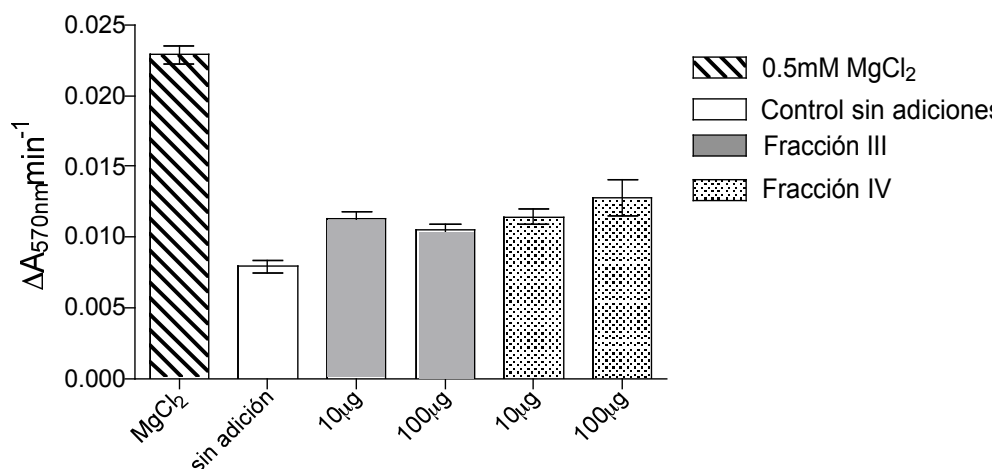


Figura 20. Efecto de otros componentes del veneno de *Loxosceles* sobre la actividad SMD (recombinante rLb Tx 1 (H6C) como modelo. Barras gris sólido: fracción III; barras punteadas: fracción IV. Proteína recombinante 100 ng /ensayo; 10 o 100 μg de cada fracción. Resultados de dos experimentos, cada uno por triplicado.

Probablemente el citrato si sea un inhibidor natural presente en el veneno de *Loxosceles*, sin embargo no fue posible demostrarlo al utilizar las fracciones de veneno. No se detectó algún efecto inhibidor con las fracciones de veneno probadas, al contrario podría considerarse que hay una estimulación significativa. Este efecto parece ser resultado de la presencia de trazas de SMD en las últimas fracciones del veneno.

Efecto del pH sobre la actividad enzimática de las SMD recombinantes de *Loxosceles*. Para determinar el efecto del pH sobre la actividad enzimática no es posible utilizar el método de la cadena enzimática ya que está involucradas tres enzimas. Por ello, optamos por utilizar una modificación del método de TNPAL-SM (Gat *et al.*, 1978). Este permitió probar distintos buffers cubriendo un amplio rango de pH (3.6-10.5). Se utilizó la SMD-1 recombinante de *L. boneti* como modelo (Fig. 21) y la actividad obtenida en cada condición se comparó con la observada en buffer Tris-HCl pH 7.5 (buffer de referencia).

Se encontró que a pH ácido (rango 3.6-6 con buffer AcOH/AcONa) disminuyó la actividad de la SMD considerablemente, recuperándose conforme aumenta el pH y alcanzando un máximo a pH 6 equiparable al observado con el buffer de referencia. En presencia del buffer $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ (rango 6-8) se observó que la actividad se mantiene en un intervalo de 0.58 a 0.75; la actividad específica en este buffer al pH correspondiente al buffer de referencia es 0.2 unidades mayor. La actividad en el buffer Tris-HCl (rango 7.2-9) se observó que el máximo de actividad se obtuvo en los valores de pH 7.2 y 7.5, acorde a los requerimientos de pH del AmplexTM Red; y ésta disminuye drásticamente al volverse más alcalino el medio. Cuando se utilizó el buffer Glicina/NaOH (rango 8.6-10.5) la actividad fue hasta cinco veces mayor que en el buffer Tris-HCl en los puntos de solapamiento (pH 8.6 y 9), y la actividad a pH 9.5 es similar a la que se observa en el buffer de referencia. Al analizar el efecto del buffer Tris-HCl añadiéndole 10 mM glicina (rango de pH 7.2-9), se observó un comportamiento en campana con un punto máximo de actividad a pH 8 (1.24 U/mg); además se encontró que la actividad es igual a la observada en buffer Glicina en los puntos de solapamiento a pH 8.6 y 9.

Considerando la actividad observada en Tris-HCl a pH 7.5 como referencia, se aprecia que la actividad en $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ es 30 % mayor; por otro lado la actividad en Tris/HCl + Glicina donde aumenta cerca del 60 %. Esto parece indicar que la composición del buffer, más que el pH, está determinando la actividad específica. Por otro lado, la actividad en presencia de los dos buffers que contienen glicina correlacionan muy bien en los puntos de solapamiento (pH 8.6 y 9) con lo que se puede concluir que la glicina tiene un efecto sobre la actividad. Se propone explorar estos rangos de pH con otro tipo de buffer, lo cual permitiría aclarar el efecto del pH y/o el de la glicina presente en ese buffer.

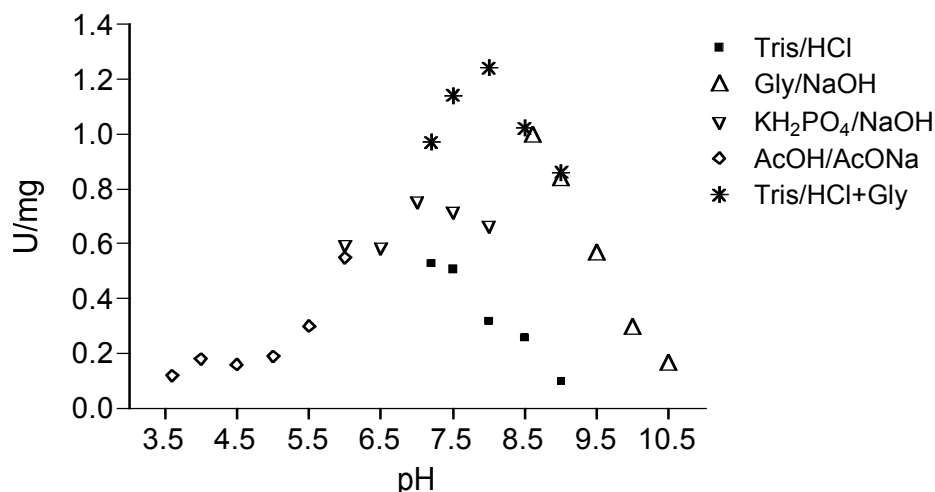


Figura 21. Efecto del pH sobre la actividad SMD (rLb Tx 1 (H6C)) como modelo 370 ng de proteína recombinante/ensayo; 0.5 mM MgCl₂; 10 mM de los buffers utilizados. Composición de los buffers en el apéndice I.

En general, las enzimas son activas en un rango restringido de pH y presentan un pH óptimo definido, el cual puede estar afectado por la combinatoria de factores como la temperatura, la fuerza iónica, la naturaleza de los componentes del buffer, etc (Segel, 1975; Dixon, 1979). Las variaciones en pH tienen efectos tanto en la estructura de la proteína como en la manera y la fuerza de unión de los grupos prostéticos; asimismo, tiene efectos en la ionización del sustrato, en la unión del complejo ES y en la reactividad de la catálisis (Mahler & Cordes, 1966). Para probar el efecto de pH sobre la actividad de una enzima es necesario explorar un amplio rango de pH y esto solo es posible utilizando diferentes tipos de buffers en cuanto a su composición, para así poder comprobar que es el pH y no los componentes del buffer los que afectan las condiciones antes mencionadas. Hay que recalcar que el sustrato utilizado en este método es un análogo de la SM modificado en el acilo, donde tiene unida una molécula de TNPAL con un anillo aromático. Sin embargo la actividad específica se mantiene en el mismo orden de magnitud cuando se le compara con la actividad específica medida con el método del AmplexTM Red (Tabla 6).

Tabla 6. Actividad específica de rLb Tx1 (H6C) en varios pH's y buffers distintos.

Buffer	U/mg (μ mole de TNPAL-SM hidrolizado por minuto por mg de SMD)
AcOH/ AcONa pH 6	0.14
KH ₂ PO ₄ / NaOH pH 7-7.5	0.2
Tris-HCl pH 7.2-7.5	0.14 * (0.6)
Gly/ NaOH pH 8.6	0.27
Tris /Gly pH 8	0.33

Columna A: Buffers utilizados en el ensayo. Columna B: máxima actividad específica (U/mg) con el método de TNPAL-SM en cada buffer. (*) Método AR U/mg (μ mole de resorufina producida por minuto)

Para el caso de la SMD de *Loxosceles* el rango de máxima actividad es en el neutro-alkalino. Se probaron distintos buffers cubriendo el rango de pH de 3.6 a 10.5. Observando los resultados obtenidos con los buffers AcOH/AcONa y KH₂PO₄/NaOH, claramente se aprecia que la composición del buffer no tiene efecto sobre la actividad, ya que coinciden los puntos en que se traslapan los valores de pH. Por otro lado, la diferencia de los resultados con los buffers que cubren el rango de 7.2 a 8 nos indican que la composición del buffer si tiene efecto sobre la actividad. El pH al cual se observó un máximo de actividad fue con el buffer 10mM Tris/HCl 10mM Glicina pH 8. La actividad a pH 7 con buffer 10mM Tris/HCl fue solo del 40% con respecto a la misma a pH 8. La glicina, como ya mencionamos, tiene un efecto estimulador favoreciendo mayor actividad enzimática.

Actividad de las SMD recombinantes de *Loxosceles* sobre esfingomielinas con distintas composiciones. Con el fin de definir la especificidad de sustrato de la SMD se modificó el protocolo del Kit AmplexTM Red, sustituyendo el sustrato estándar por varios tipos de esfingomielina. Para ello, además del sustrato estándar (esfingomielina de huevo), se probaron SM de tres fuentes naturales (entre paréntesis se indica el componente acílico mayoritario reportado por el proveedor): cerebro (18:0 SM), glóbulos rojos (misceláneos) y leche (23:0 SM). Igualmente se analizó la hidrólisis de sustratos sintéticos: seis tipos de SM (Acetil 2:0 SM; Hexanoil 6:0 SM; Lauroil 12:0 SM; Palmitoil 16:0 SM; Estearoil 18:0 SM y Oleoil 18:1 SM), un tipo de fosfatidilcolina (PC) y dos lisoderivados (lisofosfatidilcolina, LPC y lisoesfingomielina, LSM).

De manera general para todas las recombinantes, se observó actividad enzimática diferencial sobre los sustratos, obteniendo un máximo de actividad con 6:0 SM. En presencia de sustratos de fuentes naturales las SMD recombinantes no presentaron diferencia significativa en la actividad enzimática; para rLb Tx1 (H6C) se aprecia un ligero aumento de la actividad enzimática en presencia de las otras SM de fuentes naturales, respecto a la SM de huevo. Sin embargo, para las otras tres recombinantes, esta actividad se mantiene en el mismo rango independientemente de la fuente del sustrato (Fig. 22).

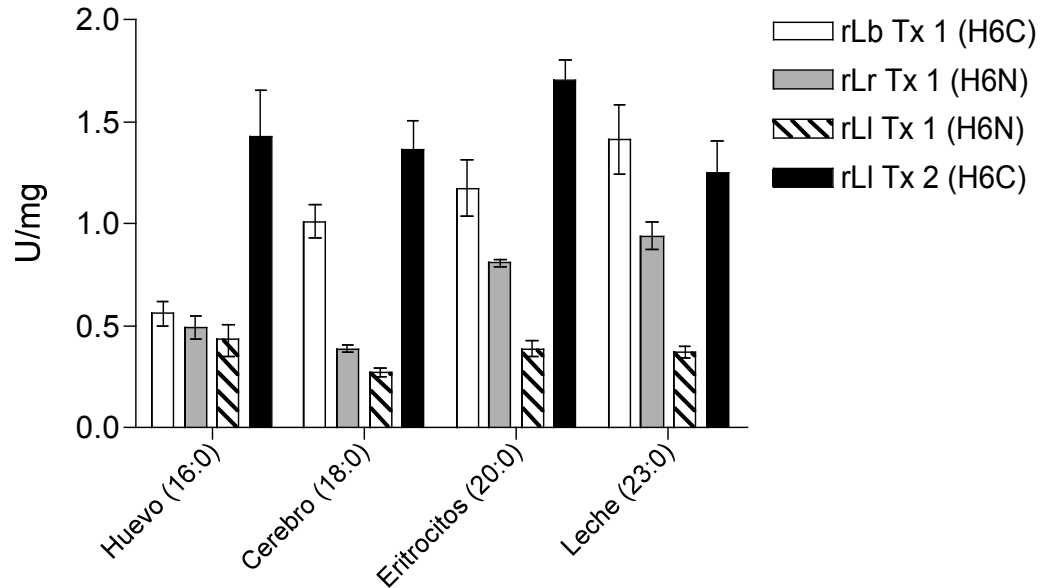


Figura 22. Actividad específica de las SMD recombinantes sobre SM de fuentes naturales. 50 ng de rLI Tx 2 (H6C) por ensayo; para el resto de las SMD recombinantes se utilizó 100 ng proteína recombinante/ensayo; 0.5 mM $MgCl_2$ y 0.25 mM de los sustratos ensayados. Resultados de dos experimentos, cada uno por triplicado.

Al incubar las SMD en presencia de PC o con los lisoderivados, no se detectó actividad enzimática considerable. Cuando se incubó con el sustrato 2:0 SM se observó incremento en la actividad enzimática, hasta el doble de lo que presentaron con el sustrato estándar. Considerando que la diferencia entre el sustrato 2:0 SM y la LisoSM es la presencia del grupo acetoil como grupo sustituyente, se puede asumir que la presencia del acilo, aun siendo la cadena más corta posible de dos carbonos, es necesaria para que se observe actividad de SMD sobre la esfingomielina. La máxima actividad se observó en presencia de 6:0 SM, la cual incrementó de 2.5 a 3 veces respecto al sustrato estándar; la actividad disminuyó conforme aumenta el largo de la cadena del acilo sustituyente (12:0, 16:0 y 18:0). En el caso del sustrato 16:0 SM la actividad de las cuatro SMD es similar a la detectada con el sustrato estándar (SM de huevo). En presencia del acilo 18:0 la actividad es bajísima, excepto para el caso de la rLI Tx 2 (H6C) que presentó actividad casi equivalente a la observada con el sustrato estándar. Para las cuatro SMD recombinantes se observó recuperación de la actividad al

incubar con el sustrato 18:1 SM, con actividades específicas inclusive mayores a las observadas con el sustrato estándar, al parecer la insaturación en la cadena influye en este efecto. De igual manera la rLI Tx 2 (H6C) presentó mayor actividad específica que las otras tres recombinantes (Fig. 23).

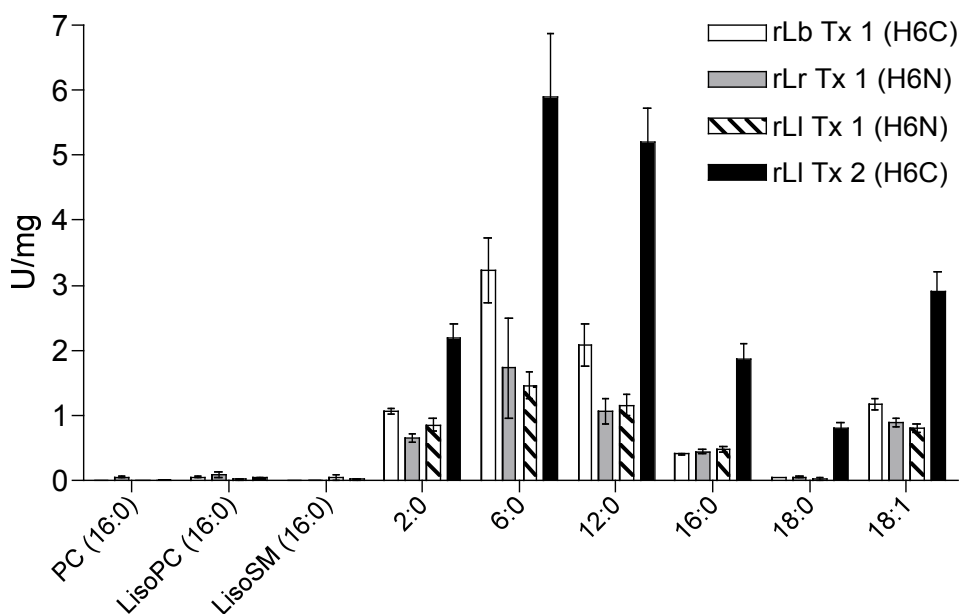


Figura 23. Actividad específica de las SMD recombinantes sobre SM sintéticas. 50 ng de rLI Tx 2 (H6C) por ensayo; para el resto de las SMD recombinantes se utilizó 100 ng proteína recombinante/ensayo; 0.5 mM $MgCl_2$ y 0.25 mM de los sustratos ensayados. Resultados de dos experimentos, cada uno por triplicado.

En la Fig. 24 se muestra la actividad enzimática como porcentaje de actividad para comparar la actividad enzimática sobre los sustratos naturales y los sintéticos; considerando que todas las SMD recombinantes presentaron máxima actividad en presencia de hexanoil-esfingomiélinea (6:0 SM) ésta se refiere como el 100%. La actividad de cualquiera de las toxinas sobre el sustrato de huevo (16:0) y el sintético 16:0 no es significativamente diferente, lo cual indica una actividad real sobre la SM mayoritaria de huevo. La actividad sobre el sustrato de cerebro (ácido mayoritario 18:0) es considerablemente mayor que la observada con el sustrato sintético 18:0. Este comportamiento puede ser debido a que la actividad es sobre las SM de ácidos distintos a 18:0 en el caso de la fuente de cerebro o bien a que la presentación de este sustrato es diferente al estar mezclado con otras clases de SM, en contraste con lo que sucede con el sustrato sintético 18:0.

En el caso de los sustratos sintéticos la actividad específica fue disminuyendo conforme aumentó la cadena del ácido sustituyente (por ejemplo, hasta un 80% de disminución en el caso de rLI Tx 2), y se observó una recuperación al presentarse una insaturación en la cadena (ácido 18:1). Por el contrario, en los sustratos de fuentes naturales no se manifestó este efecto, pues aun en presencia de la

SM de leche, donde el acilo mayoritario es 23:0, la actividad es equiparable a la que hay con el sustrato estándar; cabe mencionar que si bien la presencia de este acilo en la mezcla no es más del 50%, sí es mayor que la del resto de los componentes que se encuentran en una proporción baja.

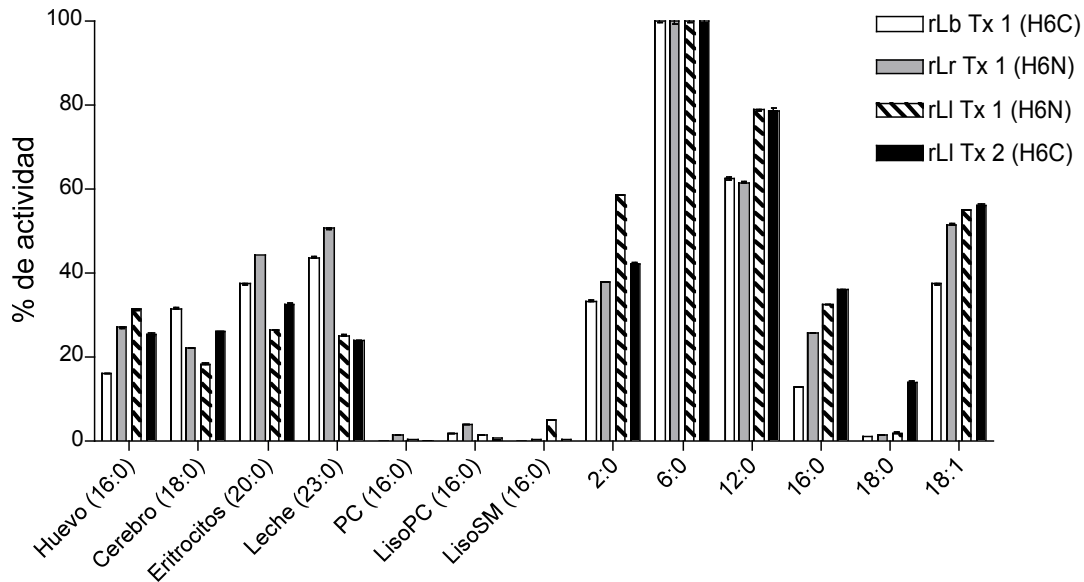


Figura 24. Actividad porcentual de las SMD recombinantes sobre diferentes sustratos. 50 ng de rLI Tx 2 (H6C) por ensayo; para el resto de las SMD recombinantes se utilizó 100 ng proteína recombinante/ ensayo; 0.5 mM MgCl₂ y 0.25 mM de los sustratos ensayados. Resultados de dos experimentos, cada uno por triplicado.

Por otro lado, van Meeteren *et al.* (2004) reportaron actividad de la SMD de *L. laeta* sobre lisofosfatidilcolina (LPC), cuando es presentada acoplada a albúmina sérica libre de ácidos grasos. Para este trabajo ellos realizan un experimento donde la SM es añadida como micela sencilla, es decir no como micela mixta en presencia de tritón X-100; y los lisoderivados (LPC y LSM), además de la ausencia de tritón, los presentan conjugados a albúmina libre de ácidos grasos. Reportan que la SMD de *L. laeta*, tiene actividad sobre micelas de SM libres de tritón, así como sobre LPC conjugada a albúmina equiparable a la observada con SM.

Se procedió a ensayar las condiciones planteadas en esta publicación utilizando el método colorimétrico de AmplexTM Red. Se utilizó rLb Tx 1 (H6C) como modelo para medir la actividad enzimática de SMD frente a SM presentada como micelas sencillas (en ausencia de Tritón X-100), así como lisoderivados (LPC y LSM) conjugados a albúmina sérica humana libre de ácidos grasos (HSA). Se incluyeron las condiciones control similares a los ensayos previos donde la SM y los lisoderivados fueron presentados como micelas mixtas con tritón X-100; así como una condición donde a la SM con tritón se le añadió albúmina sérica humana libre de ácidos grasos (SM_{Tri/HSA}) (Fig. 25).

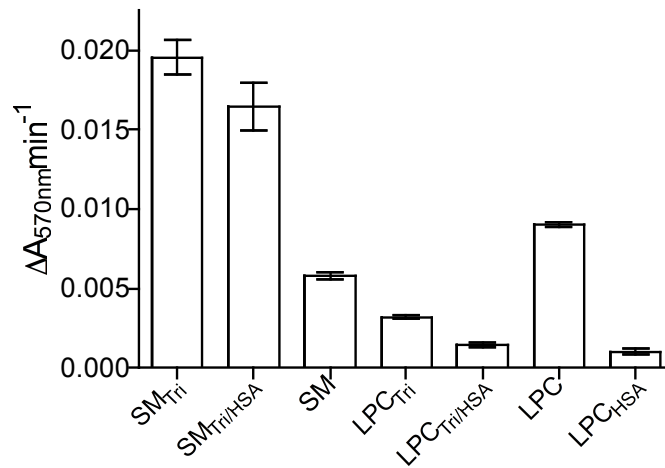


Figura 25. Efecto de la presencia de albúmina sobre la actividad SMD de rLb Tx 1 (H6C). SM_{Tri}: SM emulsificada con tritón; SM_{Tri/HSA}: emulsificada con tritón y con albúmina presente SM: SM presentada como micela sencilla libre de tritón; LPC_{Tri}: LPC emulsificada con tritón; LPC_{Tri/HSA}: emulsificada con tritón y con albúmina presente; LPC: LPC presentada como micela sencilla libre de tritón; LPC_{HSA}: LPC presentada como micela sencilla libre de tritón y conjugada a albúmina sérica humana libre de ácidos grasos. Proteína recombinante 100 ng / ensayo; 0.5 mM MgCl₂ y 0.25 mM de los sustratos ensayados. Resultados de tres experimentos, cada uno por triplicado.

Comparando con la actividad SMD en las condiciones estándar (SM_{Tri}), se observó disminución de la actividad hasta un 30 % cuando la SM es añadida como micela sencilla (SM). Como ya habíamos demostrado, la actividad frente a LPC en las condiciones estándar (LPC_{Tri}) es bajísima, así como al ser presentada conjugada a albúmina libre de ácidos grasos con o sin tritón (LPC_{Tri/HSA} o LPC_{HSA}). Se incluyó la condición donde la LPC fue presentada como micela sencilla, es decir, libre de tritón (LPC), observándose actividad considerable, aproximadamente la mitad de la observada frente a SM en el ensayo estándar.

Se procedió a probar la SMD recombinante rL1 Tx 2 (H6C) la cuál es homóloga a la utilizada por van Meeteren, *et al.* El control del ensayo estándar se mantiene constante respecto a otros ensayos, así mismo, el comportamiento sobre SM como micela sencilla (sin tritón) es similar al que presenta rLb Tx1 (H6C). La actividad sobre el sustrato LPC conjugado a albúmina libre de ácidos grasos disminuye hasta 40% respecto al control, por otra parte, al ser presentado como micela sencilla se observó una actividad equiparable a la que presenta sobre SM en las condiciones del ensayo estándar. Se observó incremento de la actividad sobre LPC al presentarla como micela sencilla (sin tritón). (Fig. 26).

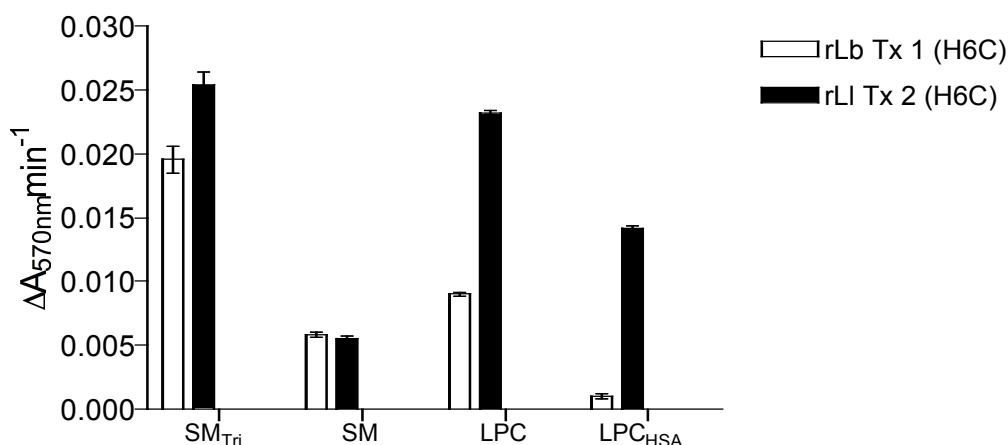


Figura 26. Actividad de las SMD recombinantes sobre LPC. SM_{Tri}: SM emulsificada con tritón; SM_{Tri (-)}: SM presentada como micela sencilla libre de tritón; LPC_{Tri (-)}: LPC presentada como micela sencilla libre de tritón; LPC_{HSA}: LPC conjugada a albúmina sérica humana libre de ácidos grasos. 50 ng de rLI Tx 2 (H6C) por ensayo; 100 ng rLb Tx 1 (H6C) por ensayo; 0.5 mM MgCl₂ y 0.25 mM de los sustratos ensayados. Resultados de tres experimentos, cada uno por triplicado.

Al probar estas condiciones con el ensayo de AR, se corrobora que tiene actividad considerable sobre LPC cuando es presentada conjugada a albúmina, y por el contrario no concuerdan los resultados de la actividad reportada sobre SM añadida como micela sencilla, ya que en los ensayos de esta tesis la actividad es hasta cuatro veces menor en esta condición. Por otro lado, la actividad sobre LPC es mayor cuando es presentada como micela sin tritón que cuando está conjugada a albúmina.

Con el fin de determinar el valor de K_M aparente por sustrato de la SMD, utilizando rLb Tx 1 (H6C), se midió la velocidad de reacción con varias concentraciones de sustrato. Se empleó tanto el sustrato sintético palmitoil-SM (acilo 16:0) como el sustrato con el que se observó mayor actividad específica (acilo 6:0). La toxina fue ensayada frente a concentración variable de los sustratos (0-350 μM). El valor de K_M aparente calculado para el sustrato 6:0 SM fue de $77.31 \pm 28.7 \mu\text{M}$ y para el 16:0 SM de $104 \pm 35 \mu\text{M}$ (Fig. 27). van Meeteren *et al.* (2004), reportan la K_M aparente por LPC (con acilo oleoil) de $44.4 \pm 2.5 \mu\text{M}$, cuyo resultado concuerda con las concentraciones fisiológicas de LPC en suero sanguíneo.

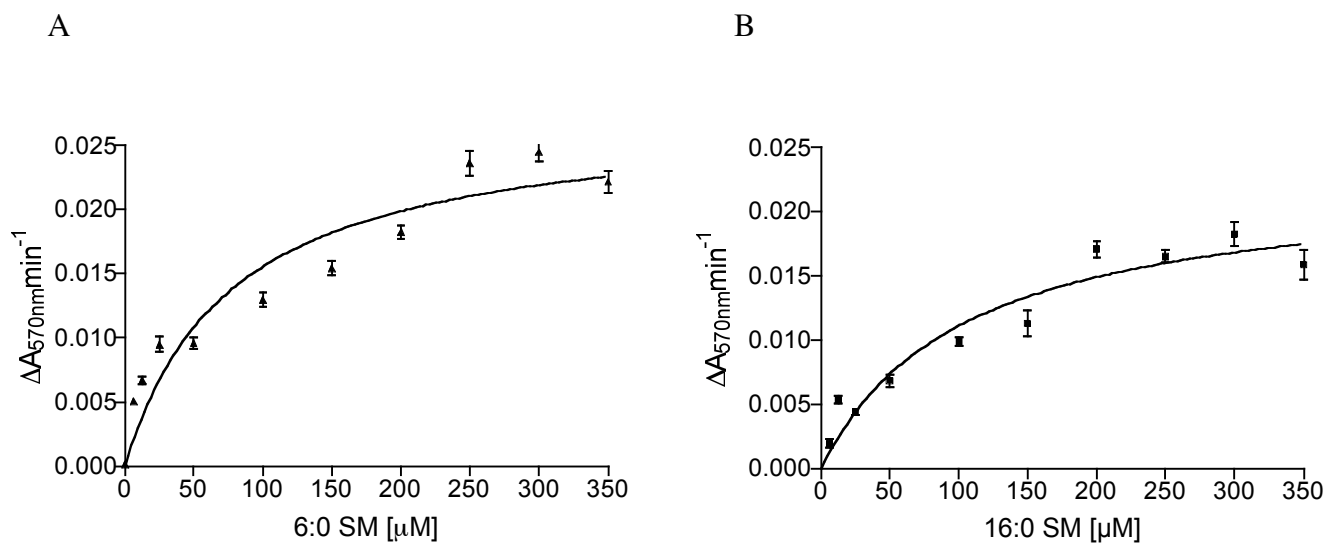


Figura 27. Cinética de saturación de SMD rLb Tx 1 (H6C) como modelo. A) 6:0 SM y B) 16:0 SM como sustrato. Proteína recombinante 100 ng/ensayo; 0.5 mM MgCl_2 y concentración variable de los sustratos ensayados. Resultados de dos experimentos, cada uno por triplicado.

CONCLUSIONES

Las esfingomielinasas D de veneno de *Loxosceles* requieren magnesio para su actividad. El calcio, por el contrario, tiene efecto inhibidor sobre la actividad SMD al disminuir la actividad específica de ésta hasta un 30%.

Las cuatro enzimas presentaron estimulación de la actividad en presencia de MgCl₂ (desde 0.1 mM) e inhibición de la actividad en presencia de CaCl₂ (desde 1 mM). El comportamiento observado en las condiciones sin adiciones y en presencia de EDTA respalda el requerimiento de MgCl₂ para observar el máximo de actividad.

Las concentraciones de cada uno de los cationes en que se ve efecto significativo nos indican que, si bien el Mg²⁺ sí puede actuar como activador natural, el Ca²⁺ no es un inhibidor natural.

La actividad de SMD se ve inhibida hasta en un 95% en presencia de citrato (desde 8 mM), componente presente a una concentración de 16 mM en el veneno natural de *Loxosceles reclusa*. Sin embargo, en este trabajo no se pudo demostrar que la cantidad de citrato en las arañas ordeñadas correspondiera a dichas concentraciones, respaldándolo con los resultados de los ensayos en presencia de las fracciones del veneno.

La esfingomielinasa D del veneno de *Loxosceles* tiene un rango de actividad óptima en la región neutra-alcalina (pH 7.2-8), presentando un máximo de actividad a pH 8 en presencia de glicina. Este efecto puede ser resultado de la composición del buffer más que de el pH *per se*.

Las cuatro SMD ensayadas presentan actividad diferencial sobre las distintas fuentes de sustrato, lo cual puede respaldar la suposición de que el tipo de respuesta celular dependerá del tipo de molécula liberada como producto de la hidrólisis de la SM. Sin embargo, la actividad sobre la esfingomielina similar a la presente de tejido en vertebrados no es preferencial (16:0, 18:0).

La SMD tiene actividad sobre lisofosfatidilcolina, cuando esta última es añadida conjugada a albúmina sérica libre de ácidos grasos, en contraste con lo que se observó cuando es presentada como micelas mixtas con Tritón X-100. Por ello se considera que la presentación del sustrato es determinante para la actividad de la SMD.

Cabe resaltar que la recombinante rL1 Tx 2 (H6C), que corresponde a la especie sudamericana *Loxosceles laeta*, es la que presenta mayor actividad en presencia de MgCl₂, así como sobre diferentes tipos de sustratos. Esto correlaciona con la magnitud de los efectos provocados por el veneno nativo de esta especie, los cuales son más severos que los reportados para los envenenamientos por *L. reclusa*.

PERSPECTIVAS

La estructura tridimensional de la SMD de *L. laeta* ya fue resuelta, aún quedan preguntas por resolver, como establecer modelos de interacción con el sustrato así como con los cofactores; microscopía electrónica para inferir la interacción con la membrana celular; mutagénesis sitio dirigida y la repercusión en la interacción con el sustrato.

Además, otra de las preguntas que se desprenden de este trabajo, y que puede ir de la mano con la perspectiva anterior, es el estudio de los efectos fisiológicos del veneno de *Loxosceles* en distintos niveles:

- Investigación de la interacción con la membrana celular.
- Estudio del efecto sobre la membrana de células en suspensión así como en cultivo de tejidos de distinta fuente animal.
- Caracterización de la señalización intracelular desencadenada en cada tipo celular *in vitro*.
- Dilucidación de la transducción de señales *in vivo* y la respuesta sistémica.
- Búsqueda de tratamientos alternos al antiveneno cuando su aplicación no es suficiente para la terapia de pacientes con loxoscelismo.

LITERATURA CITADA

- Álvarez del Toro, M. 1992. Arañas de Chiapas. Universidad Autónoma de Chiapas. México. 297 pp
- Babu, S.C., Dudev, T., Casareno, R., Cowan, J.A. & C. Lim. 2003. A combined experimental and theoretical study of divalent metal ion selectivity and function in protein: application to *E. coli* ribonuclease H1. *Journal of American Chemical Society*. 125: 9318-9328
- Barbaro, K.C., Knysak, I., Martins, R., Hogan, C. & K. Winkel. 2005. Enzymatic characterization, antigenic cross-reactivity and neutralization of dermonecrotic activity of five *Loxosceles* spider venoms of medical importance in the Americas. *Toxicon* 45: 489-499
- Bussiere, F.I., Mazar, A., Fauquert, J.L., Labbe, A., Rayssiguier, Y. & A. Tridon. 2002. High magnesium concentration *in vitro* decreases human leukocyte activation. *Magnesium Research* 15: 43-48
- Coddington, J. & H. Levi. 1991. Systematics and evolution of spiders (Araneae) *Annual Review of Ecology and Systematics*. 22: 565-592
- De Roodt, A.R., Salomón, O.D., Lloveras, C.S. & A.T. Orduña. 2002. Envenenamiento por arañas del género *Loxosceles*. Artículo especial, *Medicina (Buenos Aires)* 62: 83-94
- Díaz, J.H. 2004. The global epidemiology, syndromic clasification, management, and prevention of spider bites. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 71: 239-250
- Dixon, M. & E.C. Webb. 1979. Enzyme kinetics. *In: Enzymes*. Longman, Ed. UK
- Domingos, M.O., Barbaro, K.C., Tinan, W., Penny, J., Lewis, D.J.M. & R.R.C. New. 2003. Influence of sphingomyelin and TNF- α release on lethality and local inflammatory reaction induced by *Loxosceles gaucho* spider venom in mice. *Toxicon* 42 (5): 471-479
- Fenton, A.W., West, P.R., Odell, G.V., Hudburg, S.M., Ownby, C.L., Mills, J.N., Scruggins, B.T. & S.B. Shannon. 1995. Arthropod venom citrate inhibits phospholipase A2. *Toxicon* 33: 763-770
- Fernandes-Pedrosa, M.F., Junqueira de Azevedo, I.L., Gonçalves de Andrade, R.M., van den Verg, C.W., Ramos, C.R., HO, P.L. & D.V. Tambourgi. 2002. Molecular cloning and expresion of a functional dermonecrotic and hemolytic factor from *Loxosceles laeta* venom. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 298: 638-645
- Gates, C.A. & R.S. Rees. 1990. Serum amyloid P component: its role in platelet activation stimulated by sphingomyelinase D purified from the venom of the brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*). *Toxicon* 28:1303-1315.
- Gatt, S., Dinur, T. & Y. Barenholz. 1978. A spectrophotometric method for determination of sphingomyelinase. *Biochimica et Biophysica Acta* 530: 503-507
- Gómez, H.F., Miller, M.J., Desai, A. & J.S. Warren. 1999. *Loxosceles* spider venom induces the production of α and β chemokines: implications for the pathogenesis of dermonecrotic arachnidism. *Inflammation* 23: 207-215

- Gómez-Muñoz, A. 2004. Minireview. Ceramide-1-phosphate: a novel regulator of cell activation. *FEBS Letters* 562: 5-10
- Goñi, F.M. & A. Alonso. 2002. Sphingomyelinases: enzymology and membrane activity. *FEBS Letters*. 531: 38-46
- Grau, P.W. 2002. Comportamiento renal del magnesio. Su implicación en la regulación de la presión arterial. *Acta Médica Peruana* 19: 15-29
- Kurpiewski, G., Forrester, L.J., Barret, J.T. & B.J. Campbell. 1981. Platelet aggregation and sphingomyelinase D activity of a purified toxin from the venom of *Loxosceles reclusa*. *Biochimica et Biophysica Acta* 678: 467-476
- Levade, T. & J.P. Jaffrézou. 1999. Signalling sphingomyelinases: which, where, how and why?. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1438: 1-17
- Mahler, H.R. & E.H. Cordes. 1966. Enzyme Kinetics. *In: Biological Chemistry*. Harper & Row, pub. N. Y. p. 263-267
- Miura, Y., Gotoh, E., Nara, F., Nishijima, M. & K. Hanada. 2004. Hydrolysis of sphingosylphosphocholine by neutral sphingomyelinases. *FEBS Letters*. 557: 288-292
- Moolenaar, W.H. 1999. Bioactive lysophospholipids and their G protein-coupled receptors. *Experimental Cell Research*. 253: 230-238
- Mordasini, T., Curioni, A. & W. Andreoni. 2003. Why do divalent metal ions either promote or inhibit enzymatic reactions? The case of *BamHI* restriction endonuclease from combined quantum-classical simulations. *Journal of Biological Chemistry*. 278: 4381-4384
- Moye de Alba, C.E. Picaduras y mordeduras. *En: Aguilar, C.S. et al. Eds. 1997. Manual de Terapéutica Médica y Procedimientos de Urgencias*. México. McGraw Hill-Interamericana; 2835pp
- Murakami, M.T., Fernandes-Pedrosa, M.F., Tambourgi, D.V. & R.K. Arni. 2005. Structural basis for metal-ion coordination and the catalytic mechanism of sphingomyelinases D. *Journal of Biological Chemistry*. 280: 13658-13664.
- Oliveira, K.C., Gonçalves de Andrade, R.M., Piazza, R.M.F., Ferreira Jr, J.M.C., van der Berg, C.W. & D.V. Tambourgi. 2005. Variations in *Loxosceles* spider venom composition and toxicity contribute to the severity of envenomation. *Toxicon*. 45: 421-429
- Patel, K.D., Modur, V., Zimmerman, G.A., Prescott, S.M. & T.M. McIntyre. 1994. The necrotic venom of the brown recluse spider induces dysregulated endothelial cell-dependent neutrophil activation. Differential induction of GM-CSF, IL-8, and E-selectin expression. *Journal of Clinical Investigation*. 94:631-642
- Platnick, N.I. 2003. The world spider catalog, version 5.5. American Museum of Natural History, on line at: <http://research.amnh.org/entomology/spiders/catalog81-87/index.html>
- Ramos-Cerrillo. B.M. 2002. Comparación bioquímica, inmunológica y toxicológica de los venenos de *Loxosceles boneti* y *Loxosceles reclusa*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. 72pp

Ramos-Cerrillo, B., Olvera, A., Odell, G.V., Zamudio, F., Paniagua-Solís, J., Alagón, A. & R. Stock. 2004. Genetic and enzymatic characterization of sphingomyelinase D isoforms from the North American fiddleback spiders *Loxosceles boneti* and *Loxosceles reclusa*. *Toxicon* 44: 507-514

Ramos, R.H. & I.R. Vázquez. 2000. Arañismo ocasionado por especies del género *Loxosceles*, dentro del apartado Urgencias Médico-Quirúrgicas. *Revista Educativa para la Salud*. 25-34pp

Ramstedt, B., Leppimäki, P., Axberg, M. and J.P. Slotte. 1999. Analysis of natural and synthetic sphingomyelins using high performance thin layer chromatography. *European Journal of Biochemistry* 266: 997-1002

Ramstedt, B. and J.P. Slotte. 2002. Membrane properties of sphingomyelins. *FEBSS Letts*. 531: 33-37

Segel, I. 1975. Enzyme activation. *In: Enzyme kinetics*. Willey, Ed. USA

Segel, I. 1982. Enzimas. *In: Cálculos de Bioquímica*. Ed. Acribia. Madrid

Smith, C.W. & D.W. Micks. 1970. The role of polymorphonuclear leukocytes in the lesion caused by the venom of the brown spider *Loxosceles reclusa*. *Laboratory Investigation*. 22: 90-93

Tambourgi, D.V., Magnoli, F.C., van der Berg, C.W., Morgan, B.P., de Araujo, P.S. & E.W. Alves. 1998a. Sphingomyelinases in the venom of the spider *Loxosceles intermedia* are responsible for both dermonecrosis and complement-dependent hemolysis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 251: 366-373

Tambourgi, D.V., Petricevich, V.L., Magnoli, F.C., Assaf, S.L., Jancar, S. & W. Dias da Silva. 1998b. Endotoxemic-like shock induced by *Loxosceles* spider venoms: pathological changes and putative cytokine mediators. *Toxicon* 36: 391-403

Tambourgi, D.V., Morgan, B.P., de Andrade, R.M., Magnoli, F.C. & C.W. van Den Berg., 2000. *Loxosceles intermedia* spider envenomation induces activation of an endogenous metalloproteinase, resulting in cleavage of glycoporphins from the erythrocyte surface and facilitating complement-mediated lysis. *Blood*. 95: 683-691

Tambourgi, D.V. 2002. Mechanism of induction of complement susceptibility of erythrocytes by spider and bacterial sphingomyelinases. *Immunology* 107: 93-10

van Meeteren, L.A., Frederiks, F., Giepmans, B.N.G., Fernandes-Pedrosa, M.F., Billington, S.J., Jost, B.H., Tambourgi, D.V. & W.H. Moolenaar. 2004. Spider and bacterial sphingomyelinases D target cellular lysophosphatidic acid receptors by hydrolyzing lysophosphatidylcholine. *J. Biol. Chem*. 279: 10833-10836

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

APÉNDICE I

Reactivos y soluciones

Reactivos para ensayo colorimétrico con 10-acetil-3,7-dihidroxi-fenoxasina (Reactivo AmplexMR Red) como cromóforo:

- Buffer estándar para mezcla de reacción: 0.5 M Tris/ HCl pH 7.5
- Buffer estándar para toxina recombinante: 0.1 M Tris/ HCl pH 7.5
- 2% Tritón X-100 (KODAK)
- Peroxidasa de rábano (Horseradish peroxidase HRP; Miles Laboratories) 2500 mU/ml en dH₂O
- Colina oxidasa (Choline oxidase ChOx; SIGMA) 20 U/ml en 50 mM NaCl
- Reactivo AmplexMR Red (10-acetil-3,7-dihidroxi-fenoxasina AR; Molecular Probes) 10 mM en DMSO
- Esfingomielina (Sphingomyelin SM) 5 mM en 2% Tritón X-100. Composición de la SM de fuentes naturales en la Fig 27.
 - 1) 2:0 SM (acetil SM; Avanti)
 - 2) 6:0 SM (hexanoil SM; Avanti)
 - 3) 12:0 SM (lauroil SM; Avanti)
 - 4) 18:0 SM (estearoil SM; Avanti)
 - 5) 18:1 SM (oleoil SM; Avanti)
 - 6) 16:0 SM huevo (mayoritariamente palmitoil SM; SIGMA)
 - 7) 23:0 SM leche (mayoritariamente tricosanoil SM; Avanti)
 - 8) 18:0 SM cerebro (mayoritariamente estaroil SM, Avanti)
 - 9) 16:0; 18:0; 24:0; 24:1 eritrocitos (RBC SM; Avanti)

Figura 27. Composición porcentual de la esfingomielina de fuentes naturales de acuerdo a los proveedores.

- Esfingomielinasa D recombinante (rL Tx) en PBS
 - 1) Etiqueta en extremo amino [rLb Tx 1 (H6N), rLr Tx 1 (H6N) y rLl Tx 1 (H6N)]
 - 2) Etiqueta en extremo carboxilo [rLb Tx 1 (H6C) y rLl Tx 2 (H6C)]
- EDTA sol stock 0.1 M
- CaCl₂ sol stock 0.1 M
- MgCl₂ sol stock 0.1 M
- MnCl₂ sol stock 0.1 M
- ZnCl₂ sol stock 0.1 M

Reactivos para ensayo colorimétrico con TNPAL-esfingomielina como cromóforo:

- [N- ω -trinitrofenil-aminolauril]-esfingomielina (TNPAL-SM; SIGMA) 1.2 mg/ml en cloroformo:metanol (2:1)
- 2% Tritón X-100 (KODAK)
- 0.5 mM MgCl₂
- stock de buffers de reacción
 - 1) Buffer Acetato: 0.1 M AcOH/ AcONa; rango de pH: 3.6, 4, 4.5, 5, 5.5, 6
 - 2) Buffer Glicina: 0.1 M Gly/ NaOH; rango de pH: 8.6, 9, 9.5, 10, 10.5
 - 3) Buffer Fosfato: 0.1 M KH₂PO₄/ NaOH; rango de pH: 6, 6.5, 7, 7.5, 8

4) Buffer Tris-HCl: 0.1 M Tris/ HCl; rango de pH: 7.2, 7.5, 8, 8.5, 9

5) Buffer Tris + Glicina: 0.1 M Tris/ HCl 0.1 M Gly; rango de pH: 7.2, 7.5, 8, 8.5, 9

- Solución para detener reacción (IHS) Isopropanol/ Heptano/ 5 M H₂SO₄ (40:10:1; v/v)
- Solución para separación de fases Heptano/ dH₂O (1.1:1; v/v)

Reactivos para cuantificación de proteína. Método BCA:

- Ácido binciconínico (BCA, reactivo B; Pierce)
- Albúmina sérica bovina (BSA, Pierce)
- Sulfato de cobre (reactivo C; Pierce)
- Solución reveladora (reactivo A; Pierce)