



Universidad Nacional Autónoma de México

Instituto de Biotecnología

**Participación de los productos fosfoceramida
y lisofosfatidato generados por la esfingomielinasa D
del veneno de araña *Loxosceles*, en la toxicidad de
la enzima.**

T E S I S

Que para obtener el grado de:

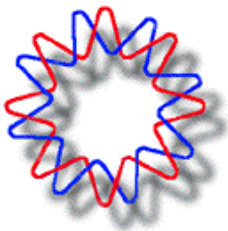
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:

Biól. Ariana Chávez Méndez

Asesor: Dr. Alejandro Alagón Cano

2011





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 fue realizada en el Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología, UNAM.

Durante la realización de este proyecto se contó con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de beca de Maestría 218527 y con el apoyo económico del Instituto Bioclon S.A. de C. V.

AGRADECIMIENTOS

Por la revisión y sugerencias a este trabajo:

A mi comité tutorial:

Dr. Alejandro Alagón Cano

Dr. Federico Sánchez Rodríguez

Dr. Otto Geiger

A mis sinodales:

Dr. Alejandro Alagón Cano

Dr. Gerardo Corzo Burguette

Dr. Baltazar Becerril Luján

Dr. Gustavo M. Pedraza Alva

Dr. Jorge F. Paniagua Solís

Al Dr. Gustavo M. Pedraza Alva por su invaluable asesoría y las facilidades brindadas en su laboratorio principalmente durante la última etapa de este proyecto. Así como por el tiempo dedicado a la revisión de este escrito, sus críticas y sugerencias enriquecedoras. Muchas gracias.

Por apoyo técnico a:

Biól. Felipe Olvera Rodríguez

MVZ. Pedro Lorenzo Flores Chávez

M. en C. Alejandro Olvera Rodríguez

Biól. Rosa Román Miranda

Biól. Laura Montero León

Oswaldo López Gutiérrez

M. en C. Alejandro Carbajal Saucedo

M. en B. Herlinda C. Clement Carretero

Biól. Héctor Cardoso Torres

Al Dr. Rafael Vázquez Duhalt por su asesoría en cromatografía de gases y facilidades brindadas en su laboratorio.

Al departamento de Instrumentación del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" México, D.F.

Al personal del Bioterio del Instituto de Biotecnología, UNAM, por todas las facilidades brindadas durante la realización de este proyecto.

A Ricardo Mondragón Cortés por su apoyo en el bioterio y en el laboratorio.

Por el apoyo administrativo a:

Angélica Linares Labastida

Gloria Villa Herrera

Lic. J. Antonio Bolaños Guillen

	Página
ABREVIATURAS.....	v
RESUMEN.....	vi
1. INTRODUCCIÓN	
1.1. Arañas <i>Loxosceles</i>	1
1.2. Loxoscelismo.....	3
1.3. El veneno de <i>Loxosceles</i>	5
1.4. Fisiopatología del loxoscelismo.....	6
1.5. La esfingomielinina como sustrato de la SMD de <i>Loxosceles</i>	8
1.6. Fosfoceramida.....	9
1.7. Lisofosfatidilcolina como sustrato de la SMD de <i>Loxosceles</i>	11
1.8. Ácido lisofosfatídico	11
2. ANTECEDENTES	
2.1. Esfingomielinasa D de <i>Loxosceles</i>	14
2.2. Fosfoceramida.....	17
2.3. Ácido lisofosfatídico.....	18
2.4. Macrófagos.....	19
2.5. p38 MAPK (Proteínas cinasas activadas por mitógeno).....	20
3. JUSTIFICACIÓN.....	22
4. HIPÓTESIS.....	22
5. OBJETIVOS.....	22
6. MATERIALES Y MÉTODOS	
6.1. Estrategia experimental.....	23
6.2. Preparación de ácido lisofosfatídico y fosfoceramida.....	24

6.3. Obtención de fosfoceramida a partir de diferentes especies de esfingomielina.....	26
6.4. Inoculación de ácido lisofosfatídico y fosfoceramida en conejos y ratones.	29
6.5. Medición de actividad de esfingomielinasa D de <i>Loxosceles</i> sobre eritrocitos.....	30
6.6. Activación de la MAPK p38 en macrófagos.....	33
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
7.1. Efectos locales.....	35
7.2. Efectos sistémicos.....	47
7.3. Ensayos de actividad enzimática de SMD de <i>Loxosceles</i> sobre eritrocitos...	58
7.4. Medición de activación de la MAPK p38 en macrófagos expuestos a SMD de <i>Loxosceles</i>	62
8. CONCLUSIONES.....	67
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68

	Página
Figura 1 Araña <i>Loxosceles boneti</i>	2
Figura 2 Loxoscelismo local.....	3
Figura 3 Principales fosfolípidos de membrana plasmática.....	8
Figura 4 Esquema de producción de fosfoceramida en células de mamífero.....	10
Figura 5 Vías de producción de ácido lisofosfatídico.....	13
Figura 6 Hidrólisis de la esfingomielinasa D de <i>Loxosceles</i> sobre esfingomielina.....	16
Figura 7 Hidrólisis de la esfingomielinasa D de <i>Loxosceles</i> sobre lisofosfatidilcolina.....	16
Figura 8 Ácido lisofosfatídico en capa fina teñida con vapor de yodo.....	26
Figura 9 Esquema del método colorimétrico Amplex Red®.....	32
Figura 10 Efecto inflamatorio de LPA y SMD de <i>Loxosceles</i> en piel de conejo.	38
Figura 11 Efecto inflamatorio de LPA y SMD de <i>Loxosceles</i> en piel de conejo.	38
Figura 12 Efecto inflamatorio de C1P en piel de conejo (a).....	43
Figura 13 Efecto inflamatorio de C1P en piel de conejo (b).....	44
Figura 14 Efecto inflamatorio de C1P en piel de conejo (c).....	45
Figura 15 Actividad de diferentes cantidades de la SMD de <i>Loxosceles</i> sobre eritrocitos de humano y de conejo.....	59
Figura 16 Actividad de la SMD de <i>Loxosceles</i> sobre diferentes porcentajes de eritrocitos de humano.....	61
Figura 17 Gráfica de actividad enzimática de las SMD de <i>Loxosceles</i> de origen recombinante.....	64
Figura 18 Activación de la MAPK p38 en macrófagos de ratones cepas BALB/c y C57.....	66

		Página
Tabla 1	Relación de micromoles de las diferentes especies moleculares de LPA en 500 µg.....	25
Tabla 2	Ensayo de estabilidad de eritrocitos.....	31
Tabla 3	Efecto de LPA disponibles comercialmente, en ratones.....	48
Tabla 4	Efecto de C1P, mezcla de LPA y mezcla de LPA con C1P, en ratones.....	51
Tabla 5	Efecto de C1P obtenida a partir de SM comercial y SMD de <i>Loxosceles</i> , en ratones (a).....	54
Tabla 6	Efecto de C1P obtenida a partir de SM comercial y SMD de <i>Loxosceles</i> , en ratones (b).....	55
Tabla 7	Efecto de C1P obtenida a partir de SM comercial y SMD de <i>Loxosceles</i> , en ratones (c).....	56
Tabla 8	Efecto de detergentes inoculados vía intravenosa en ratones.....	57

C1P.....	Fosfoceramida o ceramida-1-fosfato
DL ₅₀	Dosis letal media
Da.....	Dalton
HRP.....	Peroxidasa de rábano (Horseradish peroxidase)
IgG.....	Inmunoglobulina G
kDa.....	Kilodalton
LPA.....	Ácido lisofosfatídico o Lisofosfatidato
LPC.....	Lisofosfatidilcolina
MAPK.....	Proteínas cinasas activadas por mitógenos
MPM.....	Marcador de peso molecular
PM.....	Peso molecular
p38.....	Proteína cinasa de 38 KDa
pp38.....	Proteína cinasa fosforilada de 38 KDa
TxrLbCOOH.....	Toxina recombinante de <i>Loxosceles boneti</i> con cola de histidinas en el extremo carboxilo
TxrLb(E31K).....	Toxina recombinante de <i>Loxosceles boneti</i> mutada en el glutámico 31 por lisina
Tx1rLrNH ₂	Toxina recombinante isoforma 1 de <i>L. reclusa</i> con cola de histidinas en el extremo amino terminal
SDS-PAGE.....	Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio
SMD.....	Esfingomielinasa D
TEMED.....	Tetrametilendiamina
Tx.....	Toxina

El envenenamiento por mordedura de araña *Loxosceles*, denominado loxoscelismo, puede ser local, el cual se caracteriza por inflamación que puede degenerar en dermonecrosis, o sistémico, caracterizado por hemólisis intravascular masiva e insuficiencia renal. Se ha demostrado que la actividad enzimática de la esfingomielinasa D (SMD) del veneno, causa la fisiopatología. La SMD es capaz de hidrolizar esfingomielina generando ceramida-1-fosfato (C1P), y lisofosfolípidos generando ácido lisofosfatídico (LPA) y colina. Por ello, el estudio de la participación de LPA y C1P es importante para definir los primeros eventos de la fisiopatología.

En este trabajo se analizó la capacidad de diferentes especies moleculares de C1P y LPA para inducir dermonecrosis en conejos y efectos sistémicos en ratones. Los LPA y C1P de cadena hidrocarbonada larga provocaron un mayor efecto inflamatorio en piel en comparación con las especies de cadena corta. En ratones, los LPA 14:0 C, 16:0 C, 17:0 C, 18:0 C y 18:1 C generaron cambios en la frecuencia respiratoria, el LPA 6:0 C no causó efecto evidente. Por otro lado, las C1P 23:0 C y 12:0 C provocaron cambios en la frecuencia respiratoria, desequilibrio y muerte en ratones después de su inoculación.

En conclusión, se observó que la C1P y LPA causan efectos *in vivo* que varían según la especie molecular. La inflamación causada por LPA y C1P no degeneró en dermonecrosis. Por lo que, pueden existir otros productos o estímulos alternos además de LPA y C1P, que contribuyan a la fisiopatología.

Adicionalmente, se generó evidencia de que la SMD posee actividad enzimática sobre eritrocitos, sin provocar hemólisis.

Por otro lado, se analizó la activación de la vía p38MAPK, que juega un papel importante en el inicio y regulación de la producción de mediadores de la inflamación; los resultados mostraron que la SMD de *Loxosceles* activa la vía p38 MAPK en macrófagos peritoneales de ratón, y que tal activación es independiente a su actividad enzimática.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Arañas *Loxosceles*

Los arácnidos son un grupo muy antiguo cuyos representantes fósiles de todos los órdenes remontan al Carbonífero, hace aproximadamente 360 millones de años.

La clase Arachnida incluye a todos los quelicerados terrestres vivientes. Se caracterizan por poseer un par de apéndices preorales llamados quelíceros, un par de apéndices postorales denominados pedipalpos y 4 pares de patas ambulatorias. Muchos poseen glándulas que secretan veneno el cual les ayuda a matar insectos y otros pequeños animales de los cuales se alimentan. Así mismo, algunos animales incluidos en esta clase, como las arañas, poseen glándulas que segregan seda, con la que hacen sus nidos y protegen a sus huevos (Rioja et al, 1975; Ruppert y Barnes, 1995).

Las arañas conforman el Orden Araneae perteneciente a la clase Arachnida.

El Orden Araneae se divide por sus características morfológicas en 3 subórdenes: I) Mesothelae, II) Orthognatha (Mygalomorphae) que incluye los géneros *Phoneutria* y *Átrax*, y III) Labidognatha (Araneomorphae) que incluye la familia Sicariidae con los géneros *Loxosceles* y *Latrodectus* (Ruppert y Barnes, 1995; Platnick, 2009).

En el mundo, se han identificado más de 40000 especies de arañas (Platnick, 2009), de éstas, las pertenecientes a los géneros: *Phoneutria* (en Sudamérica), *Átrax* (en Australia), *Loxosceles* y *Latrodectus* (cosmopolitas), son consideradas peligrosas para el humano.

Características de *Loxosceles*

Las arañas pertenecientes al género *Loxosceles* (Lowe, 1832) (Del griego *loxos*: curvas y *kelos*: patas) son comúnmente llamadas "arañas violinistas" por poseer una marca en forma de violín con el mástil hacia atrás en la parte anterosuperior del cefalotórax, así mismo, son conocidas como "araña marrón" y "araña de los rincones".



Figura 1. Araña *Loxosceles boneti*. Tiene una longitud corporal de aprox. 13mm; el corchete señala la forma de un violín invertido por lo que recibe el nombre común de araña violinista. En el recuadro inferior se observa la telaraña de aspecto algodonoso. Fotos: A. Alagón

Poseen una longitud corporal entre 8 y 13 mm, sus patas son largas y delgadas; poseen seis ojos dispuestos en diadas en forma de "V"; son de color marrón y grisáceo, el tono varía dependiendo de la especie. La tela que producen es de aspecto algodonoso e irregular (Figura 1).

Distribución

Estas arañas son cosmopolitas, se distribuyen principalmente en regiones con clima tropical y templado (Ramos, 2000). En el mundo existen al menos 100 especies, distribuidas mayoritariamente en América, de las cuales, las más estudiadas y relacionadas con casos de envenenamiento humano son *Loxosceles gaucho*, *L. intermedia* y *L. laeta* en Sudamérica (principalmente Chile, Argentina, Perú y Brasil), *L. deserta* y *L. reclusa* en E.U.A. En México hay 37 especies descritas, la más estudiada es *L. boneti* (Platnick, 2010).

Las arañas *Loxosceles* habitan en la corteza de los árboles, rocas y en viviendas, particularmente en lugares oscuros y con poco movimiento como hendiduras de paredes y muebles. En general, son arañas no agresivas por lo que la mordedura en humanos es totalmente accidental.

1.2. Loxoscelismo

Las manifestaciones clínicas ocasionadas por el envenenamiento causado por mordedura de una araña del género *Loxosceles* son descritas como loxoscelismo, en el humano, existen dos formas clínicas (Cabrerizo S., et.al., 2009):

I) Loxoscelismo local o cutáneo: Es la forma más común del padecimiento. La lesión dentro de las primeras 24 horas se caracteriza por edema, dolor localizado y eritema, que evoluciona de 24 a 36 horas a una "placa marmórea" (área intercalada de palidez y equimosis) de bordes generalmente irregulares circundada por eritema y edema indurado, dolorosa a la palpación, que al tercer o cuarto día evoluciona a necrosis. Posteriormente se forma una escara negra que comienza a desprenderse dejando una úlcera que puede tardar varios meses en cicatrizar o requerir cirugía reconstructiva (Figura 2).



Figura 2. Loxoscelismo local. Fotografía superior: Pie de un paciente con loxoscelismo local al 5° día después de la mordedura de araña; fotografía inferior: mismo paciente después de 15 días, mostrando necrosis extensa. Fuente: Dra. Ma. Del Carmen

II) Loxoscelismo sistémico: Es menos común y es considerado un cuadro de mayor gravedad que el anteriormente descrito. Se caracteriza por hemólisis intravascular y coagulación intravascular diseminada (CID). Los síntomas incluyen fiebre, náusea, vómito, escalofrío, dolor de cabeza, orina oscura (hemoglobinuria y hematuria) y descenso del hematocrito. Los pacientes pueden llegar a presentar insuficiencia renal aguda que frecuentemente es letal.

En E.U.A. en el 2009 se reportaron alrededor de 1400 accidentes por mordedura de araña *Loxosceles* (Dato tomado del: Annual Report of the American Association of Poison Control Center's National Poison Data System: 27th anual report). Por otro lado, en México no se tiene un registro exacto de la incidencia de mordedura de la araña *Loxosceles*, aunque se sabe que la mayoría de los casos se han presentado en la región centro de este país.

Diagnóstico

Debido a que la mordedura de *Loxosceles* al inicio no presenta síntomas que la distingan de cualquier otra mordedura o picadura de insecto, el tratamiento suele ser tardío. Actualmente Laboratorios Silanes e Instituto Bioclon en colaboración con el Instituto de Biotecnología de la UNAM en México están desarrollando un método de diagnóstico para el loxoscelismo, sin embargo por el momento no hay exámenes de laboratorio específicos que se apliquen rutinariamente para diagnosticar dicha patología. Por lo anterior, el loxoscelismo puede confundirse fácilmente con otros padecimientos dermatológicos retrasando el tratamiento específico que es el antiveneno.

Tratamiento

Actualmente no existe un criterio unánime para el tratamiento adecuado, por lo que éste se aplica en consideración a la evolución de la lesión y sintomatología así como a la forma clínica, ya sea cutánea o sistémica.

Tratamiento inespecífico (Cabrerizo *et al.*, 2009):

- a) Corticoesteroides: Aparentemente podría disminuir la respuesta inflamatoria local, sin embargo, su utilidad es controversial.
- b) Dapsona: Se aplica para la inhibición de la migración de polimorfonucleares, sin embargo no posee una eficacia avalada por estudios controlados en seres humanos. Incluso, en ensayos *in vivo* realizados en conejos inyectados con veneno de *L. reclusa*, la dapsona no tiene efecto en la vasculitis ni en la escara necrótica causada por el veneno.
- c) También se ha propuesto el uso de cámara hiperbárica que probablemente mejoraría la vascularización de la zona afectada, sin embargo, no se ha comprobado su eficacia clínica.

Tratamiento específico:

Existen antivenenos hechos contra distintas especies de *Loxosceles*. En Argentina y Brasil, se producen antivenenos constituidos por fragmentos $F(ab')_2$ de origen equino utilizando como inmunógeno el veneno de *L. laeta* en Argentina, y *L. gaucho* en Brasil; en Perú existe un antiveneno constituido por Inmunoglobulina G entera de origen equino contra el veneno de *L. laeta* (Cabrerizo *et al.*, 2009).

En México se desarrolló un antiveneno a partir de toxinas recombinantes de arañas *Loxosceles boneti*, *L. reclusa* y *L. laeta*. Dicho antiveneno (Reclusmyn®), fue aprobado por las autoridades sanitarias de nuestro país en febrero de 2009 (No. de Registro: 020M2009 SSA) con base en la evidencia clínica de su efectividad generada por la Dra. Ma. Del Carmen Gutiérrez, en el Hospital "La Raza", México.

1.3. El veneno de *Loxosceles*

La mordedura de la araña *Loxosceles* inocula aproximadamente 5 microlitros de veneno que alcanza el espesor dérmico; en cantidad, inocula alrededor de 20 microgramos de veneno.

El veneno de *Loxosceles* está constituido por una gran variedad de componentes de los cuales el principal es la esfingomielinasa D (SMD) que es la responsable de la acción necrótica y hemólisis. Esta enzima constituye alrededor del 40% del veneno.

Con respecto a otros componentes del veneno se ha reportado lo siguiente:

En el veneno de *L. laeta* y *L. intermedia* se ha descrito la presencia de proteasas (con localización electroforética de 20 a 35 KDa) con actividad proteolítica -en zimograma- en gelatina, fibronectina y fibrinógeno (da Silveira *et al.*, 2002; Feitosa *et al.*, 1998). También se han identificado serina-proteasas en el veneno de *L. intermedia* (Veiga *et al.*, 2000). Sin embargo, aún no se ha encontrado una función importante de tales proteasas en la lesión necrótica.

También, se ha reportado presencia de hialuronidasas en el veneno de *L. intermedia*, aunque su efecto biológico no está del todo claro, la hialuronidasa se relaciona con la difusión del veneno (da Silveira *et al.*, 2007).

Recientemente, se reportó la presencia de histamina en el veneno de *L. intermedia* en cantidad capaz de inducir efectos fisiológicos (Paludo *et al.*, 2009).

Los componentes adicionales a la esfingomielinasa D reportados en el veneno de *Loxosceles*, pueden variar dependiendo el origen del veneno para su estudio, es decir, si proviene de un macerado glandular o estimulación eléctrica, así mismo puede influir la edad, sexo y estado fisiológico de la araña (de Oliveira *et al.*, 2005).

1.4. Fisiopatología del loxoscelismo

Los mecanismos celulares y moleculares por los que se desarrolla la fisiopatología del loxoscelismo, en cualquiera de sus formas clínicas: localizada o sistémica, aún no quedan claros. Sin embargo, se han publicado diversos reportes con ensayos *in vivo* e *in vitro* que aportan información al respecto.

En 1981 Kurpiewski *et al.*, mediante ensayos *in vitro* mostraron que el veneno de *Loxosceles reclusa*, induce agregación en plaquetas de origen humano y que este efecto es debido a la esfingomielinasa D contenida en dicho veneno.

En 1994, Patel *et al.*, reportaron que el veneno de *L. deserta* activa células endoteliales de humano en monocapas y que una vez activadas promueven una inusual adherencia de neutrófilos al endotelio. Así mismo, en las células endoteliales se observó un aumento en la liberación de interleucina 8 (IL-8) y del factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) en respuesta a dicho veneno.

Por otro lado, ensayos *in vitro* han revelado que el veneno de *L. deserta* induce la producción de IL-8 y la proteína 1 quimioatrayente de monocitos (MCP-1) en células epiteliales y endoteliales, en estas últimas también induce la producción del oncogen alfa relacionado al crecimiento (GRO- α). Posteriormente, se identificó que la expresión de tales quimiocinas se lleva a cabo a través de una vía dependiente de NF-KB (Desai *et al.*, 1999). Con base en las funciones de IL-8 (potente quimioatrayente neutrófilos), MCP-1, y GRO- α , en inflamación, estos hallazgos pueden tener relevancia en la dermonecrosis observada en el loxoscelismo (Gómez *et al.*, 1999).

Posteriormente mediante ensayos *in vitro* se observó un efecto directo del veneno de *L. intermedia* en células endoteliales, dando como resultado pérdida de la adhesión celular y cambios en la morfología celular. Se ha propuesto que este efecto podría causar indirectamente la activación de leucocitos y plaquetas. De esta manera, los desórdenes que involucran la degeneración de los vasos sanguíneos observados después del envenenamiento por *Loxosceles* podrían resultar no sólo de la degradación de moléculas de matriz extracelular o infiltración masiva de leucocitos sino también a través de una actividad directa del veneno sobre las células endoteliales (Paludo *et al.*, 2006).

Por otro lado, se ha reportado que el veneno de *L. deserta*, en queratinocitos, induce la expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), el cual es un inductor de angiogénesis y permeabilidad vascular *in vivo*. Por lo que se sugiere que esto podría contribuir a la vasodilatación, edema y eritema que se presenta en el loxoscelismo (Desai *et al.*, 2000). Así mismo, en el 2008, Rattman *et al.*, reportaron que el veneno de *L. intermedia* inyectado en ratas produce un incremento en la permeabilidad vascular e inducción de relajación vascular a través de la degranulación de células cebadas y liberación de mediadores como histamina y serotonina.

Recientemente, se identificó un efecto hemolítico de la SMD el cual depende de su actividad catalítica. Ensayos hechos con eritrocitos de diferentes especies de animales: conejo, humano, oveja y caballo, expuestos a SMD de *L. intermedia*, mostraron hemólisis que varía dependiendo de la especie animal, siendo más susceptibles los eritrocitos de humano, conejo y oveja con respecto a los eritrocitos de caballo. Los ensayos realizados con eritrocitos humanos mostraron que dicha hemólisis es dependiente de la dosis de la SMD y del tiempo. Así mismo, se observaron cambios en la forma y tamaño de los eritrocitos expuestos a la SMD; también se observó una exposición de fosfatidilserina en la monocapa externa de los eritrocitos, este fenómeno está relacionado con muerte celular causante de efectos fisiopatológicos que incluyen la estimulación de reacciones de coagulación, reconocimiento de células apoptóticas por macrófagos y anclaje de células sanguíneas al endotelio (Chaves *et al.*, 2009).

Estudios *in vivo* con conejos inyectados con el veneno de *L. intermedia*, muestran que el veneno no afecta a todas las células de la sangre. Los análisis de conteo celular mostraron disminución de células rojas nucleadas y megacariocitos en médula ósea y disminución de plaquetas (trombocitopenia) y neutrófilos (neutropenia) en sangre

periférica, lo cual correlacionó con los cambios histopatológicos observados en las biopsias de piel. Por lo que se propuso que la trombocitopenia y neutropenia transitorias en sangre periférica puede ser consecuencia de una extensiva migración de plaquetas y neutrófilos a la lesión necrótica (da Silva *et al.*, 2003).

Acorde a lo anterior, análisis histopatológicos, en piel de conejos inoculados con veneno de *L. gaucho*, mostraron hemorragia, trombosis y presencia masiva de neutrófilos y plaquetas en el sitio de inoculación. No se presentó hemólisis ni coagulación intravascular diseminada (Tavares *et al.*, 2004; McGlasson *et al.*, 2007).

En cuanto al estudio de la destrucción del tejido, observado en el loxoscelismo cutáneo, se han reportado análisis histopatológicos en piel de conejo que indican que la SMD de *L. intermedia* causa infiltración de neutrófilos concomitante con disociación de fibras de colágeno en la dermis. En relación a esto, en el 2009, Tamborugi *et al.*, reportaron que la SMD induce la expresión de metaloproteinasas MMP-9 en neutrófilos y fibroblastos, sugiriendo que esto podría contribuir a la destrucción del tejido.

Por otro lado, experimentos *in vitro* realizados por varios grupos de investigación, han demostrado que la SMD de *Loxosceles* tiene actividad enzimática sobre esfingomiélin, generando fosfoceramida o ceramida-1-fosfato (C1P) y sobre lisofosfatidilcolina (LPC) generando ácido lisofosfatídico (LPA).

1.5. La esfingomiélin como sustrato de la SMD de *Loxosceles*.

La esfingomiélin (SM) además de ser un componente estructural en las membranas biológicas también es una molécula importante en señalización celular a través de los productos derivados de su metabolismo.

La composición de estas diferentes especies moleculares de SM varía entre los diferentes tejidos, aunque se encuentran mayoritariamente las de cadena acilo larga tales como SM con 16:0, 18:0, 22:0 y 24:1.

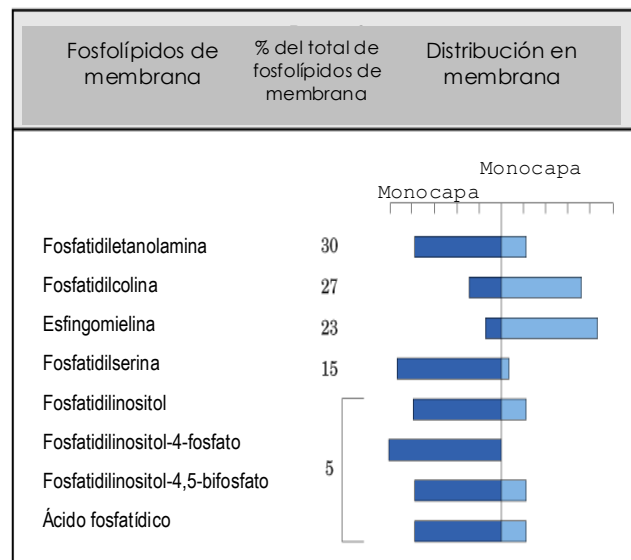


Figura 3. Principales fosfolípidos de membrana plasmática. Se muestra el contenido de fosfolípidos expresado en porcentaje relativo y su distribución en la monocapa interna y externa.

Las diferentes especies moleculares de SM están asimétricamente distribuidas en la parte externa e interna de la membrana plasmática, localizándose mayoritariamente en la monocapa externa de la bicapa fosfolipídica (Figura 3); también se encuentran circulantes en plasma. En 1998 Bettger, *et al.*, reportaron que las diferentes especies moleculares (definidas por la longitud y saturación del ácido graso constituyente) de SM varían entre diferentes especies de animales y entre diferentes órganos y sueros, por ejemplo la SM iso 24:0 C se encuentra en tejido de ratas pero no en humanos.

Considerando lo anterior, es posible que la SMD de *Loxosceles* genere diferentes especies moleculares de lisofosfolípidos dependiendo de la especie molecular de la SM que tenga como sustrato y del animal inoculado.

Hasta ahora, los efectos observados con el veneno de *Loxosceles*, indican que es dermonecrótico en conejos y humanos pero no en ratones. Esto podría relacionarse con la diferencia de especies moleculares de SM presentes entre las especies animales.

1.6. Fosfoceramida

A la C1P se le considera un esfingolípido bioactivo. A nivel celular, la C1P puede ser generada a partir de la ceramida derivada de esfingomielina por acción de la ceramida cinasa, y también a partir de la esfingosina reciclada del metabolismo de gangliósidos.

En mamíferos, la biosíntesis de C1P es catalizada por ceramida cinasa a través de la fosforilación de ceramidas derivadas de la degradación de esfingomielina, gangliósidos o de síntesis de *novo*. La identificación de ceramida 1 fosfatasa en cerebro de rata y hepatocitos, sugieren que la ceramida y C1P son interconvertibles dentro de la célula. La C1P puede ser convertida a ceramida también por una fosfohidrolasa de ácido fosfatídico localizada en la membrana plasmática. Adicionalmente, la C1P puede ser generada a partir de esfingomielina por acción de esfingomielinasa D de *Loxosceles*; es importante señalar que no se ha encontrado esta actividad enzimática en mamíferos (Figura 4).

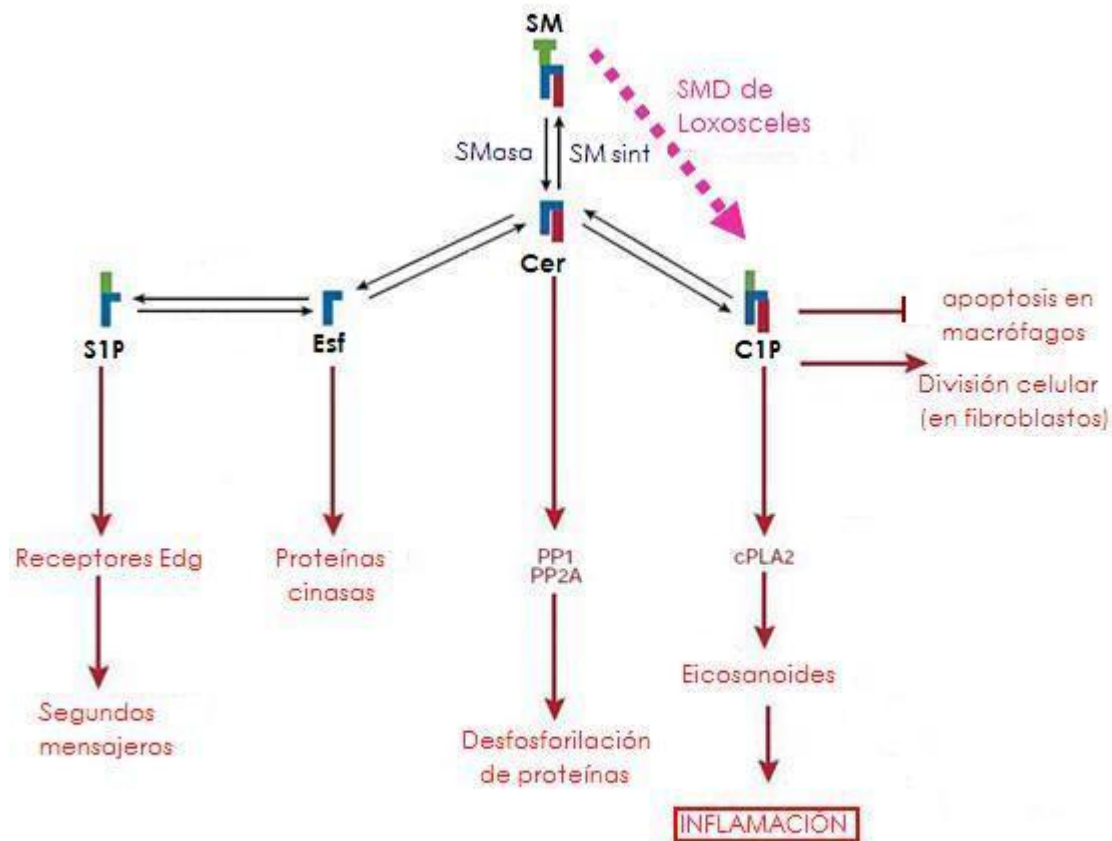


Figura 4. Esquema de producción de fosfoesfingoceramida (C1P) en células de mamífero. La flecha rosa señala la generación de fosfoesfingoceramida (C1P) a partir de la esfingomielina (SM) llevado a cabo por la esfingomielinasa D (SMD) de *Loxosceles*. Con flechas en rojo, se indican algunas respuestas celulares a C1P, entre ellas, la C1P activa la cPLA2 promoviendo la síntesis de eicosanoides mediadores de la inflamación y bloquea apoptosis de macrófagos *in vitro*. Edg: gen de diferenciación endotelial, PP1: proteína fosfatasa 1, PP2A: proteína fosfatasa A2, cPLA2: fosfolipasa A₂ citosólica. Modificado de Futerman and Hannun, 2004; Gómez, 2004.

1.7. Lisofosfatidilcolina: sustrato de la SMD de Loxosceles.

La lisofosfatidilcolina (LPC) se encuentra mayoritariamente en plasma, en concentraciones alrededor de 200 μM . Existen diferentes especies moleculares que varían en la longitud y la saturación de sus cadenas de ácidos grasos. Las especies moleculares mayoritarias son LPC 16:0 C que constituye el 40% del total de LPC en plasma, LPC 18:2 C el 20 % y LPC 18:1 C y LPC 18:0 C que constituyen del 10 al 15 % (Ojala *et al.*, 2007).

1.8. Ácido lisofosfatídico

El ácido lisofosfatídico o lisofosfatidato (LPA) era conocido sólo como un precursor en la biosíntesis de fosfolípidos tanto en células procariontes como en eucariontes. Sin embargo, en la década de los 90's se empezó a conocer también como una molécula de señalización intercelular que es rápidamente producida y liberada por células activadas, particularmente por plaquetas, para actuar en células blanco, a través de receptores específicos. Se sabe que el LPA es un constituyente normal en suero y que se encuentra unido a albúmina en concentraciones micromolares (Moolenaar *et al.*, 1995).

Existen diferentes especies moleculares de LPA que varían en longitud y saturación de cadena de su ácido graso. Las especies de LPA con ácidos grasos saturados (16:0 C, 18:0 C) y ácidos grasos insaturados (16:1 C, 18:1 C, 18:2 C, 20:4 C) han sido detectadas en suero, plasma y plaquetas activadas (Figura 6). Interesantemente, estas especies moleculares exhiben diferentes actividades biológicas, posiblemente por la activación diferencial de receptores para LPA. En general, el LPA con ácidos grasos insaturados, el cual se produce inicialmente por fosfolipasas A₁ (PLA₁), es biológicamente más potente que el LPA con ácidos grasos saturados, el cual se produce inicialmente por fosfolipasas A₂ (PLA₂). Por ejemplo, el LPA con ácidos grasos insaturados induce proliferación de células de músculo liso *in vitro*, mientras que el LPA con ácido graso saturado, no. Este tipo de observaciones sugieren que las diferentes especies moleculares de LPA pueden tener diferentes funciones biológicas (Aoki, 2004).

A pesar de la ubicuidad y relevancia fisiológica del LPA, se conoce relativamente poco de su fisicoquímica. Teniendo un grupo hidroxilo libre y un grupo fosfato, el LPA (oleoil) es mucho más soluble en agua que otros fosfolípidos de cadena larga. Aún con

esta hidrofiliidad, el LPA no permanece necesariamente asociado a la membrana después de su formación, y por lo tanto no siempre se detecta mediante procedimientos convencionales para extracción de lípidos. A diferencia de otros lisolípidos, el LPA no causa lisis en las células bajo condiciones fisiológicas porque su cabeza estructural es relativamente pequeña (Moolenaar, 1995).

El LPA puede ser generado a través de la hidrólisis de fosfolípidos preexistentes en células activadas. El ejemplo mejor documentado concierne a las plaquetas activadas con trombina, donde a la producción de LPA le sigue su liberación al medio extracelular. La generación de LPA de plaquetas se lleva a cabo a través de una deacilación de ácido fosfatídico mediada por fosfolipasa A₂ citosólica (PLA₂). Aún no está claro en que estadio de la activación plaquetaria es producido el LPA y como se libera hacia el ambiente extracelular. Dada la gran variedad de respuestas a LPA que se han reportado, es poco probable que la producción de LPA esté restringida a las plaquetas. El LPA podría ser formado y liberado por células en respuesta a daño, probablemente debido a la activación no específica de fosfolipasas; muchos otros tipos celulares permanecen sin explorar en su capacidad de producir LPA (Moolenaar, 1995) (Figura 5).

Las concentraciones de LPA, en suero de mamífero, han sido estimadas en el rango de 1 a 10 μM , siendo oleoil, palmitoil- y araquidonoil-LPA las especies predominantes.

Receptores para LPA

Se han descrito tres receptores para el LPA acoplados a proteínas G (Peña y Riego, 2005; Contos *et al.*, 2000). Estos receptores se expresan en la mayoría de órganos y tejidos de mamíferos. Las vías de señalización que se activan en respuesta al LPA son: 1) vía de las MAPK (proteínas cinasas activada por mitógenos) responsables de la proliferación celular; 2) vía de la fosfolipasa C (PLC) con la generación de diacilglicerol e IP₃ y la consecuente activación de la proteína cinasa C (PKC) y la movilización de Ca²⁺; y 3) la activación de GTPasas de tipo Rho produciendo rearrreglos del citoesqueleto y cambios de forma celular.

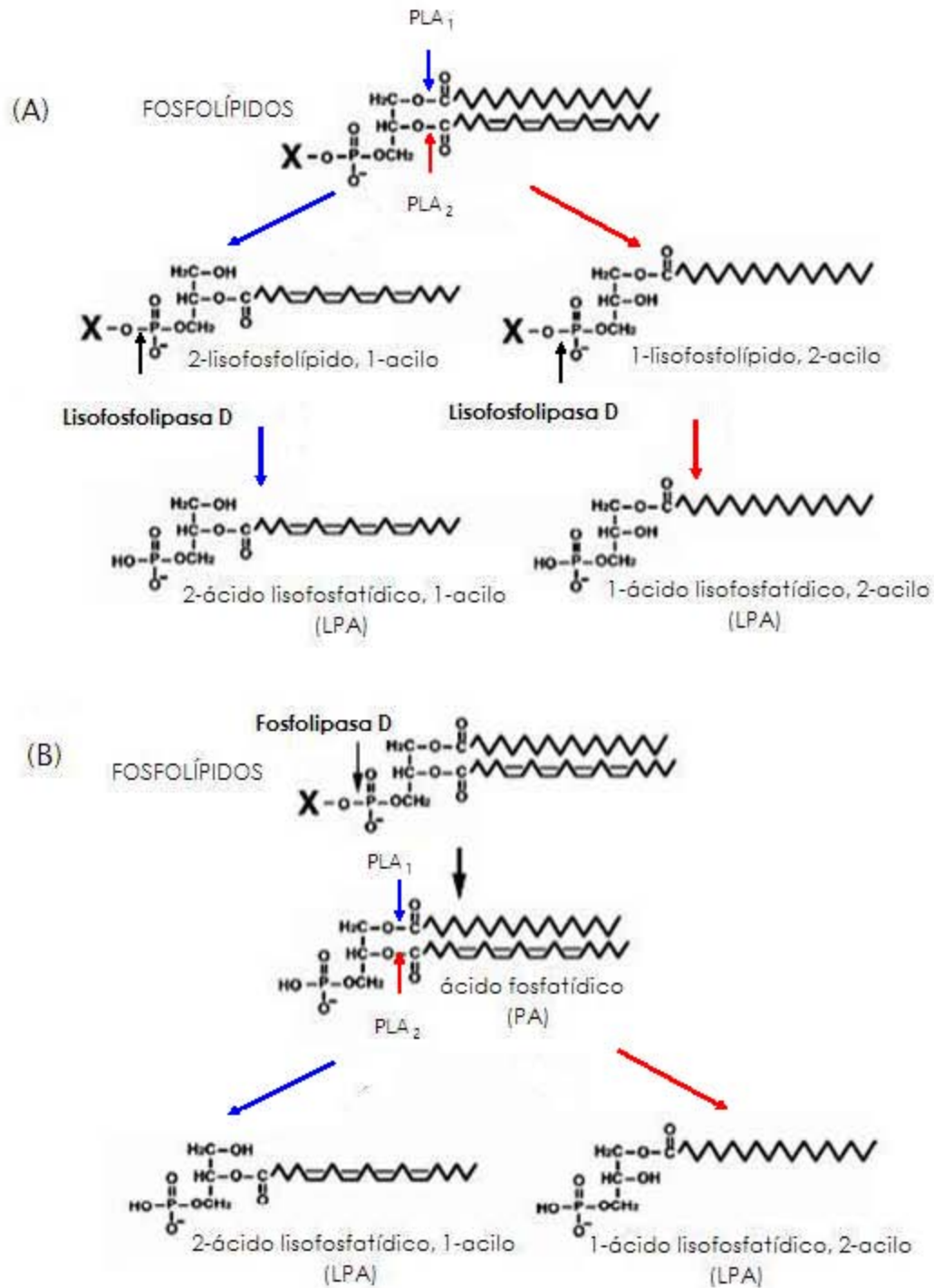


Figura 5. Vías de producción de LPA. (A) Vía fosfolipasa A₁ (PLA₁) y fosfolipasa A₂ (PLA₂) y posteriormente lisofosfolipasa D (LysoPLD) (B) Vía fosfolipasa D (PLD), seguida de PLA₁ y PLA₂. Modificado de Aoki, 2004.

2. ANTECEDENTES

2.1. Esfingomielinasa D de *Loxosceles*

Si bien es cierto que aún no quedan claros los mecanismos moleculares y celulares causantes de la fisiopatología del loxoscelismo, existe evidencia suficiente que demuestra que el componente principal y responsable de la dermonecrosis es la esfingomielinasa D (SMD) (también referida, en reportes recientes, como fosfolipasa D) del veneno de *Loxosceles*.

Diversos estudios han demostrado que la esfingomielinasa D tiene isoformas en su mayoría con actividad enzimática. En *Loxosceles reclusa* y *L. boneti* se encontraron dos isoformas activas de SMD con masa molecular que varía entre 32 y 34 KDa (Ramos *et al.*, 2004). Esfingomielinasas de tamaño similar fueron descritas en los venenos de *L. intermedia*, *L. gaucho*, y *L. laeta*.

En el 2002, Pedrosa y colaboradores generaron una toxina recombinante de *L. laeta* con actividad enzimática tal como la nativa; dicha toxina recombinante fue capaz de producir hemólisis en eritrocitos humanos y dermonecrosis en animales experimentales. En este mismo reporte se demostró que cuando la toxina recombinante es incubada inicialmente con un antisuero específico, su actividad dermonecrótica es inhibida (Pedrosa *et al.*, 2002). En otro estudio, tres isoformas recombinantes de SMD de *L. boneti* fueron obtenidas y analizadas en cuanto a su actividad y dermonecrosis en conejos; las isoformas 1 y 2 presentaron actividad enzimática y causaron dermonecrosis en conejo; la isoforma 3 no produjo dermonecrosis y resultó ser enzimáticamente inactiva (Ramos *et al.*, 2004). Resultados comparables fueron reportados para las isoformas de SMD de *L. intermedia* por Tambourgi *et al.*, 1998. Cabe destacar que en todos los casos en los que la actividad enzimática de la SMD es inhibida o no existe, la actividad necrótica no se presenta.

En el laboratorio del Dr. Alagón del Instituto de Biotecnología, UNAM, se generó un anticuerpo monoclonal capaz de inhibir la actividad enzimática de las esfingomielinasas nativas así como de las recombinantes de *L. boneti* y *L. reclusa*. Esta inhibición dio como resultado la neutralización de la actividad letal en ratón y

dermonecrótica en conejo, lo que sugiere que la letalidad y la dermonecrosis causadas por SMD están relacionadas con la actividad enzimática.

En el 2005, Murakami *et al.*, reportaron la estructura tridimensional de la SMD de *L. laeta*, enzima que tiene 57% identidad con la de *L. boneti*. En dicha estructura se muestra que los residuos de aminoácidos E32, D34 y D91 participan de manera importante en la unión a magnesio (catión divalente indispensable para la actividad de la enzima) mientras que las histidinas 12 y 47 funcionan como nucleófilos que inician el ataque en el enlace fosfoéster del sustrato. Con base en estos resultados, en 2007, la Dra. Rosana Sánchez y colaboradores, en el laboratorio del Dr. Alejandro Alagón, mutaron la proteína recombinante de *L. boneti* en los sitios H11 y E31 (equivalentes a los sitios H12 y E32 de *L. laeta*) generando un par de mutantes inmunológicamente reactivos (por ensayo de ELISA), estructuralmente similares a la nativa (por dicroísmo circular) pero inactivos enzimáticamente. Ninguna de estas mutantes resultó ser letal en ratón ni dermonecrótica en conejo. Estos resultados demuestran que la toxicidad de la SMD de *Loxosceles* está fuertemente ligada a la actividad enzimática.

Por todo lo anterior, se concluye lo siguiente:

- ✚ La SMD por sí sola es la responsable de ocasionar la patología del loxoscelismo.
- ✚ Cuando la actividad enzimática de SMD es inhibida o no existe, la actividad necrótica no se presenta.
- ✚ La toxicidad de la SMD de *Loxosceles* depende de la actividad enzimática.

La actividad enzimática de la esfingomielinasa D consiste en la hidrólisis de un enlace fosfoéster en la esfingomielina, generando dos productos: fosfoceramida y colina. Aún no está claro como la SMD actúa en la esfingomielina presente en membranas celulares, sin embargo, tenemos la hipótesis de que los fosfolípidos derivados de la acción de la SMD sobre su sustrato están implicados en la generación de necrosis (Figura 6 y Figura 7).

Además de la esfingomielina, recientemente se han reportado otros sustratos de la SMD de *Loxosceles*, por esta razón en los últimos reportes se ha propuesto denominarla fosfolipasa D y no esfingomielinasa D ya que este último término restringe su significado a una enzima que solo tiene actividad sobre esfingomielina. Es importante aclarar que

estos reportes refieren a ensayos *in vitro* por lo que se debe considerar la presentación del sustrato, es decir, si están unidos a albúmina, estructurados en micelas, etcétera. También cabe mencionar que existen diferencias en la magnitud de la actividad enzimática de la SMD presente entre las diferentes de *Loxosceles*, en general *L. laeta* posee una mayor actividad que el resto de las especies hasta ahora reportadas.

En 2004, Van Meeteren y colaboradores reportaron actividad enzimática de la SMD de *L. laeta* sobre lisofosfatidilcolina (LPC) unida a albúmina, generando ácido lisofosfatídico (LPA) y colina (Figura 7). Acorde a lo anterior, experimentos *in vitro* señalan que las toxinas recombinantes de *L. boneti* y *L. reclusa* tienen actividad sobre lisofosfatidilcolina asociada a albúmina, y que tal actividad es menor que la observada sobre esfingomiélinas (Olguín, 2006)

Figura 6. Hidrólisis de la esfingomiélinasa D (SMD) de *Loxosceles* sobre esfingomiélinas liberando fosfoceramida y colina. En color azul se muestra la cadena hidrocarbonada no variable y en rojo se muestra el ácido graso que puede variar en longitud y saturación de la cadena.

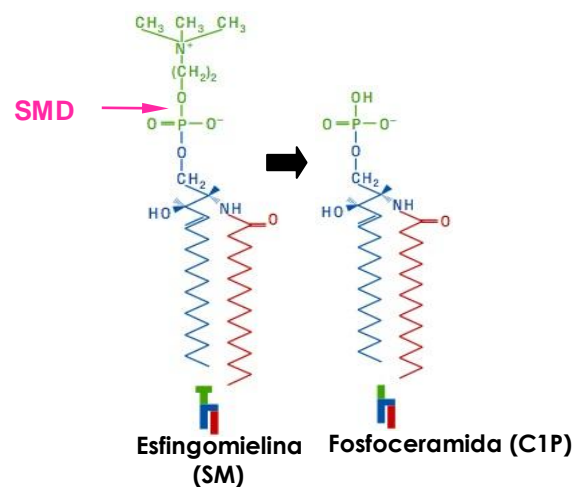
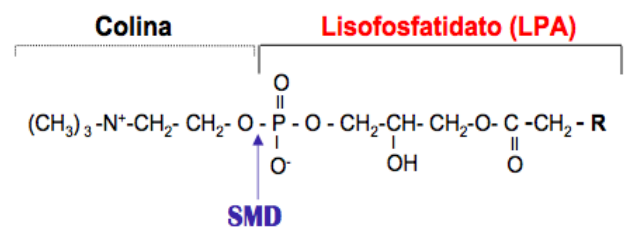


Figura 7. Hidrólisis de la esfingomiélinasa D (SMD) de *Loxosceles* sobre lisofosfatidilcolina (LPC) liberando ácido lisofosfatídico (LPA) y colina. R: acilo sustituyente que puede variar en longitud de cadena y saturación.



Posteriormente, en 2005, ensayos *in vitro* mostraron que la toxina recombinante de *L. reclusa* además de tener actividad sobre esfingomiélinas, también presenta actividad sobre LPC (Lisofosfatidilcolina), LPI (18:1-1-oleoil-Lisofosfatidilinositol), LPS (18:1-1-oleoil-Lisofosfatidilserina), LPG (18:1-1-Lisofosfatidilglicerol), LBPA (18:1-1-ácido lisobifosfatídico), Liso-PAF (liso-factor activador de plaquetas) y cPA (ácido fosfatídico cíclico). A partir de estos sustratos, excepto de Liso-PAF y esfingomiélinas, se genera ácido lisofosfatídico producto de la actividad enzimática de la toxina (Lee y Lynch, 2005).

Considerando el papel de los esfingolípidos y sus derivados como mediadores de múltiples respuestas celulares y también como componentes estructurales de la célula, es muy interesante evaluar su efecto en la fisiopatología del loxoscelismo.

Como se mencionó anteriormente, existen importantes diferencias cuando se evalúa el efecto del veneno *in vivo* respecto a ensayos *in vitro* por lo cual resulta importante la evaluación de los productos (fosfoceramida y lisofosfatidatos) generados por la toxina de *Loxosceles* en ensayos *in vivo* en conejos como modelo de loxoscelismo local (dermonecrosis) y en ratones como modelo sistémico, ya que se ha reportado que en ratones no hay dermonecrosis pero si se presentan efectos sistémicos que llegan a la muerte.

2.2. Fosfoceramida (C1P)

En los últimos años se han publicado distintos reportes en los que la C1P está implicada en diversas funciones biológicas que varían dependiendo del tipo celular.

In vitro, se ha reportado que la C1P es mitogénica en fibroblastos, bloquea apoptosis de macrófagos, controla la fagocitosis en neutrófilos, y es mediador en respuestas inflamatorias.

En 2004, se reportó que la SMD incrementa la liberación de ácido araquidónico en células de carcinoma de pulmón A549. Los autores de este trabajo concluyen que este efecto se debe a la C1P generada por la SMD ya que se observó que en células pre-tratadas con esfingomielinasa C, lo cual hidroliza la esfingomielina generando ceramida, y por lo tanto remueve el sustrato de la SMD, se inhibe la liberación de ácido araquidónico. Este trabajo muestra que la esfingomielina es necesaria como sustrato para SMD y que la C1P es la responsable de la liberación del ácido araquidónico (Pettus *et al.*, 2004).

Acorde a lo anterior, se ha propuesto que la C1P pudiera contribuir al proceso inflamatorio observado en el loxoscelismo promoviendo la liberación del ácido araquidónico y en consecuencia la síntesis de eicosanoides (Gómez, 2004).

2.3. Ácido lisofosfatídico (LPA)

Si bien aún no han sido exploradas con precisión todas sus funciones fisiológicas y patológicas, actualmente se sabe que el LPA es un lisoderivado lipídico que está involucrado en varias respuestas biológicas.

En los últimos 10 años, se han reportado las siguientes funciones del LPA:

- ❖ El LPA es generado por plaquetas activadas después de un daño endotelial durante la coagulación sanguínea, favoreciendo la agregación plaquetaria. (Ruwich *et al.*, 2001 y Baker *et al.*, 2001).
- ❖ Puede atraer y activar monocitos y macrófagos humanos circulantes en el sitio de la lesión vascular (Fueller *et al.*, 2003; Tigyi, 2001; Goetzl, 1998; Hl a T, 2001).
- ❖ Estimula migración y proliferación de células endoteliales y la expresión de moléculas de adhesión endotelial así como la adhesión de monocitos a células endoteliales (Rizza, 1999; Siess, 2002).
- ❖ Bloquea apoptosis en monocitos y macrófagos, en concentraciones nanomolares (Eichholtz, 1993; Yatomi, 1997).
- ❖ Estimula linfocitos T para migrar y secretar IL-2 y metaloproteasas de matriz extracelular (Goetzl, 2000; Zheng, 2001)
- ❖ Mediante la activación de NF-kB aumenta la expresión de genes proinflamatorios en células endoteliales (Palmetshofer, 1999).
- ❖ *In vitro*, el LPA en concentraciones micromolares promueve exposición de fosfatidilserina en eritrocitos de humano, generando pérdida de asimetría y hemólisis. (Seung *et al.*, 2007).

Algunas de las funciones reportadas para el LPA pueden iniciar y perpetuar procesos patofisiológicos como la inflamación. Es muy posible que varios de los efectos del veneno de la araña *Loxosceles* se deban a una aberrante producción de LPA y su subsecuente señalización descoordinada.

Las características estructurales del LPA que son importantes para su actividad biológica están en estudio. Un hallazgo consistente es que la máxima actividad de LPA es observada con cadenas acilo de longitud grande (C_{16} a C_{20}) y que la actividad baja con la disminución de la longitud de la cadena acilo.

2.4. Macrófagos

Como ya se mencionó anteriormente, los mecanismos fisiopatológicos del loxoscelismo apenas se empiezan a conocer. Sin embargo, estudios previos han demostrado que inicia como un proceso inflamatorio que se prolonga, exacerbando la respuesta inflamatoria que culmina en dermonecrosis.

Diferentes análisis histopatológicos de la dermonecrosis inducida por la SMD de *Loxosceles* han mostrado un reclutamiento masivo de neutrófilos, sin embargo, varios experimentos *in vitro* demuestran que los neutrófilos no son directamente activados por la SMD (Smith *et al.*, 1970; Patel *et al.*, 1994; Domingos *et al.*, 2003 y Tambourgi *et al.*, 2005). Esto sugiere la participación de moléculas de transducción de señales como intermediarias en la activación, migración y acumulación de neutrófilos en la pared endotelial de los vasos sanguíneos.

Con base en lo anterior, surgió la hipótesis de que la fosfoceramida (C1P), generada por acción de la SMD de *Loxosceles*, estimula la producción del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). Este factor participa en el proceso inflamatorio promoviendo la expresión de moléculas de adhesión para neutrófilos en las células del endotelio y estimulando la secreción de quimiocinas en macrófagos, entre ellas, IL-8 que es un potente factor quimiotáctico para los neutrófilos.

Al respecto, en el 2003 ensayos *in vitro* mostraron que el veneno de *L. gaucho* en presencia de esfingomielina adicionada induce la liberación de TNF- α en macrófagos murinos (Domingos *et al.*, 2003).

Cabe mencionar que durante el proceso inflamatorio, los macrófagos juegan un papel crítico en la iniciación, el mantenimiento, y la resolución de la inflamación, activándose y desactivándose durante el proceso.

En el proceso inflamatorio los macrófagos llegan poco después de los neutrófilos. Son atraídos por varios mediadores entre los que se incluyen las proteínas quimioatrayente de macrófagos MIP-1 α y MIP-1 β . Estos macrófagos son células activadas que muestran incremento de la fagocitosis y de la liberación de mediadores y citocinas que contribuyen a la inflamación.

Los macrófagos también participan en la última parte de la fase inflamatoria, regulando la llegada de monocitos y fibroblastos, liberando factores angiogénicos y de crecimiento, los cuales son importantes para la migración y proliferación celular y la formación de la matriz extracelular. Se consideran las células clave en la transición entre la fase inflamatoria y la de proliferación.

Por otro lado, la producción de citocinas proinflamatorias (IL-1 α , IL-1 β , IL-6 y TNF- α) por los macrófagos perpetúa el proceso inflamatorio

Los macrófagos llevan a cabo sus funciones, en gran parte, a través de vías de señalización que involucran la vía de las MAPK.

2.5 p 38 MAPK (Proteínas cinasas activadas por mitógeno)

En mamíferos, el término general MAPK (mitogen-activated protein Kinase) comprende a una superfamilia de proteínas cinasas que pueden ser activadas por una amplia variedad de estímulos. Su activación depende de la señal iniciada por receptores de factores de crecimiento fosforilados en tirosina, receptores de hormonas (como la hormona del crecimiento), receptores asociados a proteínas G o de receptores de citocinas inflamatorias como los de la familia del TNF- α .

La activación de las MAPKs en respuesta a estos estímulos controla la expresión de genes, el metabolismo celular y funciones del citoesqueleto, contribuyendo a la regulación de procesos celulares tan complejos como la migración, la mitogénesis, la diferenciación o la supervivencia celular.

Las MAPK se clasifican en tres grupos dependiendo del estímulo que induce su activación.

1. ERK-1/2 (Extracellular Signal-Regulated Kinase)
2. JNK/SAPK1 (c-Jun NH₂-terminal Kinase/Stress-Activated Protein Kinase 1)
3. SAPK2 (Stress-Activated Protein Kinase 2)

La activación de cada familia de MAPK se produce en forma de cascada. Dicha cascada está formada por tres módulos con actividad cinasa, donde los miembros del módulo superior fosforilan y activan a los miembros del módulo inferior. Estos módulos se esquematizan como MAPKKK-MAPK-MAPK. De esta manera, el tercer módulo, correspondiente a las familias ERK, JNK y p38 (MAPK) serán fosforiladas y activadas por las MAPKKs y éstas a su vez serán fosforiladas y activadas por serina/treonina quinasas que funcionan como MAPKKK.

En general, los estímulos mitogénicos promueven principalmente la activación de las cinasas ERK, mientras que estímulos de estrés celular inducen la activación de JNK/SAPK1 y SAPK2 cuyo componente principal es p 38.

Activación de p38

Este subgrupo de las MAP cinasas comprende a cuatro miembros de serina/treonina cinasas de 38 KDa, de ahí su nombre. Estas isoformas son conocidas como p38 α (también denominada SAPK2a), p38 β (SAPK2b), p38 γ (SAPK3 o ERK6) y p38 δ (SAPK4). Son fuertemente activadas *in vivo* por condiciones de estrés en el entorno celular y citocinas inflamatorias.

La activación de la MAPK p38 está involucrada con la regulación de movilidad celular y también con la fosforilación de la fosfolipasa citosólica A₂ (cPLA₂) teniendo un papel relevante en el inicio y regulación de la producción de eicosanoides los cuales son mediadores del proceso inflamatorio (Kramer *et al.*, 1996).

Por lo anterior, es interesante conocer si la SMD de *Loxosceles* es capaz de activar la MAPK p38 en macrófagos. También sería importante discernir si la activación de la MAPK p38 es atribuible a la actividad enzimática de la SMD, lo cual pudiera implicar la participación de los productos generados de la hidrólisis de esfingomielina.

3. JUSTIFICACIÓN

El entendimiento de la implicación de fosfoceramida y lisofosfatidato en relación a mecanismos de daño celular e inflamación es importante para definir los primeros eventos de la fisiopatología del loxoscelismo. Este conocimiento pudiera ser útil para sugerir nuevas alternativas terapéuticas.

4. HIPÓTESIS

Los productos de la actividad de la SMD, fosfoceramidas o lisofosfatidatos, son los responsables de disparar los mecanismos fisiopatológicos que terminan en dermonecrosis y en los efectos sistémicos.

La acción de las fosfoceramidas y lisofosfatidatos varía de acuerdo al acilo sustituyente.

5. OBJETIVOS

Objetivo General

Analizar la capacidad de varias especies moleculares de lisofosfatidatos y fosfoceramidas para inducir dermonecrosis en conejos y efectos sistémicos en ratones.

Objetivos Particulares

- Estudiar el efecto de diferentes especies lisofosfatidatos y fosfoceramidas inyectadas por vía intradérmica en conejos.
- Evaluar la toxicidad de diferentes especies de lisofosfatidatos y fosfoceramidas inyectadas por vía intravenosa en ratones.
- Evaluar la actividad de la SMD de *Loxosceles* sobre eritrocitos.
- Evaluar si la SMD de *Loxosceles* es capaz de activar la p38 MAPK en macrófagos murinos peritoneales.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Estrategia experimental

La siguiente tabla expone la estrategia experimental del presente proyecto, el cual se divide en dos partes. La primera parte consta de la evaluación de los efectos *in vivo* de lisofosfatidatos (LPA) y fosceramidas (C1P), utilizando como modelo de loxoscelismo local el conejo y como modelo sistémico el ratón, esto se propuso con base en la experiencia previa que indica que la SMD de *Loxosceles* causa dermonecrosis en conejos, mientras que en ratones provoca muerte sin evidencia de dermonecrosis, los mecanismos celulares y moleculares por los que ocurre esta diferencia aún se desconocen. La segunda parte se refiere a la evaluación de los efectos a nivel celular de la SMD de *Loxosceles*, se utilizaron eritrocitos como sustrato para medir la actividad enzimática de la SMD, ya que hasta ahora solo se tienen antecedentes de valores de actividad enzimática sobre esfingomielina unida a albúmina pero no en un modelo celular; por otro lado, se usaron macrófagos peritoneales murinos para evaluar la activación de MAPK p38.

<p>1. Evaluación de los efectos provocados <i>in vivo</i> por:</p> <p>LPA 6:0 C, 14:0 C, 16:0 C, 17:0 C, 18:0 C, 18:1 C y 20:4 C</p> <p>C1P 2:0 C, 8:0 C y 14:0 C</p> <p>Y otras C1P generadas <i>in vitro</i> a partir de esfingomielina</p>	<p>1.1. LOCALES</p> <p>Inyección vía intradérmica de LPA y C1P en conejos</p>	<p>Monitoreo de efectos locales</p>
	<p>1.2. SISTÉMICOS</p> <p>Inyección vía intravenosa de LPA y C1P en ratones.</p>	<p>Observación de efectos en comportamiento y signos vitales</p> <p>Letalidad</p>
<p>2. Evaluación de los efectos provocados a nivel celular por la SMD de <i>Loxosceles</i></p>	<p>2.1. ERITROCITOS</p>	<p>Actividad enzimática de la SMD sobre eritrocitos mediante el método modificado de Amplex Red®</p>
	<p>2.2. MACRÓFAGOS</p>	<p>Activación de la MAPK p38 Mediante Western Blot para detectar la proteína p 38 fosforilada</p>

6.2. Preparación LPA y C1P

6.2.1. Establecimiento de las cantidades de LPA y C1P para inoculación en animales

Dado que 10 μg de SMD generan una clara dermonecrosis en conejo y que la dosis letal media (cantidad de veneno necesaria para causar muerte en el 50% de una población establecida) de la SMD recombinante de *L. boneti* en ratones cepa BALB/c es de 5 μg /ratón, se tomaron los valores de actividad de la toxina sobre lisofosfatidilcolina (LPC) y sobre esfingomielina (SM) para calcular la cantidad de producto que se podría liberar con 10 μg de SMD en 1 hora.

Cálculos de las C1P:

La SMD tiene una AE = 1.33 U/mg sobre SM (Ramos *et al.*, 2004). Por lo tanto, se podrían generar 0.8 μmoles (500 μg) de producto (C1P) /1h/10 μg de SMD.

Para el caso de los LPA:

La SMD actúa a razón de 212 nmol /min/mg, sobre LPC 18:1 como sustrato (van Meeteren *et al.*, 2004). Por lo tanto se podrían generar aproximadamente 0.1 μmoles (50 μg) de producto (LPA)/1h/10 μg de SMD.

Cabe mencionar que con base en este último cálculo, se realizaron ensayos preliminares en los que se inyectaron ratones con 50 μg de LPA sin embargo no se observó efecto alguno, posteriormente se inyectaron otros ratones con 100 μg de LPA dando el mismo resultado por lo que se decidió trabajar con 500 μg de LPA que equivale a aproximadamente 1 μmol (Tabla 1), misma cantidad que resultó de los cálculos para la C1P.

Tabla 1. Relación de micromoles de las diferentes especies moleculares de LPA en 500 µg.

Especie molecular de LPA	µmoles en 500 µg
20:4 C	1.05
18:1 C	1.09
18:0 C	1.09
17:0 C	1.2
16:0 C	1.16
14:0 C	1.24
6:0 C	1.74

6.2.2. Preparación de LPA y C1P disponibles comercialmente

Inicialmente para solubilizar los lisofosfatidatos (LPA) y fosfoceramidas (C1P), se le adicionaron diferentes proporciones de etanol:agua (conforme a lo recomendado por la casa comercial Avanti Polar Lipids®) y posteriormente se sonicaron. El proceso de sonicación se realizó siempre antes de inyectar los productos (LPA y C1P) en el animal en estudio: conejo o ratón.

Como control negativo, se inyectaron ratones con la proporción de etanol:agua usada en la preparación de LPA y C1P y se observó que el etanol altera el comportamiento normal del ratón, para evitar que esto interfiriera con el efecto que pudieran provocar las C1P y los LPA, a las preparaciones de LPA y C1P se les evaporó el etanol bajo N₂ y se les adicionó agua para llegar a la concentración establecida, posteriormente se sonicaron formando suspensiones homogéneas y traslúcidas en el caso de los LPA 6:0 C, 14:0 C, 16:0 C y 18:1 C. mientras que con los LPA 20:4 C, 18:0 C y 17:0 C se obtuvieron soluciones homogéneas pero no traslúcidas.

Para comprobar que, durante el paso de los LPAs de etanol:agua a únicamente agua, se mantiene la cantidad del LPA y no se pierde por adherencia al tubo, se realizó lo siguiente:

Se preparó una muestra LPA 18:1C en etanol: agua y otra muestra de LPA 18:1 C en etanol: agua a la que se le evaporó el etanol bajo N₂ y se ajustó con agua a la concentración establecida. Posteriormente, de estas muestras se aplicaron por separado 50 y 17 microgramos de cada una en una capa fina de gel de silica sobre vidrio y se expuso a vapor de yodo durante 40 minutos.

Los resultados demuestran que se mantiene aproximadamente la misma cantidad de LPA (Figura 8) en la suspensión de LPA en etanol:agua y después de la evaporación del etanol y resuspensión en agua sola.

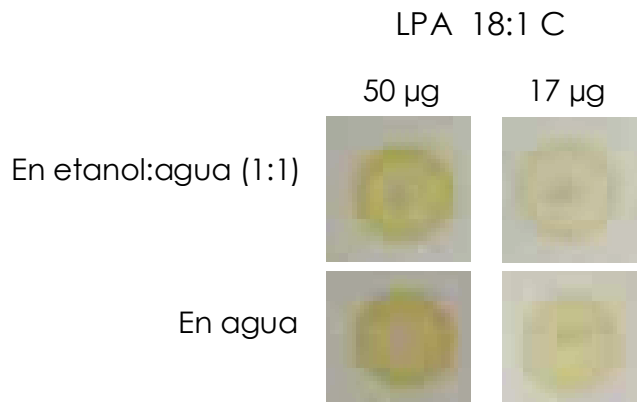


Figura 8. Ácido lisofosfatídico (LPA) en capa fina teñida con vapor de yodo. En una capa fina de silica, se colocaron 50 y 17 µg de LPA 18:1 resuspendido en etanol:agua (1:1) (imágenes superiores izquierda y derecha) y en otro punto se colocaron las mismas cantidades de LPA que fueron resuspendidos en etanol:agua (1:1) posteriormente evaporados de etanol bajo N₂ y resuspendidos en agua sola (imágenes inferiores izquierda y derecha). Se observa una intensidad similar en la tinción tanto en las preparaciones en etanol:agua como en las preparaciones que quedaron con agua sola, lo cual indica que no hay una pérdida de muestra durante la evaporación de etanol y posterior resuspensión en agua.

6.3. Obtención de C1P a partir de diferentes especies moleculares de SM

6.3.1. Especies moleculares de esfingomielinas usadas como sustrato para obtener C1P

Para ampliar el rango de C1P a evaluar en ratones y conejos, se decidió obtener otras especies moleculares diferentes a las disponibles comercialmente. Para ello, se utilizó la SMD recombinante de *L. boneti* y como sustrato se utilizaron por separado las siguientes esfingomielinas (SM):

- SM de leche con especie molecular mayoritaria de 23:0 C.

Los porcentajes de cada especie molecular presentes en la SM de leche (Avanti Polar Lipids) son los siguientes: 33% de 23:0 C, 20% de 24:0 C, 19% de 22:0 C, 19 % de 16:0 C, 3% de 24:1 C, 3 % de 18: 0 C, 2% de 20:4 C y 1 % de 20:0 C.

- SM de cerebro de bovino con especie molecular mayoritaria de 18:0 C

Los porcentajes de cada especie molecular presentes en la SM de cerebro de bovino (Avanti Polar Lipids) son los siguientes: 46% de 18:0 C, 7% de 22:0 C, 6 % de 24:1 C, 5% de 20:0 C y 34 % de otros no identificados.

- SM de eritrocitos de origen porcino, cuya especie molecular mayoritaria es de 24:0 C (Matreya LLC).
- SM 18:1 C (Avanti Polar Lipids)
- SM 12:0 C (Avanti Polar Lipids)

6.3.2. Procedimiento para la obtención de la SMD recombinante de *L. boneti*

El cultivo celular y la expresión de SMD recombinante de *L. boneti* se realizó siguiendo el protocolo previamente desarrollado (Olvera *et al.*, 2006) y optimizado que a continuación se describe: se realizó un precultivo celular, inoculando una pequeña cantidad de la bacteria *E. coli* transformada, en medio LB (Luria-Bertani) con 100 µg/mL de ampicilina, se incubó a 37°C, en agitación constante, toda la noche. Posteriormente, se transfirieron 10 mL del precultivo a 50 mL de medio LB con 100 µg/mL de ampicilina, se incubó a 30°C, en agitación constante hasta alcanzar una OD₆₀₀ = 0.6. Para inducir la proteína (SMD) se incubó con 0.1 mM de IPTG a 20°C, en agitación constante durante 16 horas.

Para obtener la SMD soluble, el cultivo se centrifugó a 8000 rpm a 4°C durante 20 minutos. El pellet se resuspendió en 4 mL de buffer de lisis Bug Buster (Novagen®), 25 U/mL de benzonasa (Novagen®) y 1 KU/mL de lisozima (Novagen®), se incubó 20 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. Después, se centrifugó a 13000 rpm durante 25 minutos a 4°C y se recuperó el sobrenadante (SMD soluble).

Partiendo del sobrenadante, la SMD se purificó por cromatografía de afinidad usando una resina acoplada a Níquel (Ni-NTA Invitrogen®). Una vez, colocado el sobrenadante en la columna, se realizaron lavados con PBS (Buffer Salino de Fosfatos) + 25 mM imidazol para evitar el pegado inespecífico de otras proteínas y se eluyó con PBS + 250 mM de imidazol.

La SMD recombinante se dializó contra PBS y se analizó por SDS-PAGE (12.5%) de acuerdo a los protocolos estándar (Laemmli, 1970) en condiciones reductoras y tinción con azul de Coomassie. La concentración de toxina dializada se determinó por el método de cuantificación del ácido bicinconínico (BCA-Pierce®). La actividad enzimática de la SMD se determinó mediante el Kit comercial de Amplex Red (Invitrogen®).

6.3.3. Procedimiento para la obtención de C1P a partir de SM utilizando la SMD de *Loxosceles*

Para obtener C1P a partir de SM, se preincubaron 10 µg de la SMD recombinante de *L. boneti* en el buffer de reacción [0.1M TrisHCl pH 7.5, 10mM MgCl₂, 4mg/mL BSA] a 37°C durante 30 minutos, después se adicionaron 5 mM de SM (ver sección 6.3.1.) en tritón X-100 2% y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente, posteriormente se llevó a ebullición durante 5 minutos para inactivar la SMD presente en la preparación, se centrifugó a 14000 rpm durante 1 minuto, se recuperó el sobrenadante y se sonicó previo a la inyección en el animal en estudio.

Considerando que se inyecta el sobrenadante a los animales y que en tal sobrenadante pudiera quedar algún remanente de la SMD hervida, se evaluó si la SMD se inactiva por ebullición y por lo tanto no genera algún efecto en los animales. Para ello, se incubaron 10 µg de SMD en buffer de reacción a 37°C durante 30 minutos y se hirvió durante 5 minutos, se centrifugó a 14000 rpm durante 1 minuto, se recuperó el sobrenadante, se sonicó y se inyectó en el animal en estudio. Los resultados mostraron que sometida a ebullición, la SMD se inactiva y no produce efecto en el animal.

Como control negativo, se sometió el buffer de reacción a las condiciones mencionadas en el primer párrafo de esta sección, sin SMD y sin SM, el sobrenadante resultante se sonicó antes de inyectarlo en los animales.

Otro control del ensayo fue la incubación de SM en las condiciones de reacción pero adicionándole SMD previamente inactivada por ebullición, de esta manera, en el sobrenadante se obtuvo solo SM, éste se sonicó e inyectó en animales para comparar el efecto de la SM a partir de la cual se obtuvo la C1P y el efecto provocado por la C1P.

También, se inyectó la SM sola sin haber sido tratada en la condiciones de reacción enzimática, esto para observar si provocaba un efecto diferente en comparación con la SM que sí se expuso a las condiciones de reacción enzimática.

6.3.4. Detección indirecta de C1P producida por la SMD a partir de esfingomielina.

Para comprobar que se genera C1P a partir de SM en las condiciones de reacción enzimática detalladas en la sección 6.3.3., se propuso detectar colina en el sobrenadante, esto con fundamento en que la SMD hidroliza un enlace fosfoéster de la SM liberando dos productos: colina y C1P, si esto se lleva a cabo correctamente entonces la colina puede estar presente en el sobrenadante de la reacción.

Con base en lo anterior, se realizó la determinación de colina en los sobrenadantes mediante una modificación al método Amplex Red® el cual hace uso de una colina oxidasa, la cual oxida a la colina, generando betaína y peróxido de hidrógeno. El peróxido reacciona con el reactivo de Amplex Red® (10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazina) en presencia de la peroxidasa (HRP) y genera un compuesto colorido conocido como resorufina el cual se midió por Absorbancia a 550 nm (Figura 9).

Como controles negativos para el ensayo se usaron la mezcla de reacción en ausencia de SM y SMD, y la mezcla de reacción con la SM sin SMD.

6.4. Inoculación de LPA y C1P en conejos y ratones

Como modelo de loxoscelismo local, se utilizaron conejos raza Nueva Zelanda, hembras de 2 a 3 Kg, se les rasuró el dorso y se les inyectó el LPA o la C1P por vía intradérmica, por otro lado, como modelo del loxoscelismo sistémico, se utilizaron ratones de la cepa BALB/c de 18 a 20 g, se les inyectó LPA o C1P por vía intravenosa en la vena caudal.

Los animales fueron suministrados con alimento y agua *ad libitum* y mantenidos conforme a la NOM-062-ZOO-Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de la laboratorio.

6.5. Medición de actividad de SMD de *Loxosceles* sobre eritrocitos

6.5.1. Prueba de estabilidad de eritrocitos en diferentes buffers

Antes de llevar a cabo el ensayo de medición de actividad de la SMD de *Loxosceles* sobre eritrocitos, se realizó una prueba de estabilidad de los eritrocitos en diferentes buffers, esto con la finalidad de establecer la mejor condición experimental en la que no se tuviera lisis de eritrocitos asociada al buffer de incubación.

Para ello, se colectó sangre humana en PBS 1X, los eritrocitos se aislaron por centrifugación a 750 g durante 5 minutos y se lavaron 2 veces con PBS 1X, posteriormente se separaron en diferentes tubos y el pellet se resuspendió en los diferentes buffers de prueba (quedando a 5% de eritrocitos).

Se probaron tres buffers: PBS 1X, buffer de reacción enzimática [100 mM Tris HCl pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 4 mg/mL BSA] y buffer de reacción enzimática adicionado con 40 mM de NaCl.

Una vez colocados los eritrocitos en el buffer correspondiente, se incubaron a temperatura ambiente y con agitación suave durante 30, 60, 120 y 180 minutos, transcurridos los diferentes intervalos de tiempo, se centrifugaron y se colectó el sobrenadante al cual se le midió la absorbancia a 570 nm ($A_{570\text{ nm}}$) para estimar la cantidad de hemoglobina liberada como un indicador de lisis celular y por lo tanto de la estabilidad de los eritrocitos.

Los resultados mostraron que el buffer de actividad enzimática adicionado con 40 mM de NaCl, es la mejor condición para mantener los eritrocitos hasta por 180 minutos, ya que generó los valores más bajos de $A_{570\text{ nm}}$ indicando una menor liberación de hemoglobina y mayor estabilidad de los eritrocitos (Tabla 2).

Tabla 2. Ensayo de estabilidad de eritrocitos. Valores de absorbancia a 570 nm ($A_{570\text{ nm}}$) del sobrenadante de eritrocitos incubados en PBS (Buffer salino de fosfatos), buffer de actividad enzimática [100 mM Tris HCl pH 7.5, 10 mM MgCl_2 , 4 mg/mL BSA] y buffer de actividad enzimática adicionado con 40 mM de NaCl.

Tiempo(min)	Buffer de incubación de eritrocitos	$A_{570\text{ nm}}$ del sobrenadante
30	PBS	0.152
	Buffer de actividad enzimática	0.135
	Buffer de actividad enzimática + 40mM NaCl	0.062
60	PBS 1	0.287
	Buffer de actividad enzimática	0.157
	Buffer de actividad enzimática + 40mM NaCl	0.082
120	PBS	0.305
	Buffer de ensayo	0.337
	Buffer de ensayo + 40mM NaCl	0.119
180	PBS 1X	0.325
	Buffer de ensayo	0.670
	Buffer de ensayo + 40mM NaCl	0.163

6.5.2. Ensayo de actividad de diferentes cantidades de SMD sobre eritrocitos.

Tomando como referencia los resultados generados en el ensayo de estabilidad de los eritrocitos (sección 6.5.1.), se realizaron preparaciones con eritrocitos (de sangre humana y sangre de conejo por separado) al 5% en buffer de actividad enzimática adicionado con NaCl [100 mM Tris HCl pH 7.5, 10 mM MgCl_2 , 4 mg/mL BSA, 40 mM NaCl], se estimularon con diferentes cantidades de SMD recombinante de *Loxosceles* y como control ("blanco") se colocaron los eritrocitos sin SMD, todas las preparaciones se incubaron a 37° C durante 30 minutos en agitación suave, al término se centrifugaron a 2000 rpm durante 1 minuto y se recuperó el sobrenadante.

Posteriormente, se tomaron 100 microlitros del sobrenadante obtenido de cada una de las preparaciones y se analizaron por separado con el método de Amplex Red® (Invitrogen) en el cual la colina liberada (por acción de la SMD sobre esfingomielina) es oxidada y mediante reacciones acopladas se genera un compuesto colorido que se mide por absorbancia a 550 nm (Figura 9).

Cabe mencionar que se también se realizaron ensayos variando el porcentaje de eritrocitos incubando con una cantidad fija de SMD siguiendo el mismo procedimiento general descrito arriba.

Método colorimétrico Amplex Red®

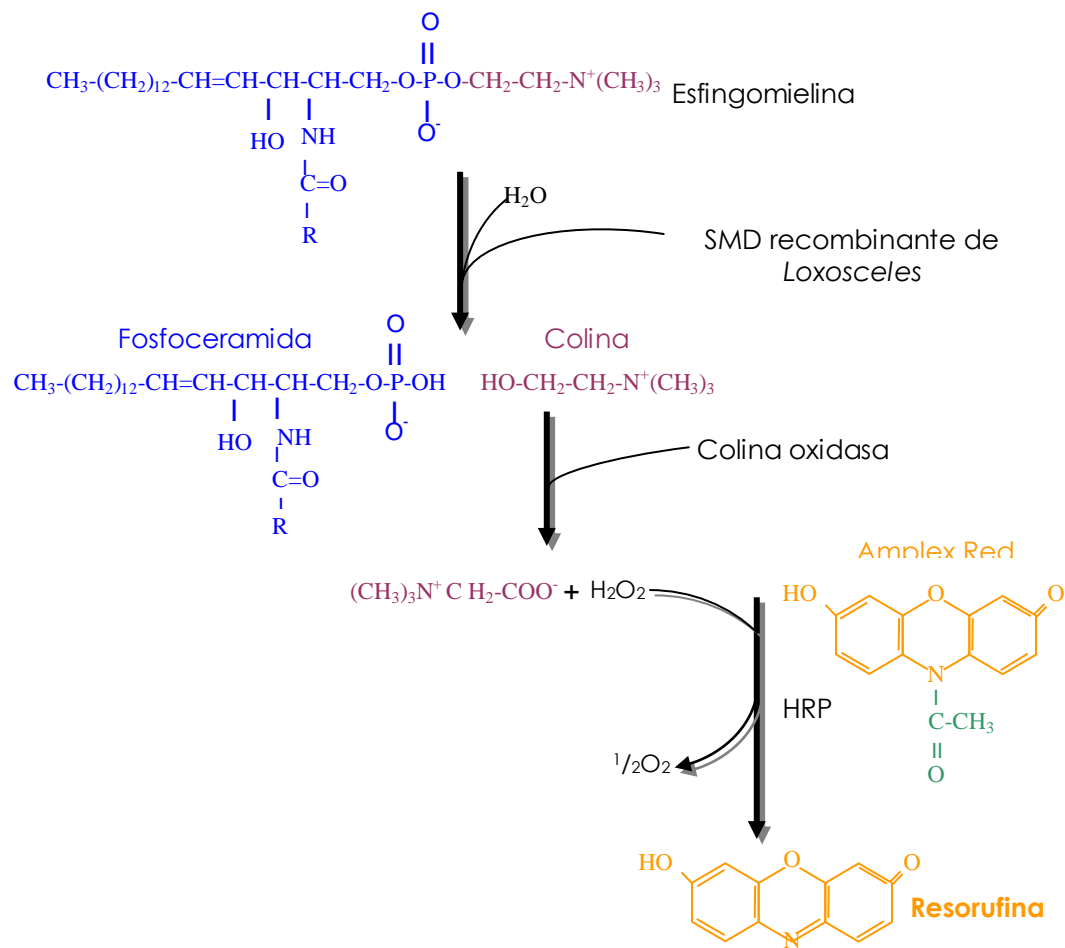


Figura 9. Esquema del método colorimétrico Amplex Red®. El método se basa en el uso de la colina oxidasa la cual oxida a la colina (liberada por acción de la SMD de *Loxosceles* sobre esfingomielina), generando betaína y peróxido de hidrógeno que reacciona con el reactivo de Amplex Red® (10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazina) en presencia de la peroxidasa (HRP) y genera un compuesto colorido conocido como resorufina el cual se mide por absorbancia a 550 nm.

6.6. Activación de la MAPK p38 en macrófagos

6.6.1. Obtención de SMD recombinante y SMD mutante de *Loxosceles*

Las SMD de *Loxosceles* utilizadas para estimular los macrófagos, se obtuvieron y analizaron tal como se describe en la sección 6.3.2.

6.6.2. Purificación de macrófagos

Se inyectaron ratones de 18 a 20 g de las cepas BALB/c y C57 (Harlan) con 1 mL de tioglicolato 3% por vía intraperitoneal, se mantuvieron en condiciones estériles durante 3 días y se sacrificaron por dislocación cervical. Para cosechar los macrófagos peritoneales, se lavó la cavidad peritoneal 3 veces con 5 mL de PBS estéril frío, se centrifugó a 125 X g durante 5 minutos y se recuperaron las células en 5 mL de RPMI completo (10% suero fetal bovino, 2 mM de L-glutamina, 1U/mL de penicilina, 1 µg/mL de estreptomicina y 4.5 mg/mL de glucosa), posteriormente se cultivaron en cajas de Petri 1X10⁶ células en 5 mL de RPMI completo y se incubaron durante 1 hora a 37°C con 5% CO₂ y 90% humedad. Después, se lavaron las cajas de Petri con PBS para eliminar las células no adheridas. A las células adheridas se le adicionó 5 mL de RPMI completo y se mantuvieron durante 24 h a 37°C con 5% CO₂ y 90% humedad, para su posterior estimulación (Montero, 2008).

6.6.3. Estimulación de macrófagos

Los macrófagos adheridos se estimularon en 2 mL de RPMI completo con diferentes estímulos por separado: 1 µg de SMD recombinante de *Loxosceles*, 1 µg de SMD mutante (inactiva enzimáticamente) de *Loxosceles*, como control positivo 10 ng/mL de lipopolisacárido (LPS) y como control negativo buffer de fosfatos salino (PBS).

6.6.4. Extractos totales de proteína

Después del estímulo, los macrófagos se lavaron con PBS frío y se prepararon extractos totales de proteína. Para ello, los macrófagos se resuspendieron en buffer de lisis (Tris 20 mM pH 7.4, NaCl 250 mM, β-glicerolfosfato 25 mM, PPINa 2 mM, EDTA 2 mM

pH 7.4, Tritón X-100 1% y glicerol 10%) complementado con inhibidores de proteasas y fosfatasa (antipaina 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, aprotinina 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, DTT 0.5mM, leupeptina 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, pepstatina 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, PMSF 1 mM, 200 mM Na_3VO_4), se incubaron 15 minutos a 4°C y se centrifugaron a 14 000 X g durante 10 minutos a 4°C; se recuperaron los sobrenadantes y se guardaron a -70°C para su posterior análisis.

6.6.5. Western Blot para detectar p38 fosforilada.

Los extractos totales se descongelaron y se les cuantificó proteína por el método de Bradford usando el microensayo de BioRad Protein Assay®. Se analizaron 40 μg de proteína por SDS-PAGE al 12% a 40 mA durante 75 minutos, posteriormente se hizo la transferencia a una membrana de nitrocelulosa de 0.22 μm (humedecida en buffer de transferencia: Tris 25 mM, glicina 200 mM, 20% metanol) durante 90 minutos a 100 volts. Se realizó el bloqueo en la membrana con leche al 5% en TBST (Tris HCl 20 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, 0.1% Tween 20) durante 2 horas a temperatura ambiente.

Se lavó la membrana con TBST y se incubó toda la noche en agitación suave a 4°C con el anticuerpo primario (anti fosfo p-38 Mouse Ab # 9216S de Cell signaling) en dilución 1:500 en TBST con 5% BSA. Se lavó la membrana 3 veces con TBST durante 5 minutos y se incubó con el anticuerpo secundario (cabra anti IgG ratón-HRP) en dilución 1:2000 en TBST con 5% de leche durante 1 hora y con agitación suave a temperatura ambiente. Posteriormente, la membrana se lavó con TBST 3 veces durante 5 minutos y se reveló por quimioluminiscencia (ECL, Amersham).

Como control, se detectaron los niveles totales de la MAPK p38 usando un anticuerpo anti p-38 (Santa Cruz Biotechnology, INC).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Este capítulo está organizado en 4 secciones principales. Las secciones 7.1. y 7.2. presentan los resultados de los efectos locales en conejos y efectos sistémicos en ratones producidos por los productos fosfoceramida (C1P) y lisofosfatidato (LPA). En la sección 7.3. se muestran los resultados de la actividad enzimática de la SMD de *Loxosceles* sobre eritrocitos y en la sección 7.4. se presentan los resultados de activación de la MAPK p38 en macrófagos murinos peritoneales estimulados con la SMD de *Loxosceles*.

7.1. Efectos locales

7.1.1. Efectos locales provocados por LPA

Inoculación por separado, de diferentes especies moleculares de LPA

Como se mencionó en los antecedentes, se ha reportado que la SMD de *Loxosceles* posee actividad enzimática sobre lisofosfatidilcolina y otros lípidos generando ácido lisofosfatídico o lisofosfatidato (LPA) (Van Meeteren *et al.*, 2004; Olguín, 2006; Lee y Linch, 2005) y dado que la SMD por sí sola es capaz de ocasionar la fisiopatología del loxoscelismo, en este trabajo se analizó la capacidad de LPA para generar la dermonecrosis que se presenta en el loxoscelismo local.

El LPA es una molécula cuyo grupo acilo sustituyente puede variar en cuanto a la longitud de la cadena y saturación de la misma dando lugar a diferentes especies moleculares que se relacionan con diferentes actividades biológicas, esto es posiblemente por una activación diferencial sobre los distintos receptores para LPA (Aoki, 2004). Tomando en cuenta lo anterior, en este trabajo se analizaron los efectos de diferentes especies moleculares de LPAs con longitud de cadena de ácido graso de 6:0 C, 14:0 C, 18:0 C, 18:1 C y 20:4 C disponibles comercialmente (Avanti Polar Lipids®).

Los LPA se inyectaron vía intradérmica en conejos hembras de 2 a 3 Kg, raza Nueva Zelanda, en cantidades de 500 µg. El mayor efecto inflamatorio causado por el

LPA se observó 15 horas después de la inyección (excepto para LPA 6:0 C), la intensidad del efecto inflamatorio varió dependiendo de la especie molecular.

El LPA 6:0 C causó eritema alrededor del sitio de inyección, este efecto desapareció 12 horas después de su inyección; el resto de las especies moleculares con la cadena de ácido graso de mayor longitud 14:0 C, 18:0 C, 18:1 C causaron una ligera inflamación caracterizada por eritema (coloración roja, por exceso de riego sanguíneo mediante vasodilatación), edema (acumulación de líquido en el espacio intercelular por aumento de la permeabilidad capilar), calor, y endurecimiento alrededor del sitio de inyección, con un diámetro de aproximadamente 1.5 cm que desapareció en un máximo de 72 horas, el mayor efecto inflamatorio se observó en el sitio inyectado con el LPA 20:4 C, en este último, el área inflamada fue de aproximadamente 3 cm de diámetro (Figura 10).

En el mismo lapso de tiempo (15 horas) el efecto inflamatorio causado por el LPA 20:4 C fue menor comparado con el que causa 1 μ g de SMD de *Loxosceles* (Figura 11), ya que en este último caso se observó un área mayor de inflamación y equimosis (coloración morada causada por sangrado superficial dentro de la piel debido a la ruptura de vasos sanguíneos) que evolucionó en dermonecrosis (muerte de tejido) y continuó en aumento hasta 24 horas después de la inyección con la SMD.

Las diferencias en la magnitud del efecto inflamatorio generado por las diferentes especies moleculares de LPA en conejo, en particular cuando se comparan los de cadena más larga como LPA 20:4 C con respecto a los de cadena más corta como LPA 6:0 C, coinciden con reportes previos en los cuales los LPAs de cadena más larga son los que mayor efecto o actividad biológica han presentado. Así mismo, una menor longitud en la cadena de ácido graso generalmente correlaciona con una disminución en su actividad biológica, por ello se ha propuesto que una cadena de ácido graso larga en la molécula de LPA es pre-requisito para su actividad biológica (Van Corven *et al.*, 1992; Jalink *et al.*, 1995).

Se sabe que las diferentes especies moleculares de LPA activan distintos receptores acoplados a proteínas G y que la respuesta a tal activación depende del tipo celular. Además, estos receptores se expresan en distinta proporción dependiendo del tipo de tejido (Anliker B. and J. Chun, 2004) por lo que esto puede explicar las diferencias en magnitud o tipo de efecto que generan.

Acorde con lo observado respecto a que el LPA 20:4 C produjo una mayor inflamación en el conejo comparado con otras especie moleculares, en el 2009 Tokumura *et al* reportaron que el incremento de esta especie molecular en suero de pacientes con esclerosis sistémica juega un papel importante en la patofisiología de esta enfermedad que se caracteriza por autoinmunidad e inflamación.

En relación a lo anterior, se ha reportado que la especie molecular de LPA 24:0 C es una potente activadora de plaquetas (Tokumura A., Sinomiya J., *et al.*, 2002), por lo que la inflamación provocada por dicha especie molecular inoculada en el conejo podría deberse a la consecuente activación de plaquetas favoreciendo la agregación plaquetaria y reclutamiento de leucocitos al sitio de inoculación.

Por otro lado, en experimentos *in vitro* se ha observado que los LPA con una cadena de ácido graso insaturado son más potentes que los de cadena saturada (Jalink *et al.*, 1995). Sin embargo, en el presente proyecto, no se observaron diferencias macroscópicas claras entre el efecto inflamatorio provocado por el LPA 18:1 C y el provocado por el LPA 18:0 C, inyectados vía intradérmica en conejo.

Inoculación de una mezcla de diferentes especies moleculares de LPA

Tomando en consideración que en el plasma, sangre y otros fluidos corporales están presentes diferentes especies moleculares de lisofosfatidilcolina (LPC) (Ojala *et al.*, 2007) es probable que la SMD del veneno de *Loxosceles* a través de la hidrólisis de LPC y otros lisolípidos genere a la vez varias especies moleculares de LPA. Por ello, se preparó una mezcla de LPAs (20:4 C, 18:0 C, 16:0 C, y 14:0 C ,100 µg de cada una) y se inyectó vía intradérmica en conejo. Dicha mezcla de LPAs provocó una ligera inflamación menor a 2 cm de diámetro que desapareció por completo en menos de 48 horas. Tal efecto fue menor comparado con la inflamación que produce el LPA 24:0 C inyectado por separado.

En el laboratorio del Dr. Alagón en el IBt-UNAM, estudios preliminares mostraron que un porcentaje del total de SMD se mantiene en piel días después de haber sido inyectada vía intradérmica en conejo y también se observó que la inflamación en la piel continúa evolucionando en dermonecrosis; por lo que *in vivo* cabe la posibilidad de que la SMD de *Loxosceles* continúe enzimáticamente activa en el organismo tiempo después de la mordedura de araña y que por lo tanto siga generando productos (C1P

o LPA) de manera sostenida. Con base en esto, se inyectó una mezcla de LPAs (20:4 C, 18:0 C, 16:0 C, y 14:0 C ,100 μg de cada una) de manera repetida 24 y 48 horas después de la primera inoculación. Dando como resultado una ligera inflamación de aproximadamente 2 cm de diámetro que no aumenta ni evoluciona en dermonecrosis.

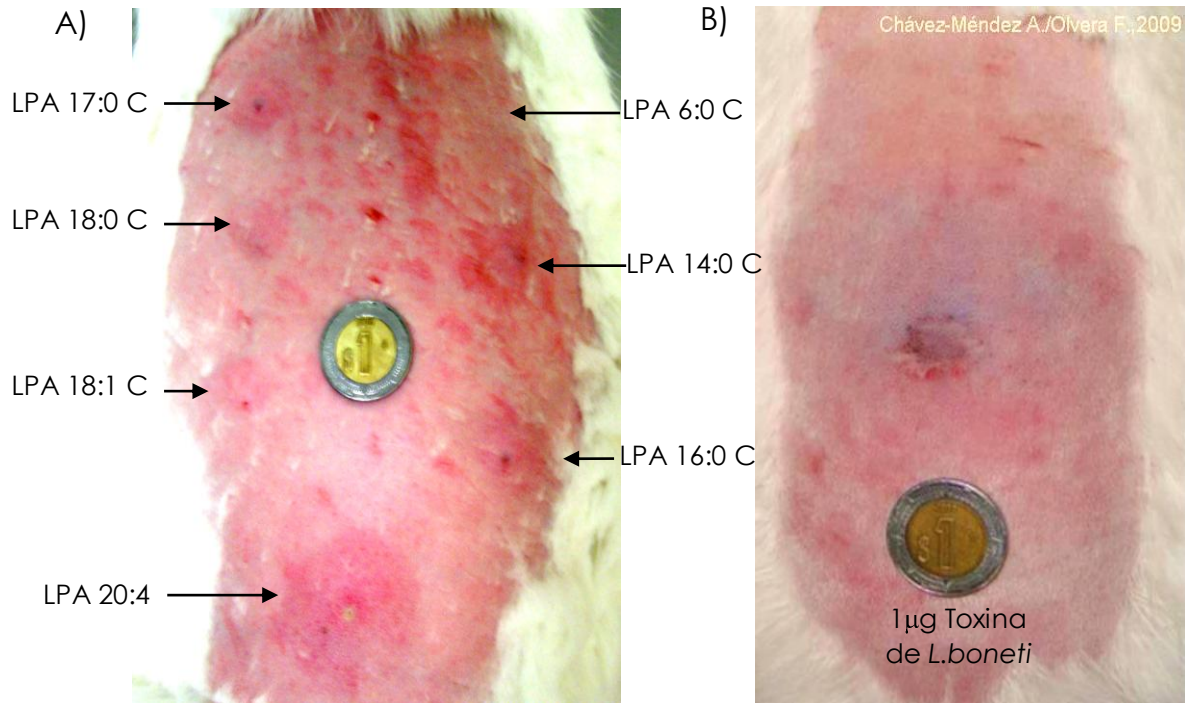


Figura 10. Efecto inflamatorio de LPA y SMD recombinante de *Loxosceles* en piel de conejo. Los conejos raza Nueva Zelanda, hembras, de 2 a 3 kg fueron rasurados del dorso e inyectados vía intradérmica con: A) 500 μg de diferentes especies moleculares de LPA y B) 1 μg de SMD recombinante de *Loxosceles*. En ambos casos se muestran fotografías tomadas 15 horas post-inoculación. En la figura A se observa que el LPA 24:0 C produjo un área inflamada mayor que con el resto de los LPAs. En la figura B se observa la equimosis causada por la SMD de *Loxosceles*.

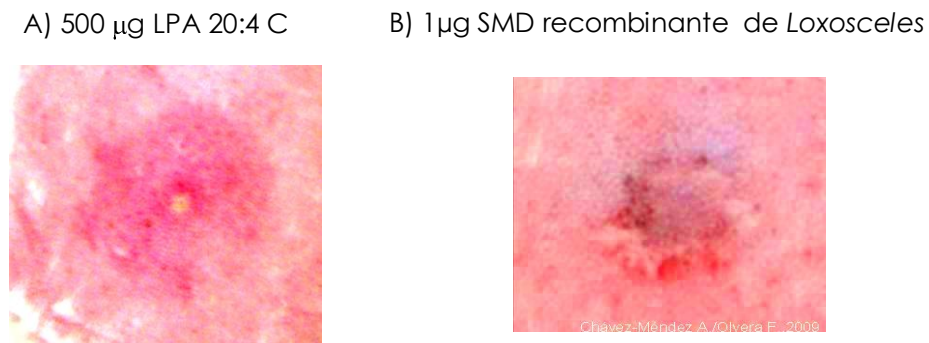


Figura 11. Efecto inflamatorio de LPA y SMD recombinante de *Loxosceles* en piel de conejo. Los conejos raza Nueva Zelanda, hembras, de 2 a 3 kg fueron rasurados del dorso e inyectados vía intradérmica con: A) 500 μg de LPA 20:4 C y B) 1 μg de SMD recombinante de *Loxosceles*. En ambos casos se muestran fotografías tomadas 15 horas post-inoculación. Con el LPA se observa eritema alrededor del sitio de inoculación mientras que con la SMD se observa equimosis (coloración morada).

Si bien se han reportado varios efectos del LPA *in vitro*, tales como agregación plaquetaria, reclutamiento de monocitos, reclutamiento de neutrófilos e inducción de citocinas y quimiocinas proinflamatorias (Jalink *et al.*, 1995; Tokumura, 2002; Lin *et al.*, 2008; Fueller *et al.*, 2003; Saatian *et al.*, 2006) que pudieran relacionarse con los mecanismos que causan la fisiopatología del loxoscelismo, los resultados generados en este proyecto, durante la evaluación de los efectos locales de LPA en conejos, indican que el LPA por sí solo no es responsable de la fisiopatología del loxoscelismo local cuya manifestación principal es dermonecrosis.

Por otra parte, se generó evidencia mediante ensayos *in vivo*, de que existen diferencias en la magnitud del efecto inflamatorio provocado por el LPA, que depende de la longitud de la cadena del ácido graso sustituyente.

7.1.2. Efectos locales provocados por C1P

La actividad enzimática de la SMD de *Loxosceles* se ha caracterizado *in vitro* sugiriendo que su principal sustrato es la esfingomielina cuya hidrólisis genera fosfoceramida (C1P) y colina (Olguín, 2006).

De forma similar a lo que ocurre con la LPC, la esfingomielina también puede variar en su longitud y saturación del ácido graso sustituyente. En la membrana celular se pueden encontrar diferentes especies moleculares de esfingomielina que varían de acuerdo al tipo celular y también se distribuyen de manera diferencial en las dos monocapas de la membrana (Boegheim *et al.*, 1983; Futerman and Hannun, 2004).

En este proyecto, se analizó el efecto local provocado por diferentes especies moleculares de C1P disponibles comercialmente (Avanti Polar Lipids®) con longitud de cadena de ácido graso sustituyente de 2:0 C, 8:0 C y 14:0 C, inyectadas por separado (0.5 μ moles de cada una) vía intradérmica en conejo raza Nueva Zelanda, hembra, de 2 a 3 Kg.

Los resultados mostraron que las C1P 2:0 C, 8:0 C y 14: 0 C provocaron solo una ligera inflamación, menor a 1cm de diámetro, que desaparece en un máximo de 24 horas. Dicha inflamación fue similar con las tres especies moleculares. Si bien es cierto

que en este caso las C1P parecen no estar involucradas de manera importante en la inflamación y dermonecrosis causadas por la SMD, cabe señalar que sería importante evaluar otras especies moleculares con una longitud mayor en la cadena de ácido graso sustituyente, ya que en diversos reportes se han encontrado múltiples efectos biológicos atribuidos a C1P 16:0 C y 18:0 C (Pettus *et al.*, 2004; Nakamura *et al.*, 2006)

7.1.3. Efectos locales provocados por LPA+C1P

Suponiendo que la SMD *in vivo* hidroliza SM y LPC tal como ocurre en ensayos *in vitro* (Van Meeteren *et al.*, 2004; Olgún, 2006; Lee y Linch, 2005), sería probable que generara simultáneamente C1P y LPA.

Al respecto, se analizó el efecto de una mezcla de LPAs y C1P sobre la piel de conejo. Se preparó una mezcla de LPA 20:4 C, 18:0 C 16:0 C 14:0 C y C1P 8:0 C (100 µg de cada especie molecular, equivalente a aproximadamente 1 µmol en total) y se inyectó vía intradérmica en conejo. El efecto observado fue una ligera inflamación que desapareció en menos de 48 horas, muy similar a la provocada solo con la mezcla de LPAs (sección 7.1.1.).

Considerando la probabilidad de que la dermonecrosis causada por la SMD de *Loxosceles* sea debido a que dicha toxina genera continuamente C1P y LPA, como producto de la hidrólisis de SM y lípidos, respectivamente; se inoculó, la mezcla de LPAs + C1P, de manera repetida en el mismo sitio 48 y 72 horas después de la primera inoculación. El efecto generado fue una ligera inflamación menor a 2 cm de diámetro, que se mantuvo sin aumentar durante las siguientes inoculaciones y desapareció por completo 48 horas después de la última inoculación.

7.1.4. Efectos locales provocados por C1P obtenidas a partir de SM

Debido a la escasa variedad de especies moleculares de C1P disponibles comercialmente y a la probabilidad de que existan otras especies de C1P que estén involucradas en algunos mecanismos de la fisiopatología del loxoscelismo, en este proyecto se generaron otras C1P a partir de diferentes especies moleculares de SM comerciales (Avanti Polar Lipids®) 12:0 C, 18:0 C, 18:1 C, 23:0 C, otra proveniente de

cerebro de bovino cuya especie mayoritaria es 18:0 C y de eritrocitos cuya especie mayoritaria es de 20:0 C (sección 6.3. de la metodología).

Las C1P obtenidas, se inyectaron por separado, vía intradérmica en conejo, administrando 0.5 μ moles de cada especie molecular. En general, se observó un efecto inflamatorio caracterizado por edema, eritema y calor en el sitio de inyección. El tamaño del área inflamada varió dependiendo de la especie de C1P, aunque en todos los casos dicha área tuvo un diámetro menor a 2.5 cm y desapareció por completo 60 horas después de la inoculación.

El efecto inflamatorio provocado por las diferentes especies moleculares de C1P fue mayor con C1P de eritrocitos (especie mayoritaria 24:0 C) que con C1P 12:0 C, y el de esta última fue mayor que con C1P de cerebro de bovino (especie mayoritaria 18:0 C); las C1P 18:1 C, C1P de leche (especie mayoritaria 23:0 C) y C1P 18:0 C fueron las que produjeron una menor inflamación (Figuras 12, 13 y 14).

Tomando en cuenta que en estos últimos ensayos se inyecta al conejo la mezcla total de reacción enzimática con la que se obtiene la C1P incluyendo a la SMD que al final del proceso se hierve (ver sección 6.3 de la metodología), fue necesario verificar que la SMD se inactiva por ebullición y que una vez hervida no genera algún efecto en la piel del conejo. Para ello, se inyectaron vía intradérmica 10 μ g de SMD inactivada por ebullición; el resultado indicó que la SMD hervida no causa algún efecto en el conejo (Figura 12). Este ensayo junto con el control negativo demostró que la inflamación observada, con las preparaciones de C1P realizadas a partir de SM, es atribuible solo a la C1P.

Como control negativo, se inyectaron 150 μ L del buffer de reacción enzimática (0.1M Tris HCl pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 4mg/mL de BSA); el buffer no generó efecto alguno en la piel del conejo (Figuras 12, 13 y 14).

Si bien las condiciones para obtener C1P se establecieron de tal manera que toda la SM presente fuera hidrolizada a C1P por acción de la SMD de *Loxosceles*, se inyectaron vía intradérmica como control 0.5 μ moles de SM sola y con SMD hervida; por

un lado, para saber que efecto podría causar en caso de que quedara algún remanente en la preparación de C1P inoculada en los conejos y por otro lado, para verificar si la inflamación causada por la C1P tiene alguna particularidad respecto al efecto de otros lípidos tales como la SM.

Los resultados mostraron que la SM sola en el buffer de reacción así como la SM adicionada de SMD hervida, provocan inflamación en un área con diámetro de aproximadamente 2 cm, dicha inflamación desapareció 60 horas después de la inoculación (Figura 14). En conclusión, la C1P causa una inflamación que macroscópicamente no presenta alguna particularidad comparado con otro fosfolípido como la SM.

Como control positivo se inyectaron por vía intradérmica 0.5, 1 y 2 μg de SMD de *Loxosceles*. En todos los casos se produjo inflamación caracterizada por edema, eritema y calor, posteriormente se observó equimosis e inicio de dermonecrosis cuya magnitud varió de menor a mayor conforme aumentó la cantidad de SMD inoculada (Figuras 12, 13 y 14).

Durante la evaluación del efecto inflamatorio producido por las diferentes especies moleculares de C1P, se observó que la inflamación varía en magnitud dependiendo de la cadena del ácido graso sustituyente. En conclusión, las especies de cadena corta como C1P 2:0 C y C1P 8:0 C producen una inflamación de menor magnitud que las de cadena más larga, sin embargo, en cuanto a las especies de longitud intermedia y larga (C1P 12:0 C, 14:0 C, 18:0 C, 18:1 C; de leche (23:0 C) y de eritrocitos (24:0 C) no existe una relación directamente proporcional entre la longitud de la cadena y la magnitud del efecto inflamatorio, ya que se pudo observar que la C1P de eritrocitos (24:0 C) y C1P 12:0 causaron un mayor efecto inflamatorio que las C1P de leche (23:0) y C1P 18:0C.

Existen varios reportes en la literatura que indican que la C1P es un esfingolípido que está implicado en varias respuestas celulares que se relacionan con el proceso inflamatorio, ya que entre otras funciones, se ha reportado que promueve la liberación de ácido araquidónico y en consecuencia la síntesis de eicosanoides (Pettus *et al.*,

2004; Gómez, 2004), con base en esto, se ha propuesto que la C1P puede tener un papel importante en la fisiopatología del loxoscelismo.

Al respecto, en el presente proyecto, se demostró que la C1P produce un efecto inflamatorio de magnitud menor que el que se produce con la SMD de *Loxosceles* y por lo tanto esto sugiere que la C1P puede contribuir al proceso inflamatorio aunque por sí sola no es la responsable de ocasionar la fisiopatología del loxoscelismo local.

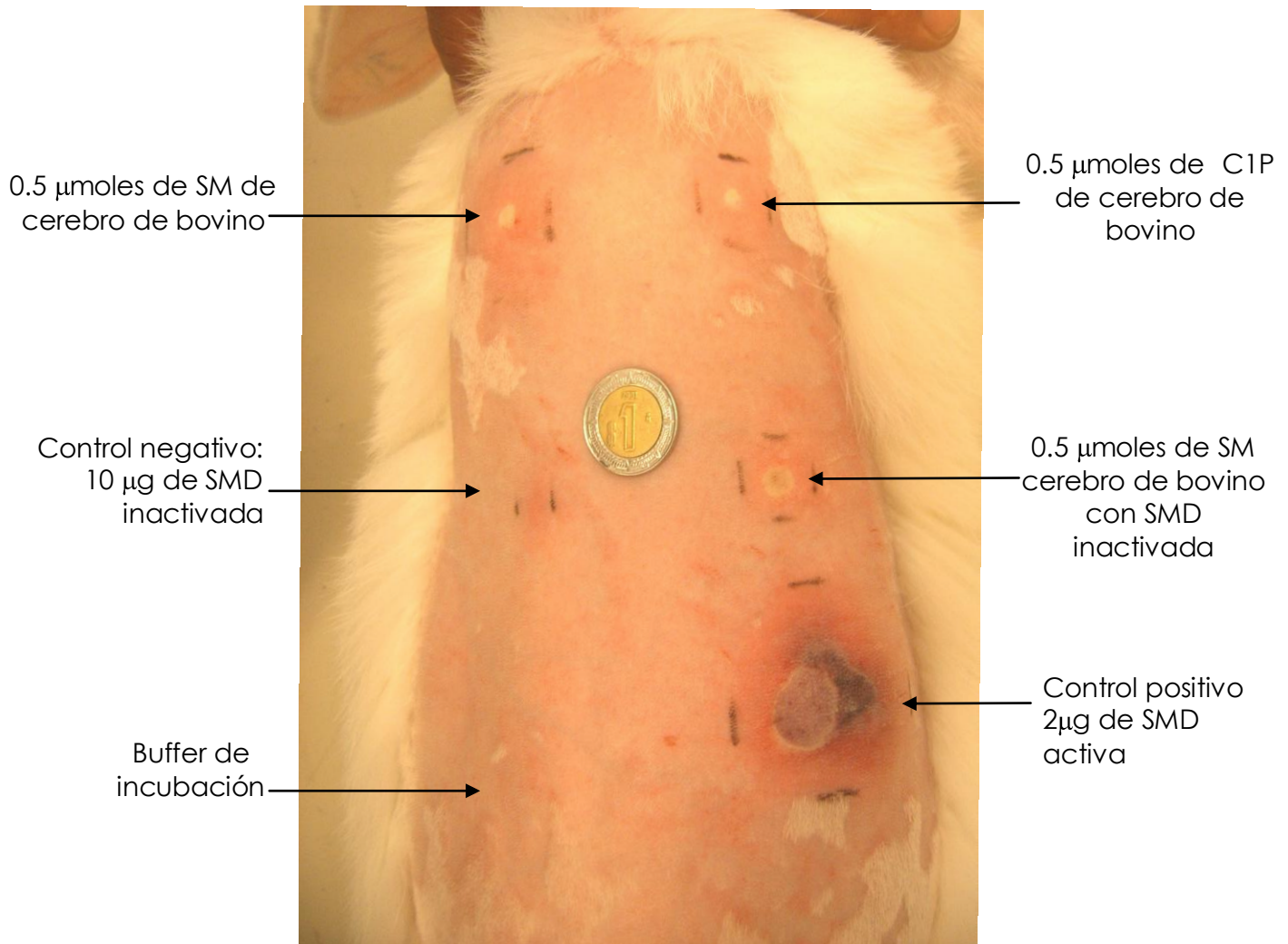


Figura 12. Fotografía del dorso de un conejo raza nueva Zelanda, hembra de 2 a 3 Kg, 48 horas post-inyección por vía intradérmica de diferentes especies moleculares de fosfoceramidas (C1P) obtenidas a partir de SM por acción de la SMD de *Loxosceles*. Como control negativo, se inocularon SMD inactivada por ebullición y buffer de actividad enzimática. Como control positivo, se inocularon 2 μ g de SMD de *Loxosceles* activa enzimáticamente; en este último se observa un claro inicio de dermonecrosis característica del loxoscelismo local.

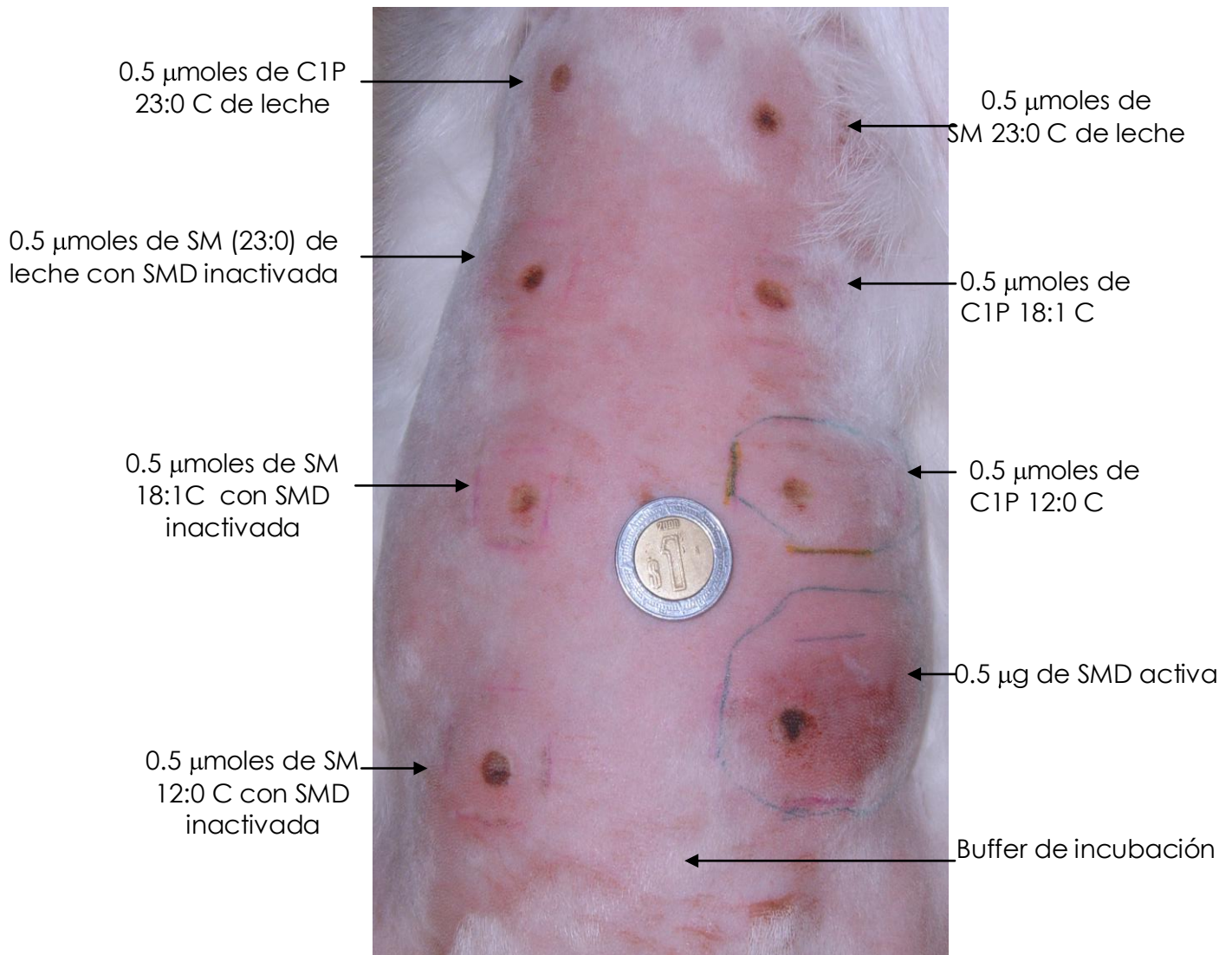


Figura 13. Fotografía del dorso de un conejo raza nueva Zelanda, hembra de 2 a 3 Kg, 48 horas post-inyección por vía intradérmica de diferentes especies moleculares de fosfoceramidas (C1P) obtenidas a partir de SM por acción de la SMD de *Loxosceles*. Como control negativo, se inocularon 100 μ L de buffer de reacción enzimática. Como control positivo, se inocularon 0.5 μ g de SMD de *Loxosceles* activa enzimáticamente; en este último se observa un claro inicio de dermonecrosis característica del loxoscelismo local.

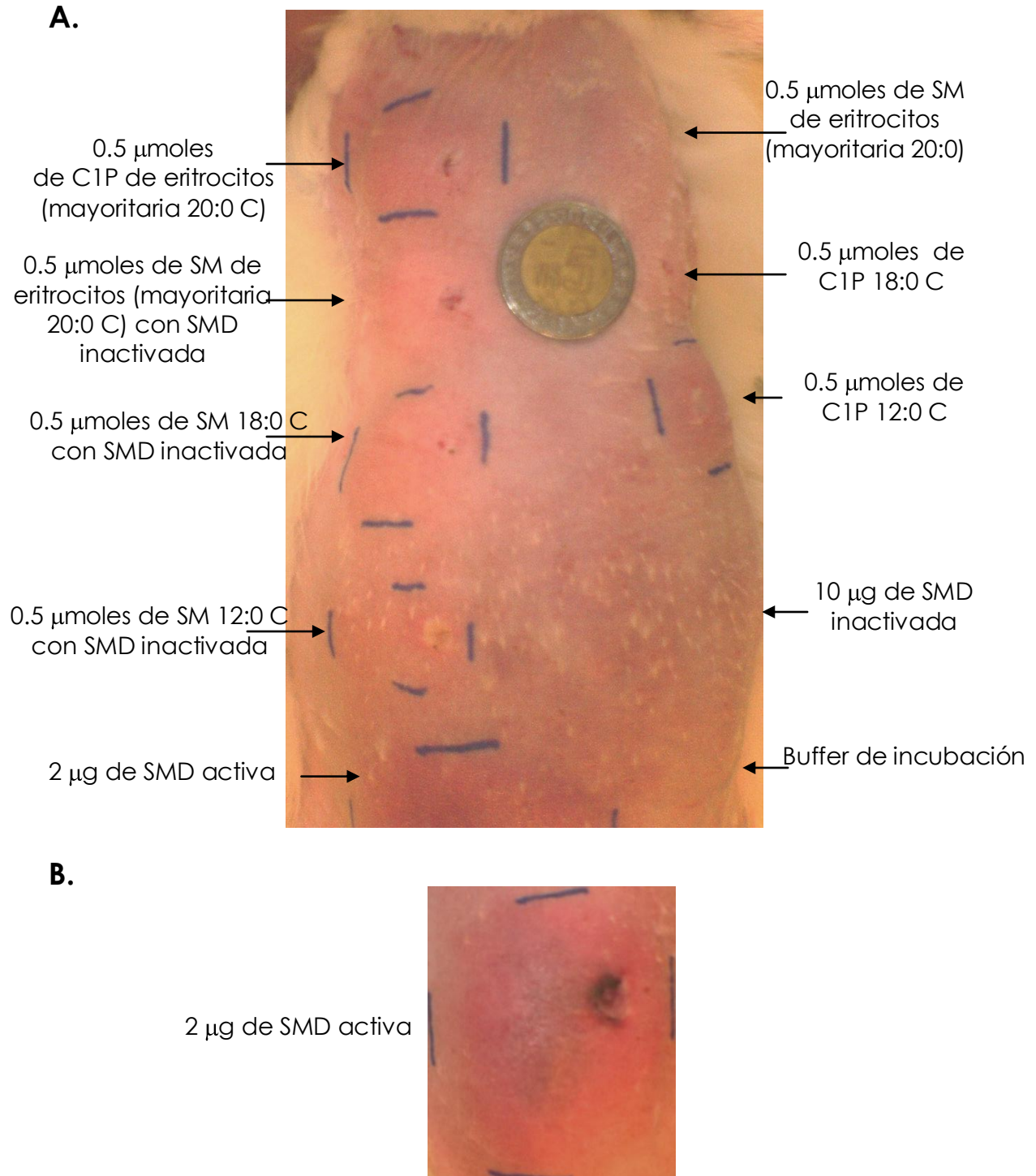


Figura 14. A. Fotografía del dorso de un conejo raza nueva Zelanda, hembra de 3 Kg, 48 horas post-inyección por vía intradérmica de diferentes especies moleculares de fosfoceramida (C1P) obtenida a partir de SM por acción de la SMD de *Loxosceles* (TxrLbCOOH). Como control negativo, se inocularon SMD inactivada por ebullición y buffer de actividad enzimática. Como control positivo, se inocularon 2 μ g de SMD de *Loxosceles* activa enzimáticamente; en este último se observa un claro inicio de dermonecrosis característica del loxoscelismo local. B. Fotografía 48 horas post-inyección de la SMD de *Loxosceles*, como control positivo.

7.1.5. Efectos locales provocados por detergentes

Considerando que la estructura molecular del LPA es parecida a la de algunos detergentes, se planteó evaluar el efecto provocado por tres diferentes detergentes y compararlo con lo observado con los LPAs. Para ello, se inocularon vía intradérmica 0.5 μ moles de Tween 20, SDS y Tritón X-100. El ensayo se hizo por duplicado, utilizando 2 conejos raza Nueva Zelanda, hembras, de 2 a 3 Kg. Los resultados mostraron una ligera irritación que desapareció en menos de 12 horas, tal efecto fue mucho menor que la inflamación generada por los LPAs.

7.2. Efectos sistémicos

7.2.1. Efectos sistémicos provocados por LPA

Efecto individual de diferentes especies moleculares de LPA

Utilizando ratones de la cepa BALB/c como modelo experimental, se analizaron los efectos de diferentes especies moleculares de LPA. Para ello, se inyectaron vía intravenosa 500 µg que en promedio equivalen a 1 µmol de cada especie molecular (Tabla 1, secciones 6.2.1 y 6.4 de la metodología).

Como control negativo, se inyectaron ratones con 100 µL de agua vía intravenosa y no se observó efecto alguno. Como control positivo se inyectaron 10 µg de la SMD vía intravenosa en ratones, durante todo el tiempo en observación (los primeros 30 minutos y monitoreos cada hora durante 12 horas) se observaron solo ligeros cambios en la frecuencia respiratoria, y solo 5 minutos antes de la muerte se observó aumento en la frecuencia respiratoria, desequilibrio, parálisis en la cola y espasmos en las cuatro patas y en la región abdominal, posteriormente el cuerpo dio giros laterales y se registró muerte a las 12 horas después de la inoculación de la SMD (Tabla 3).

El LPA 6:0 C no causó algún efecto evidente en los ratones mientras que el resto de los LPAs (14:0 C, 16:0 C, 17:0 C, 18:0 C, 18:1 C y 24:1 C) causaron principalmente cambios en el ritmo respiratorio, desequilibrio y desorientación, tales efectos tuvieron una duración máxima de 13 minutos dependiendo de la especie molecular. Adicionalmente a estos efectos, el LPA 18:1 C provocó parálisis de la cola y continuos espasmos en las cuatro patas de los ratones. Así mismo, se observó que los efectos causados por el LPA 20:4 C tuvieron una duración mayor que las especies moleculares de cadena más corta (Tabla 3).

Cabe mencionar que existen al menos 4 receptores para LPA que se expresan en la mayoría de órganos y tejidos en mamíferos y que su activación varía dependiendo la especie molecular de LPA, esto podría explicar las diferencias de los efectos observados en ratones. Adicionalmente, los resultados concuerdan con reportes previos de experimentos *in vitro* (Aoki, 2004) donde las especies con mayor efecto biológico son las de cadena acilo más larga y con ácidos grasos insaturados.

Por otro lado, el LPA 20:4 C se ha implicado en vasculopatías a través de su función como un factor de agregación de plaquetas y acción vasopresora (Tokumura *et al.*, 1978; Tokumura *et al.*, 2009; Bettger *et al.*, 1998; Balazs *et al.*, 2001) con base en esto, los efectos observados en los ratones podrían deberse a un aumento en la presión arterial.

Los efectos observados en los ratones inoculados con SMD, tales como cambios en la frecuencia respiratoria, desequilibrio y espasmos en el abdomen y patas podrían ser atribuidos en cierta medida algunas especies moleculares de LPA que se libera a partir de lisolípidos por acción de la SMD. Sin embargo, de acuerdo a los resultados de este trabajo, el LPA parece no ser el único responsable ya que en ratones inoculados solo con LPA se observaron cambios en la frecuencia respiratoria y espasmos pero no se registró muerte con ninguna de las especies moleculares.

Tabla 3. Efectos de LPA disponibles comercialmente, en ratones BALB/c de 18 a 20 g (n=3). En la parte superior se indica la especie molecular de LPA inoculado vía intravenosa en ratones, se inocularon 500 µg de cada producto que equivalen a aproximadamente 1 µmol, (*) indica que durante la preparación del inóculo se obtuvo una suspensión homogénea no traslúcida. En la columna izquierda se enlistan los principales efectos observados, (+) indica que se presentó el efecto, (-) indica ausencia de efecto.

Especie molecular de LPA	6:0 C	14:0 C	16:0 C	17:0 C	*18:0 C	18:1 C	*20:4 C	SMD activa
Cantidad aprox. (µmol)	1	1	1	1	1	1	1	1.6 X 10 ⁻⁵
Desmayo	-	-	-	-	-	-	-	-
Respiración agitada	-	+	+	+	+	+	+	+
Respiración lenta	-	+	-	-	+	+	-	+
Contracciones (espasmos) en patas y abdomen	-	-	-	-	-	+	-	+
Desequilibrio y desorientación	-	-	+	+	+	+	+	+
Tiempo de recuperación (min)	Sin efecto	4	4	13	4	8	10	Muerte ≈ 12 h

Inoculación de una mezcla de diferentes especies moleculares de LPA

Tal como se explicó en la sección 7.1.1., partiendo de que existen diferentes especies moleculares de LPC y otros lisolípidos distribuidos en sangre y plasma es probable que a su vez, la SMD de *Loxosceles*, genere diferentes especies moleculares de LPA mediante la hidrólisis de LPC y otros lisolípidos tales como lisofosfatidilinositol, lisofosfatidilserina y lisofosfatidilglicerol (Lee and Lynch, 2005).

Considerando lo anterior, se preparó una mezcla de diferentes especies moleculares de LPA (20:4 C, 18:0 C, 16:0 C, y 14:0 C, 100 µg de cada una) y se inyectó vía intravenosa en ratones. Se observó postración en el primer minuto posterior a la inoculación, después se observó un aumento seguido de disminución de la frecuencia respiratoria, posteriormente reincorporación del animal en sus cuatro patas con ligero desequilibrio y desorientación y finalmente recuperación a los 5 minutos posteriores a la inoculación de la mezcla de LPA (Tabla 4). En conclusión se observó que la mezcla de diferentes especies moleculares de LPA no provoca un efecto mayor o sinérgico con respecto a lo observado con los LPA inoculados individualmente.

7.2.2. Efectos sistémicos provocados por C1P

Con base en lo discutido en la sección 7.1.2., y similar a lo que ocurre con LPA, es probable que la SMD de *Loxosceles* genere diferentes especies moleculares de C1P a partir de SM. Por ello, se prepararon suspensiones de cada una de las diferentes especies moleculares de C1P disponibles comercialmente (sección 6.2.2.).

En los ratones inoculados vía intravenosa con 0.5 µmoles (aprox. 250 µg) de C1P 2:0 C y C1P 14:0 C por separado, se observó solo un aumento en la frecuencia respiratoria que duró 5 minutos máximo, mientras que en los ratones inoculados con 0.5 µmoles de C1P 8:0 C se observó aumento en la frecuencia respiratoria, espasmos en las cuatro patas y en la región abdominal, desequilibrio y desorientación, posteriormente se recuperaron (en un tiempo máximo de 6 minutos después de la inoculación) (Tabla 4).

La C1P 2:0 C fue la que provocó el menor efecto, esto concuerda con experimentos *in vitro* que muestran que las C1P de cadena acilo corta tienen poca actividad biológica y en algunos casos es nula (Pettus *et al.*, 2005).

En conclusión las C1P 2:0 C, 8:0 C y 14:0 C provocaron efectos muy menores en la frecuencia respiratoria y con un tiempo de duración corto comparado con lo que provoca la SMD de *Loxosceles*, esto sugiere que estas especies moleculares no tienen un papel relevante en la fisiopatología del loxoscelismo sistémico.

Por otro lado, es posible que *in vivo* la SMD de *Loxosceles* genere otras especies moleculares de C1P de cadena acilo más larga ya que se ha reportado que las SM más abundantes en suero de ratón, conejo y humanos son de cadenas hidrocarbonadas largas (16:0 C, 22:0 C y 24:1C) (Bettger *et al.*, 1998). En este sentido, resulta interesante evaluar el efecto de C1P con cadena acilo de mayor longitud que las evaluadas anteriormente.

7.2.3. Efectos sistémicos provocados por LPA+C1P

Retomando la suposición descrita en la sección 7.1.3., se analizó el efecto en ratones inoculados con una mezcla de LPA y C1P.

Se preparó una mezcla de LPA 20:4 C, 18:0 C 16:0 C 14:0 C y C1P 8:0 C (100 µg de cada especie molecular, equivalente a aproximadamente 1.1 µmol en total) y se inyectó vía intravenosa en ratones. El efecto observado fue postración (desmayo sin reflejo palpebral), aumento en la frecuencia respiratoria durante 1 minuto, seguido por una disminución de la frecuencia respiratoria durante 3 minutos, reincorporación sobre las cuatro patas, desequilibrio y desorientación; se recuperaron en un tiempo máximo de 7 minutos posteriores a la inoculación (Tabla 4).

En conclusión, los efectos provocados por la mezcla de LPAs + C1P 8:0 C fueron similares a lo observado con la mezcla de LPAs sin C1P y al efecto del LPA 24:0 C. Los cambios en la frecuencia respiratoria, postración, desequilibrio, desorientación y espasmos en la región abdominal y en las patas de los ratones, observados cuando se inoculan LPA y C1P, son similares a lo que ocurre en los ratones inoculados con 10 µg de SMD de *Loxosceles*, aunque en este último caso los efectos no son inmediatos ya que solo se observan minutos antes de la muerte que sucede aproximadamente 24 horas después de la inoculación.

Tabla 4. Efectos de C1P, mezcla de LPA y mezcla de LPA con C1P en ratones BALB/c (n=3). En la parte superior se indica la especie molecular de LPA o C1P inoculada vía intravenosa en ratones, (*) indica que durante la preparación del inóculo se obtuvo una suspensión homogénea no traslúcida. En la columna izquierda se enlistan los principales efectos observados, (+) indica que se presentó el efecto, (-) indica ausencia de efecto.

Especie molecular	C1P 2:0 C	C1P 8:0 C	C1P 14:0 C	*Mezcla de LPA	*Mezcla de LPA
				20:4 C 18:0 C 16:0 C 14:0 C	20:4 C 18:0 C 16:0 C 14:0 C con C1P 8:0 C
Cantidad (µmol)	0.5	0.5	0.5	1	1.1
Desmayo	-	-	-	+	+ Sin reflejo palpebral
Respiración agitada	+	+	+	+	+
Respiración lenta	-	-	-	+	+
Contracciones (espasmos) en patas y abdomen	-	+	-	-	-
Desequilibrio y desorientación	-	+	-	+	+
Tiempo de recuperación (min)	5	6	2	5	7

7.2.4. Efectos sistémicos provocados por C1P obtenidas a partir de esfingomielina

Como se mencionó en la sección 7.1.4, debido a la escasa variedad de especies moleculares de C1P disponibles comercialmente, se generaron otras C1P a partir de diferentes especies moleculares de SM comerciales (Avanti Polar Lipids®) y se inocularon por vía intravenosa en ratones (secciones 6.3 y 6.4 de la metodología).

Considerando que en estos ensayos se inyecta al ratón la mezcla total de reacción enzimática con la que se obtiene la C1P incluyendo a la SMD que al final del proceso se hierve (sección 6.3), fue necesario verificar que la SMD una vez hervida no genera algún efecto en ratones. Para ello, se inyectaron vía intravenosa 10 µg de SMD

hervida, los resultados mostraron que la SMD en estas condiciones no causa efecto alguno en el ratón (Tabla 5).

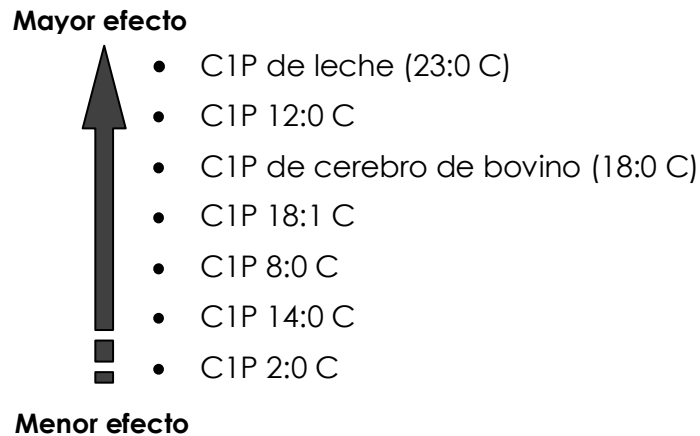
Como control negativo, se inyectaron 150 μL del buffer de reacción enzimática (0.1M Tris HCl pH 7.5, 10 mM MgCl_2 , 4mg/mL de BSA) y no se observó efecto alguno (Tabla 5).

Aún cuando las condiciones experimentales para obtener C1P se establecieron de tal manera que toda la SM presente en la preparación fuera hidrolizada a C1P por acción de la SMD de *Loxosceles*, se estableció como control la inoculación vía intravenosa de 0.5 μmoles de SM sola y de SM con SMD hervida; por un lado, para saber que efecto podría causar la SM en caso de que quedara algún remanente en la mezcla de reacción con la que se obtiene C1P que es inoculada en los ratones y por otro lado, para comparar los efectos causados por la C1P con respecto a la SM. Los resultados mostraron que la SM causa un efecto similar a la C1P derivada de ésta. (Tablas 5 y 6).

Las C1P obtenidas a partir de SM de cerebro de bovino (18:0 C) y de SM 18:1 C, inoculadas por separado en cantidades de 0.5 μmoles , ocasionaron desmayo y cambios en la frecuencia respiratoria, la C1P (18:0 C) provocó además contracciones en las patas y en la región abdominal, desequilibrio y desorientación, en ambos casos los ratones se recuperaron en un tiempo máximo de 50 minutos. En otros ratones, se inocularon 0.25 μmoles de C1P 18:0 C y se observó un aumento en la frecuencia respiratoria, desequilibrio y desorientación, el tiempo de recuperación fue de aproximadamente 2 minutos (Tablas 5 y 7).

La C1P obtenida a partir de SM de leche (23:0 C) y la C1P obtenida a partir de la SM 12:0 C, inoculadas en cantidades de 0.5 μmoles , provocaron muerte en ratones 1 minuto después de su inoculación. Posteriormente en otros ratones, se inocularon estas mismas especies moleculares de C1P en cantidades de 0.25 μmoles y se observaron principalmente cambios en la frecuencia respiratoria, espasmos y muerte aproximadamente 2 horas después de la inoculación (Tablas 6 y 7).

A continuación se ordenan las diferentes especies moleculares de C1P con base en la magnitud y duración de los efectos causados en ratones (cambios en la frecuencia respiratoria, desmayos, espasmos en patas y abdomen, o muerte) la C1P 23:0 fue la que causó el mayor efecto y la C1P 2:0 C fue la que causó el menor efecto.



Una de las funciones principales reportadas de la C1P es la activación de la fosfolipasa A₂ citosólica (cPLA₂) y subsecuente síntesis de eicosanoides, al respecto, en el 2009 Wijesinghe *et al.* mostraron mediante ensayos *in vitro* que la C1P debe tener al menos un ácido graso de 6 carbonos de longitud para poder activar la cPLA₂. Interesantemente, los efectos observados en el presente trabajo, con ratones inoculados con diferentes especies moleculares de C1P son consistentes con esto, ya que la C1P 2:0 C fue la que menos efecto tuvo en los ratones. Acorde a lo anterior, también se ha demostrado que la ceramida cinasa (enzima responsable de generar C1P a partir de ceramida en mamíferos, única vía descrita para la generación de C1P) tiene preferencia por ceramidas con ácido graso de al menos 12 carbonos de longitud (Wijesinghe *et al.*, 2005).

Los efectos generados por la C1P inoculada vía intravenosa, fueron muy menores comparados con lo que causa la SMD de *Loxosceles*, esto podría indicar que la C1P no es suficiente para causar la fisiopatología del loxoscelismo. Sin embargo, resulta importante evaluar otras formas de presentación de la C1P, ya que por un lado, es una molécula relativamente pequeña por lo que podría difundir rápidamente y no concentrarse en un blanco particular como podría estar sucediendo durante el envenenamiento, y por otro lado, si el efecto patológico requiere que la C1P se genere intracelularmente, sería importante evaluar si la C1P se internaliza o se queda en el medio extracelular.

Tabla 5. Efectos de la fosfoceramida (C1P) obtenida a partir de esfingomielina (SM) y esfingomielinasa D (SMD) de *Loxosceles* en ratones BALB/c (n=3). En la parte superior se indican las moléculas inoculadas vía intravenosa: Buffer de reacción, SMD inactivada por ebullición (control negativo), SMD activa (control positivo), esfingomielina (SM) de cerebro de bovino (especie mayoritaria 18:0 C) y C1P obtenida a partir de la SM. (*) Indica que durante la preparación del inóculo se obtuvo una suspensión homogénea no traslúcida. En la columna izquierda se enlistan los principales efectos observados, (+) indica que se presentó el efecto, (-) indica ausencia de efecto.

	Buffer de reacción enzimática	SMD inactivada	SMD activa	SM de cerebro de bovino (18:0 C)	*C1P de cerebro de bovino (18:0 C)
Cantidad	100 μ L	1.6×10^{-5} μ mol	1.6×10^{-5} μ mol	0.5 μ mol	0.5 μ mol
Desmayo	+	-	-	+	+
Respiración agitada	+	+	+	+	+
Respiración lenta	-	-	+	-	-
Contracciones (espasmos) en patas y abdomen	-	-	+	+	+
Desequilibrio y desorientación	-	-	+	+	+
Tiempo de recuperación (min)	1	inmediata	Muerte \approx 12 h	15	50

Tabla 6. Efectos de la fosfoceramida (C1P) obtenida a partir de esfingomielina (SM) y esfingomielinasa D (SMD) de *Loxosceles* en ratones BALB/c (n=3). En la parte superior se indican las moléculas inoculadas vía intravenosa: esfingomielina (SM) 18:1 C, 12:0 C y de leche (23:0 C) todas adicionadas de SMD inactivada por ebullición; y C1P obtenidas a partir de las SM. (*) Indica que durante la preparación del inóculo se obtuvo una suspensión homogénea no traslúcida. En la columna izquierda se enlistan los principales efectos observados, (+) indica que se presentó el efecto, (-) indica ausencia de efecto.

	SM 12:0 C con SMD inactivada	C1P 12:0 C	SM 18:1 C con SMD inactivada	C1P 18:1 C	*SM de leche (23:0 C)	*SM de leche (23:0 C) con SMD inactivada	*C1P de leche (23:0 C)
Cantidad (µmol)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Desmayo	-	+	+	+	+	+	+
				Sin reflejo palpebral		Sin reflejo palpebral	Sin reflejo palpebral
Respiración agitada	-	-	+	-	+	-	+
Respiración lenta	-	-	+	+		-	-
Contracciones (espasmos) en patas y abdomen	+	+	+	-	+	+	-
Desequilibrio y desorientación	-	-	+	-	-	-	-
Tiempo de recuperación (min)	Muerte ≈ 1 min	Muerte ≈ 1 min	> 40	40	Muerte ≈ 1 min	Muerte ≈ 1 min	Muerte ≈ 1 min

Tabla 7. Efectos de de la fosfoceramida (C1P) obtenida a partir de esfingomielina (SM) y esfingomielinasa D (SMD) de *Loxosceles* en ratones BALB/c (n=3). En la parte superior se indican las especies moleculares de C1P inoculadas vía intravenosa. (*) Indica que durante la preparación del inóculo se obtuvo una suspensión homogénea no traslúcida. En la columna izquierda se enlistan los principales efectos observados, (+) indica que se presentó el efecto, (-) indica ausencia de efecto.

Especie molecular de C1P	12:0 C	18:0 C	*De leche (23:0 C)
Cantidad (μmol)	0.25	0.25	0.25
<i>Desmayo</i>	+	-	-
<i>Respiración agitada</i>	+	+	+
<i>Respiración lenta</i>	-	-	-
<i>Contracciones (espasmos) en patas y abdomen</i>	-	-	+
<i>Desequilibrio y desorientación</i>	-	+	+
<i>Tiempo de recuperación (min)</i>	Muerte ≈ 2h	2	Muerte ≈ 2h

7.2.2. Efectos provocados por detergentes

Considerando que la estructura molecular del LPA es parecida a la de algunos detergentes, se planteó evaluar el efecto provocado por tres diferentes detergentes y compararlo con lo observado con el LPA. Para ello, se inocularon vía intravenosa 0.5 μ moles de Tween 20, SDS y Tritón X-100. El ensayo se hizo por cuadruplicado, utilizando ratones BALB/c. Estos detergentes no causaron efecto en los ratones (Tabla 8)

Tabla 8. Efecto de detergentes inyectados por vía intravenosa en ratones de la cepa BALB/c de 18 a 20 g (n = 4).

Detergente	Tween 20	SDS	Tritón X-100
Cantidad (μ mol) en 100 μ L	0.5	0.5	0.5
<i>Desmayo</i>	-	-	-
<i>Respiración agitada</i>	-	-	-
<i>Respiración lenta</i>	-	-	-
<i>Contracciones (espasmos) en patas y abdomen</i>	-	-	-
<i>Desequilibrio y desorientación</i>	-	-	-
<i>Tiempo de recuperación (min)</i>	Sin efecto	Sin efecto	Sin efecto

7.3. ENSAYOS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA SMD DE *Loxosceles* SOBRE ERITROCITOS

Existen diversos reportes que muestran que la SMD de *Loxosceles* tiene actividad enzimática sobre esfingomielina unida a albúmina (Kurpiewski *et al.*, 1981; de Oliveira *et al.*, 2005; Ramos *et al.*, 2004; Olguín, 2006), considerando que la esfingomielina es muy abundante en la membrana plasmática de las células, resulta importante evaluar si la SMD también es capaz de hidrolizar la SM presente en células. Por ello, en este trabajo se utilizaron eritrocitos como modelo para evaluar si la SMD tiene actividad sobre membrana celular.

Tal como se describe en la metodología, en las secciones 6.5.1 y 6.5.2., se incubaron eritrocitos de humano y de conejo con 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.1, 1.56 y 0.78 ng de SMD de *Loxosceles* (toxina recombinante de *L. boneti*), como "blanco de referencia" se incubaron eritrocitos solo con PBS 1X. Después de la incubación se tomaron 100 microlitros de los sobrenadantes de todas las preparaciones y se analizaron por separado mediante el método de Amplex Red®.

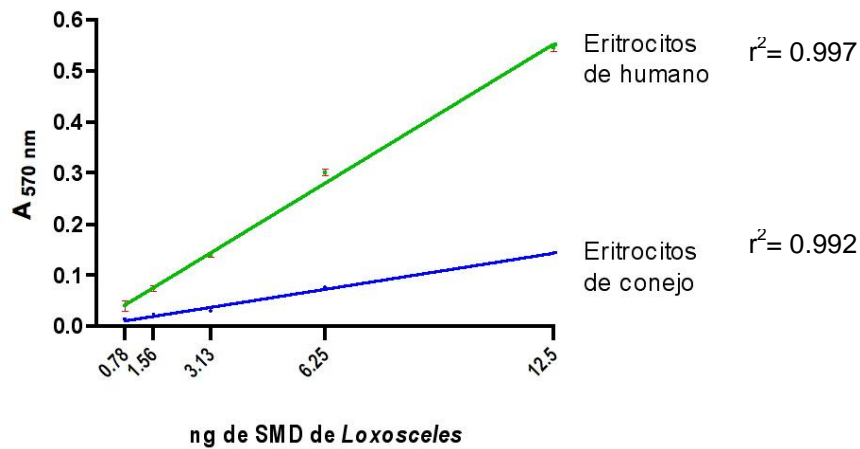
Los resultados de Absorbancia obtenidos, fueron analizados realizando una regresión lineal con el programa Graph Pad PRISM versión 4.0b.

Para ambos casos, eritrocitos de humano y de conejo, se observó una relación lineal desde 0.78 hasta 12.5 ng de SMD (Figura 15). Indicando que, conforme aumenta la cantidad de SMD aumenta el valor de absorbancia, lo cual significa mayor liberación de colina al sobrenadante. Este resultado aporta evidencia de que la SMD de *Loxosceles* tiene actividad directa sobre la esfingomielina de la membrana celular, así mismo esto es complementario a reportes previos que indican que la fracción del veneno de *Loxosceles* correspondiente a la SMD y la SMD recombinante de *L. reclusa* se une a la membrana celular particularmente a la esfingomielina de la monocapa externa (Rees *et al.*, 1984; Chaves *et al.*, 2009). Por otro lado, cabe mencionar que no se observó hemólisis en los eritrocitos.

Comparando los valores de Absorbancia generados por el sobrenadante de los eritrocitos vs. los de conejo, es notorio que hay una mayor liberación de colina, alrededor de 3.5 veces más, en el sobrenadante de eritrocitos de humano expuestos a SMD.

Medición de actividad de la SMD de *Loxosceles* sobre eritrocitos

A) Gráfica de regresión lineal



B) Tabla de datos

ng de SMD	Eritrocitos de humano			Eritrocitos de conejo		
	Y	SD	N	Y	SD	N
12.50	0.547	0.008	2	0.144	0.004	2
6.25	0.302	0.007	2	0.077	0.005	2
3.13	0.140	0.005	2	0.030	0.008	2
1.56	0.074	0.005	2	0.024	0.008	2
0.78	0.040	0.010	2	0.014	0.009	2

Figura 15. Medición de la actividad de diferentes cantidades de SMD de *Loxosceles* (toxina recombinante de *L. boneti*) sobre eritrocitos de humano y conejo, mediante el método de Amplex Red®. Los datos generados en el ensayo, se analizaron con el programa Graph Pad Prism Versión 4.0b. En A) Se muestra la gráfica de regresión lineal, en el eje x: las diferentes cantidades de SMD y en el eje Y: la absorbancia medida en el sobrenadante de los eritrocitos expuestos a la SMD. En B) Se muestra la tabla de resultados, donde Y: Absorbancia a 570 nm, SD: desviación estándar y N: es el número de mediciones (se hizo por duplicado).

Ensayos de actividad de SMD sobre eritrocitos de humano, variando el porcentaje de eritrocitos

Se midió la actividad de toxina recombinante (SMD) de *Loxosceles boneti* (TxrLbCOOH) sobre diferentes porcentajes de eritrocitos humanos.

Para ello, eritrocitos al 2.5, 5, 10, 15 y 20% en buffer 100 mM Tris HCl pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 4 mg/mL BSA, 40 mM NaCl fueron incubados durante 10, 20 y 30 minutos con 7.5 ng de TxrLbCOOH; posteriormente se recuperó el sobrenadante y se realizó el ensayo de actividad mediante el método Amplex red[®]. Se observó una relación lineal hasta 20% de eritrocitos. (Figura 17).

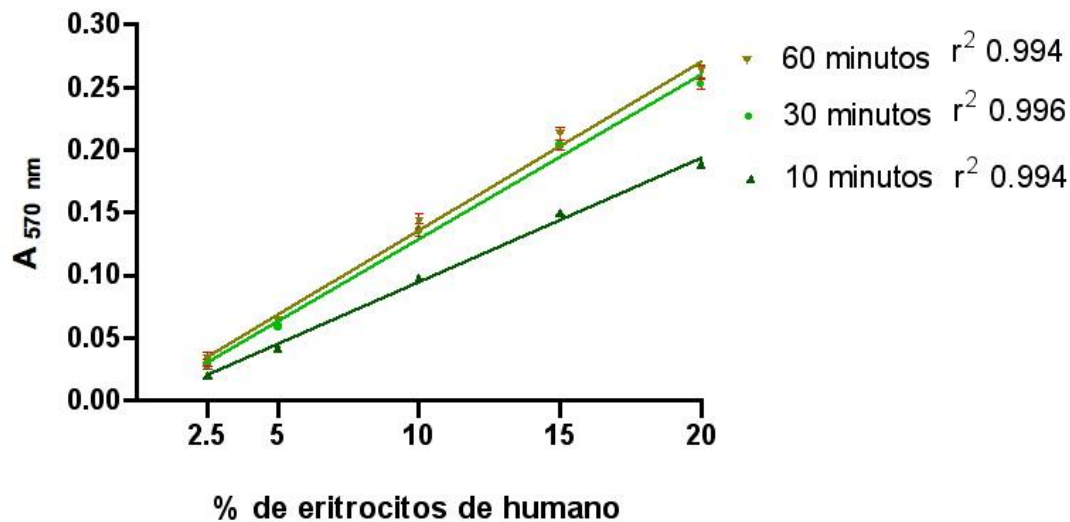
Con todo lo anterior, se generó evidencia de que la SMD de *Loxosceles* es capaz de hidrolizar esfingomielina presente en la membrana celular, sin causar hemólisis. La acción de la SMD sobre la esfingomielina libera colina al medio extracelular, al respecto, sería interesante analizar la localización de la fosfoceramida posterior a la acción de la SMD, ya que dicha información es importante para establecer posibles rutas de señalización celular que pueden conllevar al proceso fisiopatológico del loxoscelismo.

Si bien en este trabajo, no se observó actividad lítica directa de la SMD sobre eritrocitos, es importante señalar que recientemente se reportó que la SMD de *Loxosceles* es capaz de ejercer un efecto hemolítico directo (Chaves *et al.*, 2009) aunque cabe señalar que dicha hemólisis es dependiente de la dosis y el tiempo.

Por otro lado, se observó una mayor liberación de colina en eritrocitos de humano tratados con SMD comparados con los eritrocitos de conejo lo cual puede deberse a diferencias en el contenido de SM entre las diferentes especies de animales y a la especie molecular de SM contenida, ya que la SMD presenta una menor actividad sobre especies de longitud de ácido graso corta.

Medición de actividad de la SMD de *Loxosceles* sobre diferentes porcentajes de eritrocitos de humano

A) Gráfica de regresión lineal



B) Tabla de datos

% eritrocitos	10 minutos			30 minutos			60 minutos		
	Y	SD	N	Y	SD	N	Y	SD	N
20.0	0.189	0.001	2	0.253	0.004	2	0.263	0.005	2
15.0	0.150	0.001	2	0.204	0.004	2	0.213	0.005	2
10.0	0.098	0.001	2	0.136	0.005	2	0.143	0.006	2
5.0	0.042	0.001	2	0.059	0.001	2	0.064	0.001	2
2.5	0.020	0.001	2	0.029	0.004	2	0.033	0.006	2

Figura 16. Medición de la actividad de 7.5 ng de SMD de *Loxosceles* (toxina recombinante de *L. boneti*) sobre preparaciones con diferente porcentaje de eritrocitos de humano, mediante el método de Amplex Red®. Los datos generados en el ensayo, se analizaron con el programa Graph Pad Prism Versión 4.0b. En A) Se muestra la gráfica de regresión lineal, en el eje x: los eritrocitos de humano en diferentes porcentajes y en el eje Y: la absorbancia medida en el sobrenadante de los eritrocitos expuestos a la SMD. En B) Se muestra la tabla de resultados, donde Y: Absorbancia a 570 nm, SD: desviación estándar y N: es el número de mediciones (se hizo por duplicado).

7.4. MEDICIÓN DE ACTIVACIÓN DE LA MAPK p38 EN MACRÓFAGOS MURINOS PERITONEALES EXPUESTOS A LA SMD DE *Loxosceles*

La activación de la MAPK p38 está involucrada con la regulación de movilidad celular y la fosforilación de la fosfolipasa citosólica A₂ (cPLA₂) teniendo un papel relevante en el inicio y regulación de la producción de eicosanoides los cuales son mediadores del proceso inflamatorio (Kramer *et al.*, 1996).

Por lo anterior, es interesante conocer si la SMD de *Loxosceles* es capaz de activar la MAPK p38 en macrófagos. Asimismo, sería importante discernir si la activación de la MAPK p38 es atribuible a la actividad enzimática de la SMD, lo cual pudiera implicar la participación de los productos generados de la hidrólisis de esfingomielina.

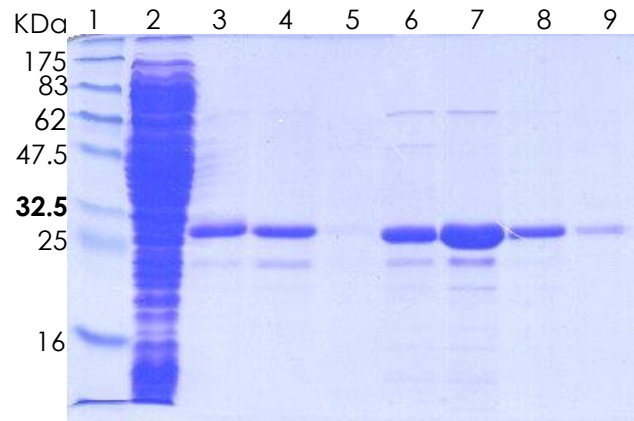
Para este ensayo, se usaron SMD recombinante enzimáticamente activa (TxrLbCOOH) y una SMD mutante enzimáticamente inactiva [rLb (E31K)], ambas se obtuvieron conforme se describe en la sección 6.3.2. de la metodología. A continuación se presentan los resultados de la caracterización de las SMD activa y mutante utilizadas en los ensayos con macrófagos.

Obtención de SMD mutante [rLb (E31K)]

Tal como se describe previamente en la metodología, se realizó un cultivo celular de *E. Coli* transformada con el vector de expresión de la SMD mutada de *L. boneti* [rLb (E31K)], se indujo la síntesis de la proteína, se hizo lisis celular y posteriormente se purificó por cromatografía de afinidad a níquel. Las fracciones eluidas se corrieron en un gel de poliacrilamida al 12.5%; a cada muestra se le adicionó β-mercaptoetanol, el gel concentrador se corrió a 70V, el gel separador a 120 V. Se tiñó con azul de Coomassie y posteriormente se destiñó con 10% metanol+10% ácido acético. Se juntaron las fracciones donde hubo mayor cantidad (observadas en el gel) y se dializaron contra PBS. Se cuantificó por BCA.

Gel analítico, SDS-PAGE 12.5%,
En condiciones reductoras
(β -mercaptoetanol),
16 μ L de cada muestra

1. Marcador de Peso Molecular
2. Antes de purificación por cromatografía
3. rLrNH2 (control positivo)
4. rLbCOOH (control positivo)
5. rLb(E31K) 1 purificada por cromatografía
6. rLb(E31K) 2 purificada por cromatografía
7. rLb(E31K) 3 purificada por cromatografía
8. rLb(E31K) 4 purificada por cromatografía
9. rLb(E31K) 5 purificada por cromatografía



Prueba de actividad *in vivo* de las toxinas recombinantes TxrLbCOOH y rLb(E31K)

Se verificó la actividad biológica de las SMD TxrLbCOOH y rLb(E31K) inyectando vía intradérmica en conejo.

Se inyectaron 6 μ g de SMD TxrLbCOOH y 8 veces más de la mutante (48 μ g), como control negativo se inyectó PBS 1X.

Los resultados mostraron que la SMD mutante rLb(E31K) no causa dermonecrosis en conejos, sólo una mínima inflamación que desaparece en menos de 12 horas, mientras que la TxrLbCOOH causa dermonecrosis que sigue en aumento aún después de 12 horas. La inyección de PBS, como control negativo, no causó inflamación.

Prueba de actividad *in vitro* de las toxinas recombinantes TxrLbCOOH y rLb(E31K)

Se verificó la actividad enzimática de SMD TxrLbCOOH y rLb(E31K) conforme al método de Amplex Red (Molecular Probes). Los resultados muestran que la SMD TxrLbCOOH presenta actividad enzimática y la mutante rLb(E31K) no presenta actividad aún colocando 10 veces más que de TxrLbCOOH.

Medición de actividad enzimática de la SMD rLbCOOH y SMD mutante (rLbE31K)

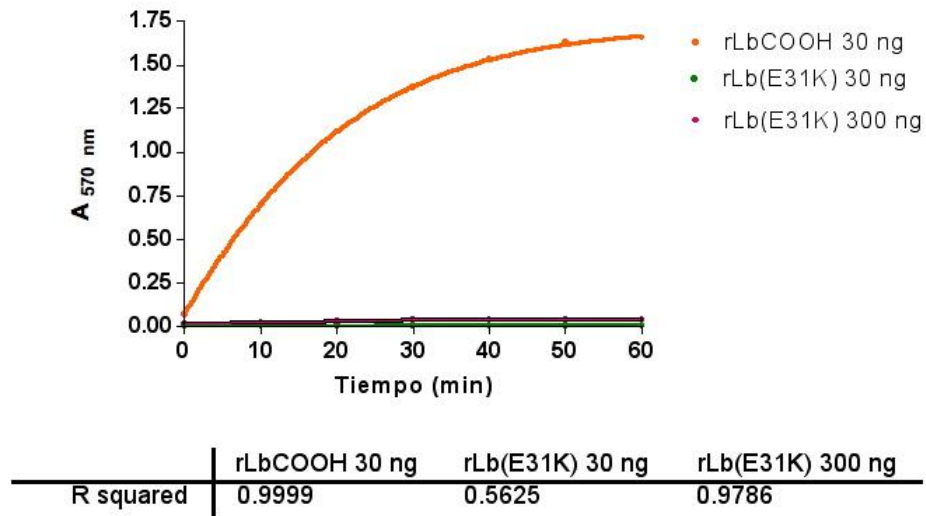


Figura 17. Gráfica de actividad enzimática de las SMD recombinantes: rLbCOOH (toxina recombinante de *L. boneti*) genera una respuesta medida por Absorbancia a 570 nm, indicando que es enzimáticamente activa. Por otro lado, rLb (E31K) (toxina mutada) no genera respuesta aún con una cantidad 10 veces mayor que la rLbCOOH. En el eje X: tiempo expresado en minutos, en el eje Y: absorbancia a 570 nm. Los datos fueron procesados con el programa Graph Pad Prism Versión 4.0b

Medición de phospho-p38 en lisado de macrófagos peritoneales

Tal como se describe en la sección 6.6 de la metodología, se obtuvieron macrófagos peritoneales de ratones BALB/c y C57.

Los macrófagos (1×10^6 /placa) se estimularon por separado a tiempos largos (4, 8 y 24h) y a tiempos cortos (5, 15 y 30 min) con:

- ✚ 1 μ g de toxina recombinante de *L. boneti* enzimáticamente activa (TxrLbCOOH)
- ✚ 1 μ g de toxina mutante de *L. boneti* enzimáticamente inactiva (rLbE31K)
- ✚ 10 ng/mL de lipopolisacárido (LPS) como control positivo
- ✚ Buffer de fosfatos salino (PBS) como control negativo

Se prepararon extractos totales de los macrófagos estimulados y posteriormente se midió la concentración de proteína por el método de Bradford. Se ajustaron las muestras para tener 40 μ g en volumen total de 30 μ L y después se analizaron por SDS-PAGE al 12%.

Posteriormente, se realizó la transferencia de proteínas del gel a una membrana de nitrocelulosa, en cámara húmeda, y se procedió a realizar un Western blot usando un anticuerpo monoclonal de ratón anti fosfo-p38 (Cell Signaling) diluido 1:500 en TBST + 5% BSA y un anticuerpo de cabra anti IgG de ratón-HRP (Cell Signaling) diluido 1:2000 en TBST + 5% leche. La membrana se reveló por quimioluminiscencia (ECL, Amersham).

A continuación se muestran las imágenes de los films revelados por quimioluminiscencia. El experimento se hizo por duplicado y se obtuvieron los mismos resultados; sólo se muestra uno (Figura 19).

Los resultados obtenidos nos muestran que hay una activación de la vía p38 MAPK por la SMD pero que esta activación no se debe específicamente a la actividad enzimática de la SMD, ya que la mutante que es enzimáticamente inactiva, también induce fosforilación de p38MAPK en tiempos cortos, observándose la mayor señal a los 15 y 30 minutos. Si bien esta vía es activada por la SMD, este fenómeno no depende de su actividad enzimática.

Por lo anterior resulta interesante explorar las otras vías de señalización de las MAPK tales como ERK o JNK ya que este grupo de proteínas están involucradas en la activación de factores de transcripción que dan origen a la producción de moléculas implicadas en muerte celular y a diferentes citocinas que pueden estar involucradas en la producción de la inflamación exacerbada observada en la fisiopatología del loxoscelismo.

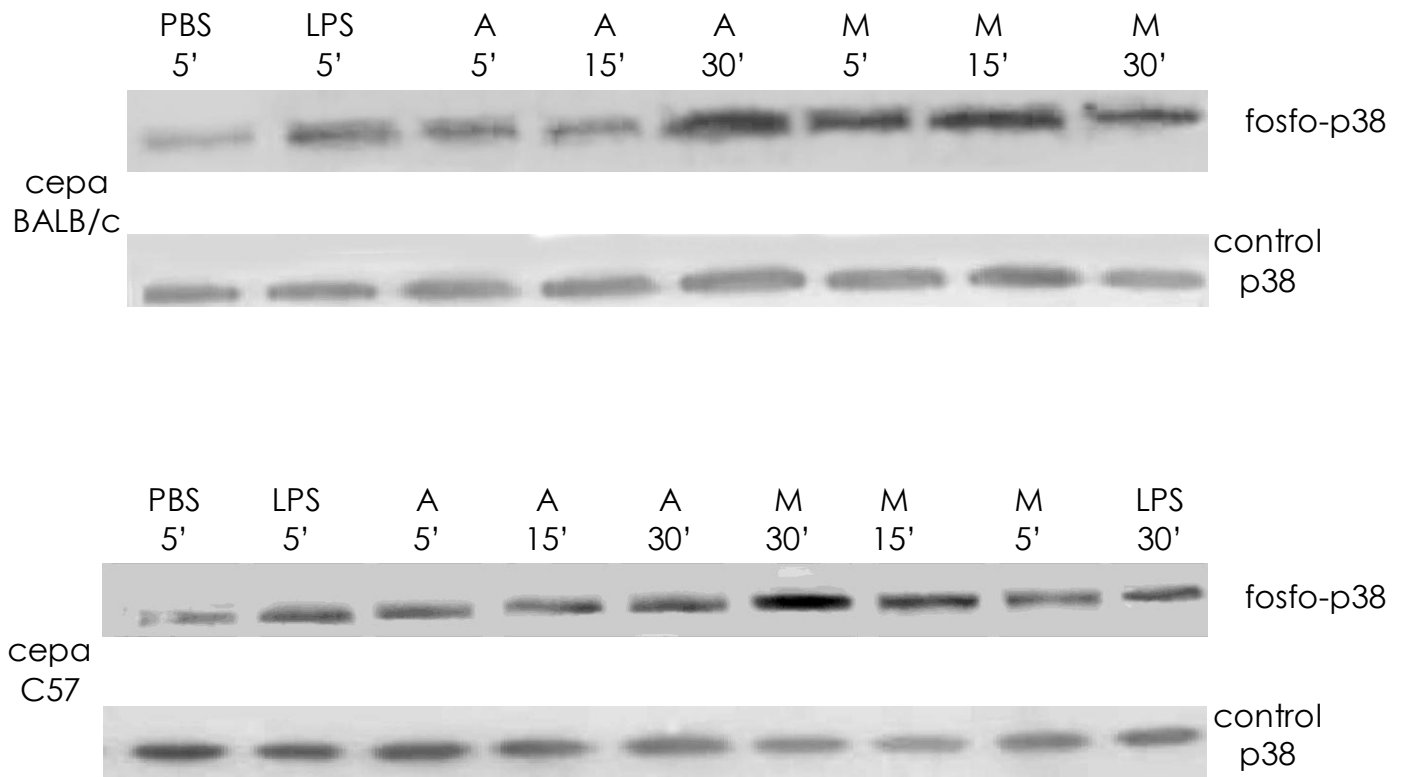


Figura 18. Activación de la MAPK p38 en macrófagos de ratones de la cepa susceptible BALB/c y de la cepa C57. La activación de p38 se determinó en extractos celulares totales por Western blot usando un anticuerpo específico contra la MAPK p38 fosforilada (p-p38). Se detectó p38 sin fosforilar (forma inactiva) como control. Se especifica el tiempo en minutos, LPS: lipopolisacárido como control positivo, A: SMD recombinante de *L. boneti* (enzimáticamente activa), M: SMD mutante de *L. boneti* (enzimáticamente inactiva).

8. CONCLUSIONES

- ✚ Los lisofosfatidatos (LPA) de cadena larga tienen mayor efecto inflamatorio en conejos, comparados con las especies moleculares de cadena hidrocarbonada corta.
- ✚ El LPA tiene un efecto inflamatorio en piel de conejos aunque no es suficiente para causar la dermonecrosis observada con la SMD de *Loxosceles*.
- ✚ La fosfoceramida (C1P) de cadena larga (20:0 C) tienen mayor efecto inflamatorio en conejos comparado con las especies moleculares de cadena hidrocarbonada intermedia.
- ✚ Los LPA de cadena larga tienen mayor efecto inyectados vía intravenosa en ratones, comparados con las especies moleculares de cadena hidrocarbonada corta.
- ✚ La C1P de cadena larga (23:0 C) y muy corta (2:0 C) tienen mayor efecto inyectados vía intravenosa en ratones, comparados con otras especies moleculares de cadena hidrocarbonada de longitud intermedia.
- ✚ La SMD recombinante de *L. boneti* posee actividad directamente sobre membrana celular de eritrocitos, sin evidencia de hemólisis.
- ✚ Se generó evidencia de que la esfingomielinasa D de *Loxosceles* activa la vía p38 MAPK en macrófagos peritoneales de origen murino, de manera independiente a su actividad enzimática.
- ✚ Si bien es cierto, que la fisiopatología de *Loxosceles* se debe a la actividad enzimática, es posible que existan otros productos o estímulos alternos además de los lisofosfolípidos generados por hidrólisis, que contribuyan a la fisiopatología.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anliker B., Chun J. Cell surface receptors in lysophospholipid signaling. *Sem. Cell. and Devel. Biol.* 2004; 15: 457-465.

Aoki J. Mechanisms of lysophosphatidic acid production. *Sem. Cell. and Devel. Biol.* 2004; 15: 477-489.

Balazs L., Okolicany J., Ferrebee M., Tolley B., Tigyi G. Topical application of the phospholipid growth factor lysophosphatidic acid promotes wound healing in vivo. *Am J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2001; 280: R466-72.

Barbaro K., Ferreira M., Cardoso D., Eickstedt V., Mota I. Identification and neutralization of biological activities in the venoms of *Loxosceles* spiders. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 1996; 11: 1491-1497.

Bettger W. J., Blackadar C. B., McCorquodale M. L., Ewing R. The occurrence of Iso 24:0 (22-methyltricosanoic acid) fatty acid in sphingomyelin of rat tissues. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 1998; 119: 299-304.

Bodil R., Leppimaki P., Axberg M., Slotte J. P. Analysis of natural and synthetic sphingomyelins using high performance thin layer chromatography. *Eur. J. Biochem.* 1999; 266, 997-1002.

Boegheim J. P. J., van Linde M., Op Den Kamp J. A. F., Roelofsen B. The sphingomyeline pools in the outer and inner layer of the human erythrocyte membrane are composed of different molecular species. *Biochim. Biophys. Acta.* 1983; 735: 438-442.

Cabrerizo S., Docampo P. C., Cari C., Ortiz de Rozas M., Diaz M., de Roodt A., Cruz O. *Loxoscelimo: epidemiología y clínica de una patología endémica en el país.* *Arch. Argent. Pediatr.* 2009; 107: 152-159.

Chaves-Moreira D., Chaim O. M., Sade Y. B., Paludo K. S., Gremski L. H., Donatti L., de Moura J., Mangili O. C., Gremski W., da Silveira R. B., Senff-Ribeiro A., Veiga S. S. Identification of a direct hemolytic effect dependent on the catalytic activity induced by phospholipase-D (dermonecrotic toxin) from brown spider venom. *J. Cell. Biochem.* 2009; 107: 655-66.

Cheng S. M., Bae O. N., Lim K. M., Noh J. Y., Lee M. Y., Jung Y. S., Cheng J. H. Lysophosphatidic acid induces thrombogenic activity through phosphatidylserine exposure and procoagulant microvesicle generation in human erythrocytes. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2007; 27: 414-421.

Contos J. J., Ishii I., Chun J. Lysophosphatidic acid receptors. *Mol Pharmacol.* 2000; 58: 1188-96.

da Silva P. H., Hashimoto Y., dos Santos F. A., Mangili O. C., Gremski W., Veiga S. S. Hematological cell findings in bone marrow and peripheral blood of rabbits after experimental acute exposure to *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. *Toxicon.* 2003; 42:155-61.

da Silveira R. B., Chaim O. M., Mangili O. C., Gremski W., Dietrich C. P., Nader H. B., Veiga S. S. Hyaluronidases in *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom are endo-beta-N-acetyl-d-hexosaminidases hydrolases. *Toxicon.* 2007; 49: 758-68.

da Silveira R. B., dos Santos Filho J. F., Mangili O. C., Veiga S. S., Gremski W., Nader H. B., von Dietrich C. P. Identification of proteases in the extract of venom glands from brown spiders. *Toxicon.* 2002; 40: 815-822.

de Oliveira K. C., Gonçalves de Andrade R. M., Piazza R. M., Ferreira J. M. Jr., van den Berg C. W., Tambourgi D. V. Variations in *Loxosceles* spider venom composition and toxicity contribute to the severity of envenomation. *Toxicon.* 2005; 45: 421-9.

de Roodt A., Salomón O. D., Lloveras S. C., Orduna T. A. Envenenamiento por arañas del genero *Loxosceles*. *Medicina.* 2002; 62: 83-94.

Desai A., Lankford H. A., Warren J. S. *Loxosceles deserta* spider venom induces the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in keratinocytes. *Inflammation*. 2000; 24: 1-9.

Desai A., Miller M. J., Gomez H. F., Warren J. S. *Loxosceles deserta* spider venom induces NF-kappaB-dependent chemokine production by endothelial cells. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 1999; 37: 447-56.

Domingos M. O., Barbaro K. C., Tinan W., Penny J., Lewis D. J. M., R., New R. R. Influence of sphingomyelin and TNF- α release on lethality and local inflammatory reaction induced by *Loxosceles gaucho* spider venoms in mice. *Toxicon*. 2003; 42: 471-479.

Feitosa L., Gremski W., Veiga S. S., Elias M. C., Graner E., Mangili O. C., Brentani R. Detection and characterization of metalloproteinases with gelatinolytic, fibronectinolytic and fibrinogenolytic activities in Brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. *Toxicon*. 1998; 36: 1039-1051.

Fernandes-Pedrosa M. F., Azevedo I. L. M. J., Goncalves de Andrade R. M., van der Berg C. W., Ramos C. R. R., Ho P. L., Tambourgi D. V. Molecular cloning and expresión of a functional dermonecrotic and haemolytic factor from *Loxosceles laeta* venom. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002; 298: 638-645.

Fueller M., Wang De An., Tigyi G., Siess W. Activation of human monocytic cells by lysophosphatidic acid and sphingosine-1-phosphate. *Cell. Signal.* 2003; 15: 367-375.

Futerman A. H., Hannun Y. A. The complex life of simple sphingolipids. *EMBO*. 2004; 5: 777-781.

Futrell J. M. Loxoscelism. *Am. J. Med. Sci.* 1992; 304: 261-267.

Gatt S., Dinur T., Barenholz Y. A spectrophotometric method for determination of sphingomyelinase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1978; 530: 503-507.

Goetzl E. J., Derian C. K., Tauber A. I., Valone F. H. Novel effects of 1-O-hexadecyl-2-acyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine mediators on human leukocyte function: Delineation of the specific roles of the acyl substituents. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1980; 94:3 881-888.

Gomez H. F., Miller M. J., Desai A., Warren J. S. Loxosceles spider venom induces the production of alpha and beta chemokines: implications for the pathogenesis of dermonecrotic arachnidism. *Inflammation.* 1999; 23: 207-15.

Gómez-Muñoz A. Ceramide-1-phosphate: a novel regulator of cell activation. *FEBS Lett.* 2004; 562: 5-10.

Goñi F. M., Alonso A. Biophysycs of sphingolipids I. Membrana properties of sphingosine, ceramides and other simple sphingolipids. *Biochim. Biophys. Acta.* 2006; 1758: 1902-1921.
Jalink K., Hengeveld T., Mulder S., Postma F. R., Simon M. F., Chap H., van der Marel G. A., van Boom J. H., van Blitterswijk W. J., Moolenaar W. H. 1995; 307: 609-616.

Kramer R. M. p38-mitogen activated protein kinase phosphorylates cytosolic phospholipase A₂ (PLA₂) in thrombin-stimulate platelets. Evidence that proline-directed phosphorylation is not required for mobilization of arahidonic acid by cPLA₂. *J. Biol. Chem.* 1996; 271: 2723-2729.

Kurpiewski G., Forrester L. J., Barrett J. T., Campbell B. J. Platelet aggregation and sphingomyelinase D activity of a purified toxin from the venom of *Loxosceles reclusa*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1981; 678: 467-76.

Lee S., Lynch K. R. Brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) venom phospholipase D (PLD) generates lysophosphatidic acid (LPA). *Biochem. J.* 2005; 391: 317-23.

Lin C. L., Chen C. N., Huang M. T., Lee S. J., Lin C. H., Chang A. C., Lee H. Lysophosphatidic acid upregulates vascular endothelial growth factor-C and tube formation in human endothelial cells through LPA1/3, COX-2, and NF- κ B activation- and EGFR transactivation-dependent mechanisms. *Cell Sign.* 2008; 20: 1804-1814.

Lowe, R. T., 1832. Descriptions of two species of Araneidae, natives of Madeira. Zool. Jour. 5: 320-323.<http://research.amnh.org/oonopidae/catalog/>

McGlasson D. L., Harroff H. H., Sutton J., Dick E., Elston D. M. Cutaneous and systemic effects of varying doses of brown recluse spider venom in a rabbit model. Clin. Lab. Sci. 2007; 20: 99-105.

Montero-León Laura. Activación diferencial de la MAP cinasa p38 entre macrófagos susceptibles y resistentes a la toxina letal de *Bacillus anthracis*. México D. F. 2008. Tesis presentada en la Facultad de Ciencias de la UNAM para la obtención del título de Bióloga.

Moolenaar W. H. Lysophosphatidic acid, a multifunctional phospholipid Messenger. J. Biol. Chem. 1995; 270: 12949-12952.

Murakami M. T., Fernandes-Pedrosa M. F., Tambourgi D. V., Arni R. K. Structural basis for metal ion coordination and the catalytic mechanism of sphingomyelinases D. J. Biol. Chem. 2005; 280: 13658-13664.

Nakamura H., Hirabayashi T., Shimizu A., Murayama T. Ceramide-1-phosphate activates cytosolic phospholipase A2 α directly and by PKC pathway. Biochem. Pharmacol. 2006; 71: 850-857.

Ojala P. J., Hirvonen T. E., Hermansson M., Somerharju P., Parkkinen J. Acyl chain-dependent effect of lysophosphatidylcholine on human neutrophils. J. Leukoc. Biol. 2007; 82: 1-9.

Olguín-Pérez Laura. Caracterización de la actividad enzimática de la esfingomielinasa D del veneno de las arañas violinistas *Loxosceles boneti*, *L. reclusa* y *L. laeta*. Cuernavaca, Mor. Méx. 2006. Presentada en el Instituto de Biotecnología de la UNAM para la obtención del grado de Maestra en Ciencias.

Palmetshofer A., Robson S. C., Nehls V. Lysophosphatidic acid activates nuclear factor kappa B and induces proinflammatory gene expression in endothelial cells. Thromb Haemost. 1999; 82: 1532-7.

Paludo K. S., Biscaia S. M., Chaim O. M., Otuki M. F., Naliwaiko K., Dombrowski P. A., Franco C. R., Veiga S. S. Inflammatory events induced by brown spider venom and its recombinant dermonecrotic toxin: a pharmacological investigation. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 2009; 149:323-33.

Paludo K. S., Gremski L. H., Veiga S. S., Chaim O. M., Gremski W., de Freitas Buchi D., Nader H. B., Dietrich C. P, Franco C. R. The effect of brown spider venom on endothelial cell morphology and adhesive structures. *Toxicon.* 2006; 47: 844-53.

Patel K. D., Modur V., Zimmerman G. A., Prescott S. M., McIntyre T. M. 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. *J. Clin. Invest.* 1994; 94: 631-42.

Peña R. M. T., Riego E. J. Nuevas funciones para las fosfolipasas y aciltransferasas de fosfolípidos: una breve revisión de las funciones y el metabolismo de fosfolípidos. *Mensaje bioquímico.* 2005; Volumen XXIX.

Pettus B. J., Bielawska A., Subramanian P., Wijesinghe D. S., Maceyka M., Leslie C. C., Evans J. H., Freiberg J., Roddy P., Hannun Y. A., Chalfant C. E. Ceramide 1-Phosphate Is a Direct Activator of Cytosolic Phospholipase A2. *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 11320-11326.

Pettus B. J., Kitatani K., Chalfant C. E., Taha T. A., Kawamori T., Bielawski J., Obeid L. M., Hannun Y. A. The coordination of prostaglandin E2 production by sphingosine-1-phosphate and ceramide 1-Phosphate. *Mol. Pharmacol.* 2005; 68: 330-335.

Platnick N. I. *The World of Spider Catalog.* 2009. The American Museum of Natural History. <http://research.amnh.org/entomology/spiders/>
produced by secretory lysophospholipase D in body fluids. *Biochim. Biophys. Acta.* 2002; 1582: 18-25.

Ramos-Cerrillo B., Olvera A., Odell G. V., Zamudio F., Paniagua-Solís J., Alagón A., Stock R. Genetic and enzymatic characterization of sphingomyelinase D isoforms from the

North American fiddleback spider *Loxosceles boneti* and *Loxosceles reclusa*. *Toxicon*. 2004; 44: 507-514.

Ramstedt B., Slotte J. M. Membrana properties of sphingomyelins. *FEBS Lett*. 2002; 531: 33-37.

Rattmann Y. D, Pereira C. R., Cury Y., Gremski W., Marques M. C., da Silva-Santos J. E. Vascular permeability and vasodilation induced by the *Loxosceles intermedia* venom in rats: involvement of mast cell degranulation, histamine and 5-HT receptors. *Toxicon*. 2008; 51: 363-72.

Rees S. R., Nanney B. L., Yates R. A., King L. E. Jr. Interaction of Brown Recluse Spider Venom on Cell Membranes: The Inciting Mechanism?. *J. Invest. Dermatol*. 1984; 83: 270-275.

Rioja L. B. E., Ruíz O. M., Larios R. I. *Tratado elemental de Zoología*. 1975. Editorial Porrúa.
Ruppert E. E., Barnes R. D. *Zoología de los invertebrados*. 1995. Mc Graw-Hill Interamericana 621-679.

Sánchez-López R., Ramos-Cerrillo B., Olvera A., Olguín-Pérez L., Saab G., Pérez-Torres A., Alagón A. Biological properties of two recombinant mutants of *Loxosceles boneti* Sphingomyelinase D. *Memorias del 9th Pan-American Congress of the Internacional Society on Toxinology*. Juriquilla, Querétaro, México. October, 2007.

Tambourgi D. V., Magnoli F. C., van der Berg C. W., Morgan B. P., de Araujo P. S., Alves W. E., Da Silva D. W. Sphingomyelinases in the venom of the spider *Loxosceles intermedia* are responsible for both dermonecrosis and complement-dependent hemolysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1998; 251: 336-373.

Tambourgi D. V., Paixão-Cavalcante D., Gonçalves de Andrade R. M., Fernandes-Pedrosa M. F., Magnoli F. C., Paul Morgan B., van den Berg C. W. *Loxosceles* sphingomyelinase induces complement-dependent dermonecrosis, neutrophil infiltration, and endogenous gelatinase expression. *J. Invest. Dermatol*. 2005; 124: 725-31.

Tavares F. L., Sousa-e-Silva M. C., Santoro M. L., Barbaro K. C., Rebecchi I. M., Sano-Martins I. S. Changes in hematological, hemostatic and biochemical parameters induced experimentally in rabbits by *Loxosceles gaucho* spider venom. *Hum. Exp. Toxicol.* 2004; 23: 477-86.

Tigyi G. Physiological responses to lysophosphatidic acid and related glycerophospholipids. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2001; 64: 47-62.

Tokumura A, Fukuzawa K, Tsukatani H. Effects of synthetic and natural lysophosphatidic acids on the arterial blood pressure of different animal species. *Lipids.* 1978 Aug; 13(8):572-4.

Tokumura A. Physiological and pathophysiological roles of lysophosphatidic acids produced by secretory lysophospholipase D in body fluids. *Biochim. Biophys. Act.* 2002, 1582: 18-25.

Tokumura A., Carbone L. D., Yoshioka Y., Morishige J., Kikuchi M., Postlethwaite A., Watsky M. A. Elevated serum levels of arachidoyl-lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate in systemic sclerosis. *Int. J. Med. Sci.* 2009; 6: 168-176.

Tokumura A., Carbone L. D., Yoshioka Y., Morishige J., Kikuchi M., Postlethwaite A., Watsky M. A. Elevated serum levels of arachidoyl-lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate in systemic sclerosis. *Int. J. Med. Sci.* 2009; 6: 168-176.

Tokumura A., Sinomiya J., Kishimoto S., Tanaka T., Kogure K., Sigura T. *et al.* Human platelets respond differentially to lysophosphatidic acids having a highly unsaturated fatty acyl group and alkyl ether-linked lysophosphatidic acids. *Biochem J.* 2002; 365: 617-28.

van Corven E. J., van Rijswijk A., Jalink K, van der Bend R. L., van Blitterswijk W. J., Moolenaar W. H. Mitogenic action of lysophosphatidic acid and phosphatidic acid on fibroblasts. *Biochem J.* 1992; 281: 163-169.

van Meeteren L. A., Frederiks F., Giepmans B. N., Pedrosa M. F., Billington S. J., Jost B. H. Tambourgi D. V., Moolenaar W. H. Spider and Bacterial Sphingomyelinases D target

cellular lysophosphatidic acid receptors by hydrolyzing lysophosphatidylcholine. *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 10833-10836.

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

Wijesinghe D. S., Massiello A., Subramanian P., Szulc Z., Bielawska A., Chalfant C. E. Substrate specificity of human ceramide kinase. *J Lipid Res.* 2005; 46: 2706-2716.

Wijesinghe D. S., Subramanian P., Lamour N. F., Gentile L B., Granado M. H., Bielawska A., Szulc Z., Gomez-Muñoz A., Chalfant C. E., Chain length specificity for activation of cPLA2 α by C1P: use of the dodecane delivery system to determine lipid-specific effects. *J Lipid Res.* 2009; 50: 1986–1995.