



FACULTAD DE CIENCIAS
PROGRAMA DE LICENCIATURA EN CIENCIAS MENCIÓN
BIOLOGÍA O QUÍMICA

**“ENSAYOS DE TOXICIDAD DEL VENENO DE *LOXOSCELES*
LAETA EN CULTIVOS DE FIBROBLASTOS HUMANOS”**

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIADA EN CIENCIAS MENCIÓN BIOLOGÍA

CONSTANZA BERTEA SEISSUS

DIRECTOR

DR. OLIVER SCHMACHTENBERG

Valparaíso, Chile

2017

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer primero a Jesús, quien hace un par de años me habló de la loca idea de trabajar con arañas. Gracias por creer en mí, al abrir las puertas al estudio de estas pequeñas, pero no menos importantes especies.

Además, debo agradecer a mi profesor tutor Dr. Oliver porque él decidió dejarme hacer este estudio. Le agradezco por respaldarme, darme la libertad de expresarme y ocupar de su tiempo en discusiones y correcciones en torno al trabajo y escrito.

A los profesores Dr. Agustín Martínez y Eduardo Couve por toda la ayuda dada para lograr llevar a cabo esta investigación, tanto por el uso de materiales como de sitios de trabajo.

Agradezco de forma especial a Eduardo, por charlar conmigo todos estos temas con tanta entretención, porque has sido mi soporte en este recorrido al que siempre me supiste motivar para seguir adelante. Gracias, por creer en que podía hacer esto más de lo que yo lo creía.

A mis amigos más presentes de este año Cindel, Karen, Eduardo, Daniel y Tania. Estoy agradecida de sus múltiples enseñanzas, de sus risas e incluso sabiduría en torno a problemáticas o discusiones. Un agradecimiento especial para Karen, por ser mi inicio en el camino de este tema, y por ser tan buena amiga en todos estos años. A Cindel, porque la vida en el laboratorio se me hizo aún más amena, por cada almuerzo, cada charla y cada ayuda que me brindaste que no fue poca, agradezco haber recorrido este camino contigo, y de paso ganar una gran amiga.

Agradezco a todo el equipo del Laboratorio de Fisiología Sensorial. Iniciando por Bárbara, por tu apoyo en todo sentido para que todo saliera de la mejor manera. A Adolfo, Daniela, Alex, Felipe, Maia, Fernanda, Carlos, Victor y Karen; por compartir conmigo, hacer el laboratorio un lugar grato donde trabajar y, claro, no hay que olvidar, por recolectar arañas.

Agradezco al Laboratorio de Conexinas por tener tan buena disposición a ayudar en especial a Jaime y Carolina. Carito gracias por enseñarme a no tener miedo a errar, ya que, todos han

sido yo, tu frase notable. Gracias por dar de tu tiempo siempre para solucionar mis problemas, y siempre dejando en claro que equivocarse o ser lentos es parte del juego.

Agradezco a Victoria, porque me ayudaste de tantas maneras que no es necesario entrar en detalle, tú sabes todo lo agradecida que estoy de tu apoyo incondicional con mi trabajo, eres grande Vicky.

Agradezco a mi familia, primero a Tabata por siempre tenderme una mano en cada complicación que se me presentó y por estar conmigo pese a todo, gracias hermanita. Y, finalmente, a mis papás por darme una educación poco convencional. Muchas gracias por haber notado mi pasión por la biología, por incentivar me a formar parte de este mundo de pequeña y a respaldarme en mi vida universitaria sin dudarlo siquiera. Porque ustedes fueron quienes regaron la semilla de la curiosidad de tantas maneras, y aunque no les pareció la mejor idea que trabajara con la araña de rincón, no pasaron muchos minutos para que les convenciera. Los amo, porque saben que aquí no termina el camino.

Por último, agradezco a todas las personas que se dieron el tiempo de llamarme o de llamar a Jesús por una araña, siento un profundo cariño por aquellas personas que además las guardaron y trajeron de zonas lejanas, gracias Muriel y Cindel por todos esos ejemplares Rancagüinos. Porque sin todos ustedes no habría sido posible realizar este trabajo.

RESUMEN

Loxosceles laeta es una especie que cohabita en nuestros hogares y que es de gran peligrosidad por ser la araña más venenosa de Sudamérica, debido a su potente veneno constituido por un grupo extenso de toxinas, donde la más estudiada se llama Fosfolipasa-D. Esta enzima escinde lípidos y genera con ello metabolitos que en muchos casos están asociados a vías de señalización celular, lo que resulta interesante ya que se ha demostrado que el cuadro generado por una mordedura es muy similar a la inoculación de esta enzima por sí sola. La mordedura de esta araña genera Loxoscelismo, un cuadro que puede ser local (cutáneo), desencadenando una respuesta inflamatoria que puede generar necrosis del área, o sistémico (cutáneo visceral), en el que se compromete el organismo habiendo daño renal y hepático, lo que puede causar la muerte. En Chile el 83 % de los casos reportados consiste en el cuadro cutáneo, mientras un 22,2% en niños y 19,1% en adultos trata del cutáneo-visceral teniendo una mortalidad del 1 al 3%. Aunque las mordeduras por arañas de rincón no son frecuentes y la mayoría de los casos no son graves, resulta sustancial el estudio de su veneno porque no existe una cura para remediar los síntomas del cuadro sistémico. Por lo anterior, se hizo un estudio para comprender el mecanismo de acción del veneno, adaptando un protocolo en donde se sedaron arañas hembras en CO₂, y posteriormente se les extrajo y almacenó el veneno. Este veneno se utilizó en cultivos de fibroblastos humanos y a una concentración determinada se llevaron a cabo ensayos inmunocitoquímicos para estudiar la mantención de mitocondrias, núcleo, conexina 43, iNOS y el citoesqueleto de actina. Se pudo demostrar que el veneno de *L. laeta* en fibroblastos humanos posee una reacción variada que probablemente genera muerte celular por apoptosis, en donde el cambio en la morfología de la mitocondria y disminución de conexina 43 en aposición podría estar relacionado con ello. Por otro lado, se demostró que hay una vía inflamatoria asociada por el aumento en expresión de la enzima iNOS, la cual podría no estar asociada a muerte celular por necrosis sino a una respuesta a la toxina Fosfolipasa-D escindiendo uno de sus posibles sustratos lipídicos, la esfingomielina, la cual forma ceramida-1-fosfato, que se ha demostrado que es un factor en la liberación de NO por la vía inducible sintasa.

Agradecimientos	2
Resumen	4
Índice	5
Índice de figuras	6
Introducción	7
<i>Generalidades de las arañas</i>	7
<i>Glándulas de veneno</i>	10
<i>Araña venenosa Loxosceles laeta</i>	11
<i>Toxinas del género Loxosceles y vía metabólica de Fosfolipasa-D</i>	14
Planteamiento del problema	23
Hipótesis	24
Objetivos generales	24
Objetivos específicos	24
Materiales y métodos	25
1) <i>Protocolo de extracción de veneno en Loxosceles laeta</i>	25
2) <i>Aislamiento y cultivo de fibroblastos dérmicos</i>	27
3) <i>Cultivos para ensayos con veneno</i>	28
4) <i>Cultivos para ensayo de curva dosis respuesta</i>	28
5) <i>Medición de concentración de proteínas con fluorómetro</i>	29
6) <i>Ensayo de curva dosis respuesta a exposición a veneno</i>	31
7) <i>Cuantificación del efecto del veneno</i>	32
8) <i>Protocolo de inmunocitoquímica</i>	32
Resultados	35
1) <i>Ensayos para curva dosis respuesta</i>	35
2) <i>Conteo de proteínas</i>	40
3) <i>Cuantificación del efecto del veneno sobre fibroblastos humanos</i>	41
4) <i>Curva de dosis respuesta en relación a los experimentos anteriores</i>	43
5) <i>Inmunocitoquímica</i>	44
Discusión	48
Conclusión	55
Proyecciones	56
Anexo	57
Bibliografía	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.....	8
Figura 2.....	9
Figura 3.....	11
Figura 4.....	12
Figura 5.....	13
Figura 6.....	17
Figura 7.....	19
Figura 8.....	27
Figura 9.....	29
Figura 10.....	31
Figura 11.....	36
Figura 12.....	37
Figura 13.....	38
Figura 14.....	39
Figura 15.....	42
Figura 16.....	43
Figura 17.....	46
Figura 18.....	47

Generalidades de las arañas

Las arañas pertenecen al phylum *Arthropoda*, clase *Arachnida*, orden *Araneae*. Son individuos depredadores que se pueden encontrar a lo largo de todo el mundo, en los cinco continentes y, habitando en múltiples ambientes. Hasta el momento, se descubren nuevas especies cada día, por lo que su número se estima alrededor de 40.000, los cuales pertenecen a 110 familias (Platnick *et al.* 2009).

La morfología general de una araña consiste en dos secciones llamadas prosoma y opistosoma (Fig.1). La primera porción corresponde a la zona anterior llamada también cefalotórax, y la segunda a la posterior que se conforma por el abdomen. La unión de estas dos estructuras se llama pedicelo. El prosoma es la zona en donde se encuentran los órganos que cumplen las funciones de alimentación, locomoción (extremidades), sistema de integración nervioso (constituido de dos ganglios, el subesofágico y el supraesofágico), relacionado con reproducción en arañas maduras (pedipalpos), visión y sobrevivencia (producción y eliminación de veneno). Mientras, el opistosoma está relacionado con digestión, circulación, respiración (traqueal y pulmonar), excreción, reproducción como tal y producción de seda (hilanderas). El prosoma tiene una sección ventral y dorsal, llamados el esternón y el caparazón, respectivamente. Estas dos porciones permiten la conexión de seis pares de extremidades, un par de quelíceros que le confieren la habilidad de morder y expulsar veneno conectado internamente con las glándulas del veneno, un par de pedipalpos que están situados en la parte anterior al lado de las patas (su forma permite discriminar machos de hembras, siendo alargados y con una estructura esférica en el extremo terminal en machos, y rectos en hembras), y a su lado cuatro pares de patas locomotoras (Foelix, 2011).

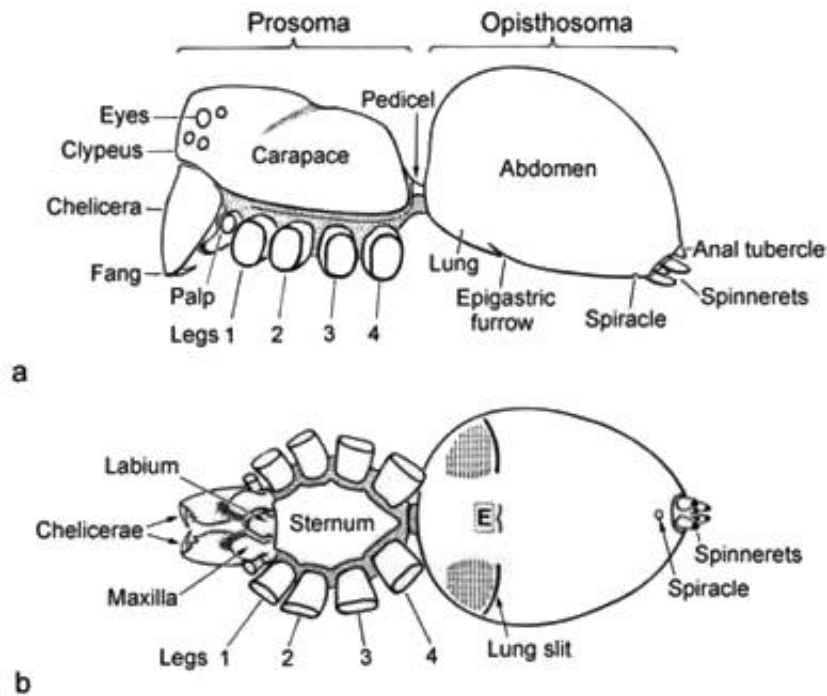


Fig. 1. Apariencia externa del cuerpo de una araña hembra (Foelix, 2011).

El orden Araneae presenta tres subórdenes: Mygalomorphae (o Migalomorfos) que comprenden a todas las tarántulas, por ejemplo de la familia Lycosidae, también, el género *Brachypelma* (Foelix, 2011); Araneomorphae (o Araneomorfos) por ejemplo, las especies del género *Heriades* como *Heriades mellotei* (Berkut *et al.* 2015), y, Mesothelae (o Mesotelos) como las especies de la familia Liphistiidae, como *Liphistius batuensis* y *Liphistius lahu* (Xu *et al.* 2015). Las Migalomorfos presentan quelíceros que se desplazan en el plano horizontal, por el contrario, los Araneomorfos presentan movilidad en el plano vertical de sus quelíceros. Por último, Los Mesotelos tienen su abdomen segmentado y un estrecho esternón (Foelix, 2011).

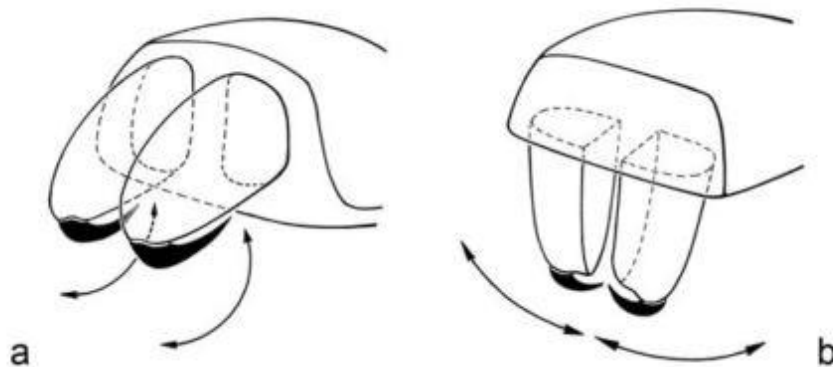


Fig. 2. Movimiento de los quelíceros de forma horizontal (*Araenomorfas*) y vertical (*Migalomorfa*) (Foelix, 2011).

Las arañas son organismos exotérmicos, característica general de los artrópodos, lo cual define que sean incapaces de regular su calor corporal teniendo una tasa metabólica muy baja, por lo que su alimentación es esporádica, pudiendo sobrevivir largo tiempo sin ingerir nada (Foelix, 2011). Es por esta razón que dependen completamente de la temperatura del ambiente, lo que condiciona su distribución geográfica. La distribución está sometida a constantes alteraciones debido al impacto del cambio climático. Un estudio hecho en la especie *Loxosceles reclusa* en Estados Unidos habla de las condiciones claves a las que debe estar sometida una araña para que se traslade de su antiguo nicho geográfico (Saupe *et al.* 2011). Es importante, tomar en consideración que las arañas, a pesar de ser exotérmicos, poseen la capacidad de adaptarse al ambiente, pero para ello deben superar dos situaciones críticas: 1) Superar las grandes fluctuaciones de temperatura y humedad, la disponibilidad de agua potable, a pesar de que pueden pasar largos periodos sin tomar agua debido a que su cutícula es impermeable y permite que no se deshidraten con facilidad, la velocidad del viento, entre otros; y, 2) el tamaño pequeño que poseen en general en relación a su masa, genera una razón superficie/volumen que las hace muy susceptibles a los cambios ambientales de temperatura y humedad (Nentwig, 2013).

Glándulas de veneno

Una de las estructuras más fascinantes que poseen las arañas son sus glándulas de veneno, ya que mejoran las técnicas de depredación de otros organismos, incluso si se trata de individuos de la misma especie, con la finalidad de sobrevivir y alimentarse. Sin embargo, su importancia en la especie en particular depende de factores morfológicos, bioquímicos y estructurales de la glándula en cuestión. Los Mesotelos comprenden el grupo de arañas más primitivas, sus glándulas están localizadas en la zona anterior y basal de los quelíceros, siendo bastante pequeñas y probablemente no siendo muy relevantes para la depredación. Los Migalomorfos poseen glándulas en el mismo segmento basal produciendo un veneno potente a través de los quelíceros. Finalmente, en los Araneomorfos, las glándulas ocupan un volumen mucho más pronunciado, ocupando parte del prosoma y siendo importantes para la predación (Suter and Stratton, 2013).

La existencia del veneno, y la aparición de casos clínicos asociados a mordeduras de arañas a lo largo del tiempo, ha abierto un campo de estudio relacionado con la composición de este y su respuesta en las personas afectadas para mejorar su pronóstico. Existen representantes de gran peligrosidad alrededor del mundo, siendo en este caso en particular los de Chile, Perú y Brasil. Se atribuyen los casos emblemáticos por mordeduras a los causados por arañas de la familia *Sicariidae* (arañas araneomorfas, altamente venenosas y con 6 ojos, a diferencia de la mayoría de las arañas que tienen 8), habiendo ocho representantes descritas en el país tanto del género *Loxosceles* como *Sicarius* (Platnick *et al.* 2004). Hoy en día, en base a varios reportes clínicos de personas afectadas gravemente por mordeduras de arañas y, las cuales, en su mayoría ocurrieron dentro de una casa en los periodos de elevada temperatura (primavera y verano), ha hecho que se buscara la especie responsable. Siendo en su mayoría provocadas por esta araña, causando un cuadro variable que en general incluye necrosis del área, y en algunos casos aislados la muerte (Canals *et al.* 2011). Finalmente, Macchiavelo en 1937 relacionó el cuadro con la especie *Loxosceles laeta* (Macchiavelo *et al.* 1937), y años más tarde Atkins, demostró la patogenicidad de una araña de la familia *Loxosceles reclusa* (Atkins *et al.* 1957). Hoy en día están descritas mordeduras por muchas de estos

representantes, siendo las más documentadas *L. laeta*, *L. reclusa*, *L. rufescens*, *L. arizonica*, *L. Intermedia* y *L. gaucho*.

Araña venenosa Loxosceles laeta

Loxosceles laeta, normalmente llamada araña de rincón, presenta un diseño característico en su cefalotórax que recuerda la forma de un violín, con la base dirigida hacia los ojos y el mango hacia el abdomen (Fig. 3). Además, tiene 3 pares de ojos dispuesto uno en la zona frontal y dos laterales como se observa en la imagen (Fig. 4). Hay otras arañas que poseen 6 ojos, pero no dispuestos de la misma forma, siendo una clave ideal para la clasificación (Appel *et al.* 2005; Swanson *et al.* 2006; Benamú *et al.* 2007).



Fig. 3. Ejemplar macho adulto de la especie *Loxosceles laeta*. En el cefalotórax se puede observar la forma de un violín más los tres pares de ojos característicos (Dr. Oliver Schmachtenberg).

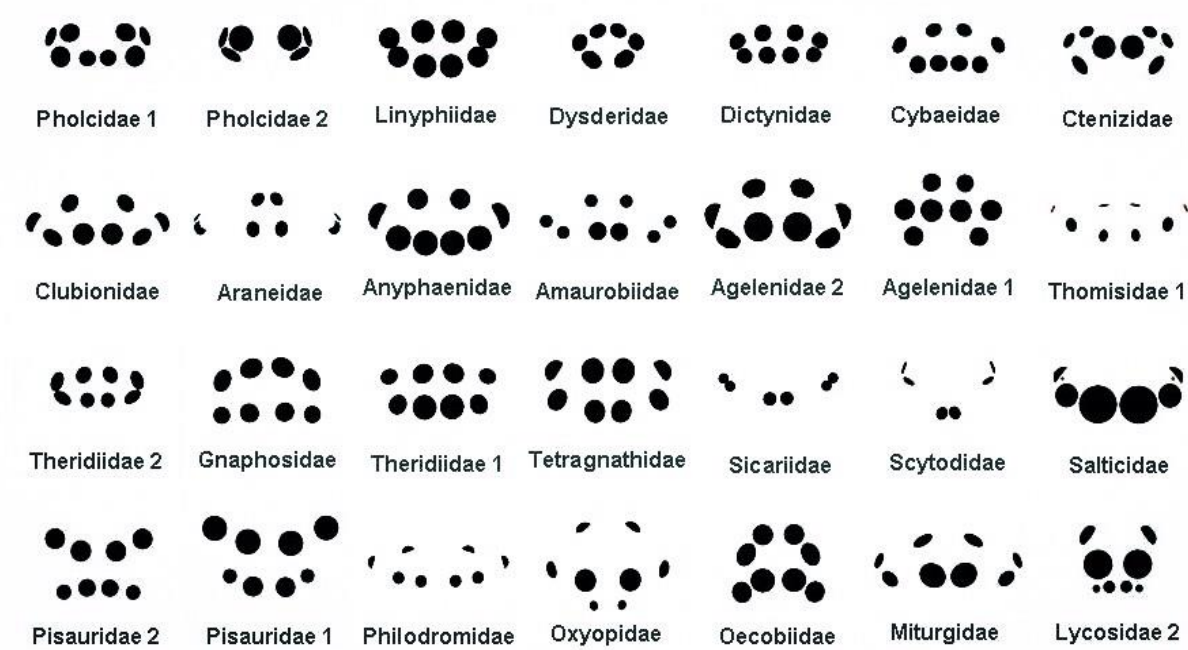


Fig. 4. Clasificación de la familia Sicariidae en relación a otras familias de arañas en base a disposición, forma y cantidad de ojos (Benamú et al. 2007).

El cuadro producido por una mordedura de esta araña se conoce por Loxoscelismo, el cual puede ser cutáneo o cutáneo-visceral. El primero, es una mordedura que usualmente no fue hecha en un sitio muy comprometido por la vascularización, o bien, la araña al encontrarse deshidratada no inyectó un veneno muy concentrado, disminuyendo así su potente efecto, entre otros. En este caso, el veneno no difunde mayormente por lo que la respuesta es local, causando en las primeras ocho horas una respuesta inflamatoria. Esta, subyace a la formación de un edema, y posteriormente, produciendo dolor, eritema e isquemia, para luego formar una mancha de gran dureza que puede ser con o sin ampolla, que usualmente posee la tonalidad violácea-azul llamada placa livedoide. Una vez transcurridas las ocho horas, se puede producir un daño necrótico, el cual, puede ser profundo, pero, en ningún caso comprometiendo a otros órganos (Fig. 5). El Loxoscelismo cutáneo-visceral, en cambio, es el cuadro menos frecuente pero más peligroso, siendo la causa de los casos letales. Se caracteriza por generar inicialmente un daño local que al pasar las horas se profundiza en un daño a nivel sistémico, comprometiendo órganos vitales. El cuadro presenta en general

fiebre, hemólisis, hematuria, hemoglobinuria e insuficiencia renal en las primeras horas, para luego de 24 horas causar ictericia, daño hepático y finalmente la muerte (Futrell *et al.* 1992; Schenone *et al.* 2003; Swanson *et al.* 2006).

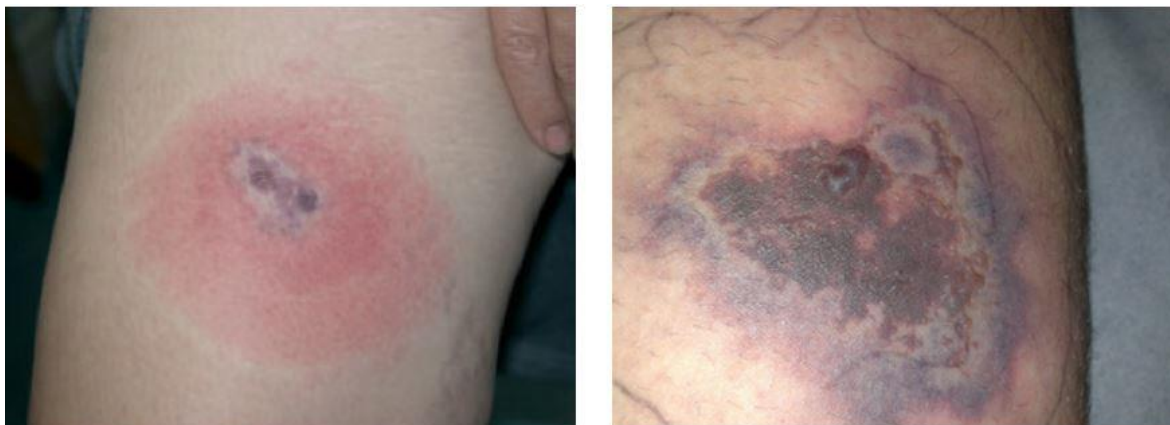


Fig. 5. Mordedura típica de *Loxosceles laeta* que genera cuadro de *Loxoscelismo cutáneo*. Izquierda, placa livedoide en desarrollo. Fuente: Manríquez *et al.* *Loxocelismo cutáneo y cutáneo visceral. Rev. Chilena Infectol.* 2009; 26: 420-32. Derecha, mordedura araña a las 24 horas de evolución (Dra. Isabel Noemi).

Resulta llamativo que un cuadro sea tan complejo y de acción rápida cuando se trata de una inoculación de veneno de unos pocos microlitros de volumen, pero, los que contienen alrededor de 20-200 μg de proteínas totales, es decir, altamente concentrado (Binford and Wells *et al.* 2003; da Silva *et al.* 2004). Sin embargo, de Oliveira demostró estudiando el veneno de *L. laeta* y *L. intermedia* que la efectividad del veneno depende también de varios factores asociados a la araña, como su estado nutricional, sexo, tamaño, especie y edad. Donde se definió que la acción del veneno de hembras siempre genera un cuadro necrótico más grave que el de los machos (de Oliveira *et al.* 2005). Por otra parte, hoy en día una mordedura de este tipo resulta letal porque no existe un tratamiento eficaz para remediar los síntomas, dependiendo en gran medida si el cuadro es local o sistémico. Las medidas que se toman en las primeras horas son muy variables a lo largo del mundo, pero entre ellas está la administración de anti-histamínicos, analgésicos, corticosteroides y dapsonas, además de esteroides, escisión quirúrgica, entre otros (Hogan *et al.* 2004). Hasta la fecha existe un suero estandarizado en una solución inyectable de inmunoglobulinas específicas obtenidas de suero

de equinos o conejos hiperinmunizados, sin embargo, lamentablemente no existe ningún caso de Loxoscelismo que haya sido remediado por esta vía en ninguna de sus etapas, además de que puede presentar muchos efectos secundarios severos, por lo que no se recomienda su uso (Baruch *et al.* 2016).

Se ha reportado que los representantes de la familia *Sicariidae* causan cuadros clínicos idénticos al causado por *Loxosceles laeta*. Es por esto, que se supuso que debía haber una similitud en la composición del veneno en estas arañas, encontrándose que la toxina Fosfolipasa-D (fosfodiesterasas según IUPAC, de la familia de las SicTox) es la común en estas especies, como se observa en el cuadro resumen en el Anexo (Tabla suplementaria 1), en donde las toxinas mayormente descritas son hialuronidasas de gran peso molecular, metaloproteasas y péptidos insecticidas (Futrell *et al.* 1992; Chaim *et al.* 2011; Lojoie *et al.* 2015). Se llevaron a cabo inicialmente estudios con la toxina purificada Fosfolipasa-D, obteniéndose que por sí sola es capaz de generar varios de los síntomas del cuadro de Loxoscelismo, induciendo dermonecrosis, agregación plaquetaria y hemólisis (Futrell *et al.* 1992), fue entonces cuando el interés de estudiar esta toxina fue en aumento.

Toxinas del género Loxosceles y vía metabólica de Fosfolipasa-D

Hoy en día no se han estudiado la totalidad de las toxinas (proteínas y péptidos) que componen el veneno del género *Loxosceles*, en especial los que tienen menor peso molecular. Tales como componentes neurotóxicos, péptidos no neurotóxicos, poliaminas, etc. han sido pobremente investigados (Chaim *et al.* 2011). También se ha definido que de este veneno existen toxinas que tienen una considerable diversidad de isoformas lo que les confiere una amplia gama de acción. Un ejemplo claro es lo que ocurre en la familia de genes que generan la toxina Fosfolipasa-D, la cual ha podido ser mejor caracterizada debido a que se logró clonar y expresar ADN_C de una toxina de *Loxosceles*, en la que se expresó una Fosfolipasa-D obtenida a partir de una biblioteca de ADN_C de glándulas de veneno de *L. laeta* (Fernandes-Pedrosa *et al.* 2002). Hasta la fecha se conoce como la familia de genes “SicTox” la familia que comprende los genes que codifican a una amplia diversidad de isoformas de la toxina Fosfolipasa-D, los que tienen niveles variables de actividad sobre diferentes sustratos lipídicos como se puede observar en la imagen (Fig. 6) (Bingfor *et al.* 2009). Hasta el

momento los científicos han consensuado clasificar las toxinas en base a dos clases; la I (sólo tienen un enlace disulfuro intracadena y un loop hidrófobo extendido) y II (tienen un enlace disulfuro adicional asociado a un segundo loop flexible). La toxina tipo II hoy en día es la más estudiada ya que se subdivide en las toxinas de clado II (α), los cuales son abundantes en arañas de la familia Loxosceles con una alta actividad de la enzima hidrolizando esfingomielina, e induciendo Loxoscelismo en modelos animales. Mientras, las del subclado I (β) tienen una actividad baja o nula sobre esfingomielina, estando en Loxosceles en menor cantidad y mayormente en Sicarius (da Silveira *et al.* 2006; de Santi Ferrara *et al.* 2009). Lo anterior, por tanto, demuestra que la vía de acción de las toxinas que componen el veneno de una araña es muy amplia y de trabajo sinérgico, probablemente.

Es sabido que la vía metabólica de reacción de Fosfolipasa-D en insectos es mucho más directa y rápida que la vía que está relacionada con organismos superiores como mamíferos. Esta situación ha permitido que la supervivencia de las especies implicadas aumente, en base a la eficacia del veneno para la predación (Wood *et al.* 2009; Chaim *et al.* 2011). Esto también demuestra que la función principal del veneno es probablemente para la inmovilización de artrópodos, y secundariamente para sobrevivencia contra otros organismos superiores en caso de ser necesario (Zobel *et al.* 2012), pero, esto llevó a querer analizar la vía metabólica involucrada en mamíferos en especial el de la Fosfolipasa-D.

Fosfolipasa-D es una fosfodiesterasa, es decir, una enzima que cataliza la escisión de esfingolípidos y lisolípidos rompiendo el enlace fosfodiéster, lo que se resume en romper fosfatos cíclicos activando un nucleófilo hidroxilo presente en ambas clases de lípidos (Lajoie *et al.* 2015). Futrell inicialmente definió que en mamíferos esta toxina actúa sobre un esfingolípido estructural que está presente en la mayoría de las membranas de las células llamada esfingomielina, formando como metabolito colina y fosfato de acilesfingosina, los que, de hecho, son similares a los productos de reacción endógena por enzimas esfingomielinasas que hay presente en mamíferos, los cuales son acilesfingosina y fosfato colina (Futrell *et al.* 1992). Sin embargo, años más tarde Lee y Lynch demostraron que escinde este sustrato, pero también otro llamado lisofosfatidilcolina (LPC) dando hincapié a que los productos de reacción no son los mencionados por Futrell (van Meeteren *et al.* 2004;

Lee and Lynch *et al.* 2005). Recientemente, Lajoie estudió un mapeo de las isoformas de esta familia SicTox donde existen más posibles sustratos que esfingolípidos, como los lisolipídicos que están asociados a la formación de metabolitos neutros como glicerol y serina, que de hecho se asocian a las toxinas tipo II (β) de baja o nula acción sobre esfingomielina y sobre los síntomas de Loxoscelismo (Lajoie *et al.* 2015). Es por lo anterior que resulta interesante que un veneno en específico contenga una amplia variedad de toxinas que escinden distintos sustratos lipídicos simultáneamente, lo que podría explicar el porqué es tan potente y complejo el efecto en organismos superiores.

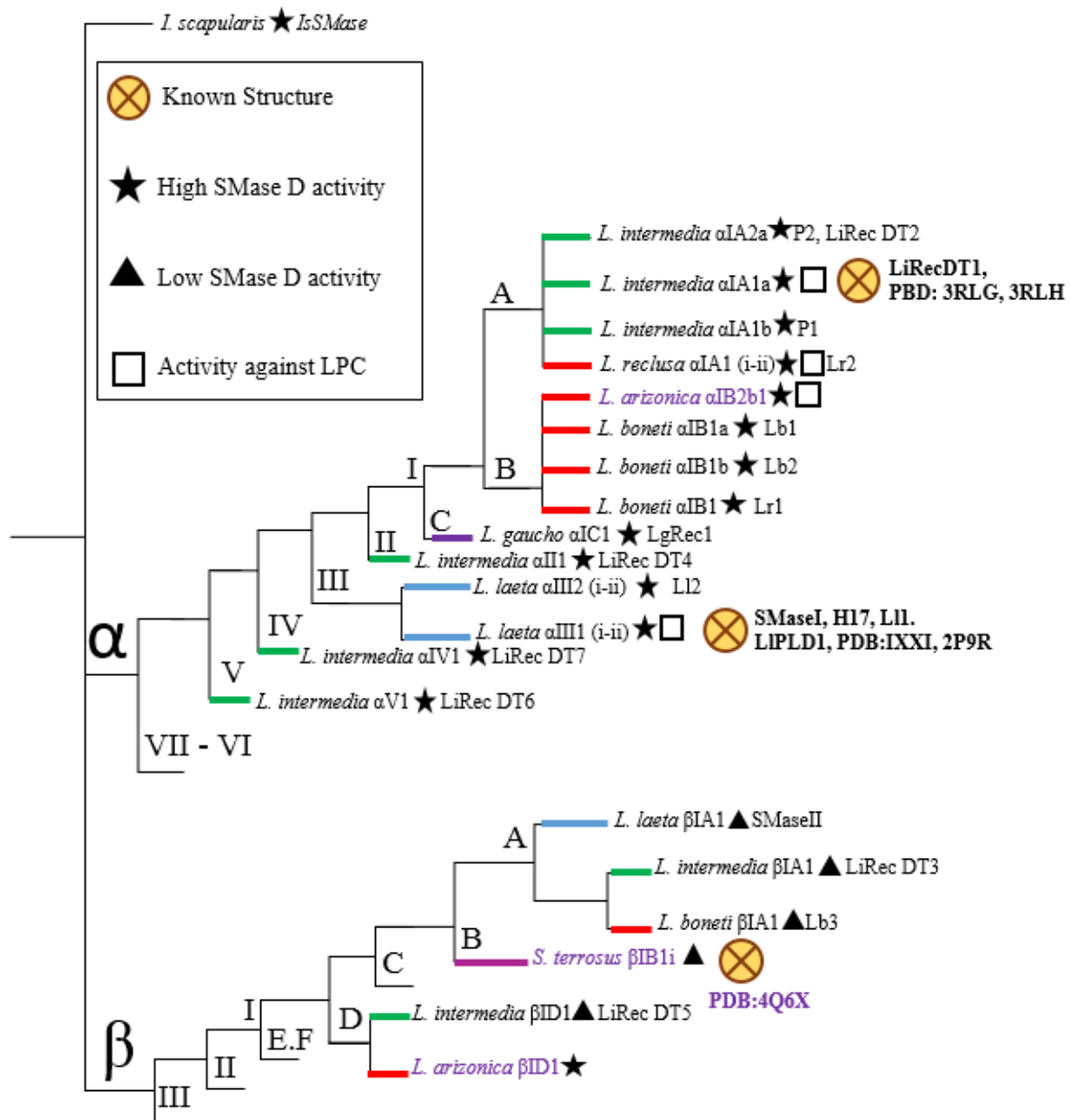


Fig. 6. Esquema adaptado de la preferencia de sustrato de la toxina Fosfolipasa-D de arañas. Cladograma simplificado de productos de genes *SicTox* que han sido caracterizados bioquímicamente (Lajoie et al. 2015).

El sustrato más estudiado es la esfingomielina porque es un esfingolípido que está presente en la cara del foliolo externo de la membrana plasmática de las células en un porcentaje importante, teniendo un papel estructural y funcional (Ballou *et al.* 1996). Los tres productos principales de la actividad enzimática son ceramida-1-fosfato (**C1F**), colina y etanolamina, dependiendo de la composición del esfingolípido, ya que, este tiene un núcleo ceramida y un grupo principal polar, que puede ser fosfocolina o fosfoetanolamina. Colina es un metabolito considerado biológicamente inerte, mientras C1F y etanolamina son activos. Se ha demostrado que etanolamina está asociado mayormente a la vía involucrada en insectos en donde Fosfolipasa-D escinde mayormente este metabolito (Vacaru *et al.* 2013), mientras se ha demostrado que C1F en mamíferos estimula potentemente la proliferación celular (Sales *et al.* 2008), muerte celular en bloque, induce migración celular (da Silveira *et al.* 2007) y promueve la inflamación (Veiga and da Silveira *et al.*, 2000; Rivera *et al.* 2015). Por otra parte, Fosfolipasa-D también puede hidrolizar lisofosfatidilcolina (LPC), liberando ácido lisofosfatídico (**LPA**) y colina (van Dijk *et al.* 1998; Veiga *et al.* 2000). Se descubrió en cultivos de fibroblastos quiescentes de rata (Rat-1) que Fosfolipasa-D de *Streptomyces chromofuscus* generó LPA bioactivo a partir de LPC, lo que resultó en la activación de receptores de LPA acoplados a proteína G y posterior activación de la señalización Ras, Rho y vías de señalización de Ca²⁺ (van Dijk *et al.* 1998). Más tarde, se confirmó lo anterior mediante la administración de veneno de *L. laeta* con una línea celular de riñón umbilical humano (HEK293), aquí al agregar veneno en un medio con albúmina se observó que los receptores de LPA se internalizaban al núcleo, lo que demostró indirectamente que debía haber un aumento de LPA en el medio; esto lo observaron con mayor velocidad de reacción al suministrar LPA al medio, dando fomento al estudio (Meeteren *et al.* 2004). En 2005, por otro lado, se demostró de forma directa que el veneno de la especie *L. reclusa* escinde tanto esfingomielina como LPC produciendo colina y LPA (Lee *et al.* 2005) (Fig. 7).

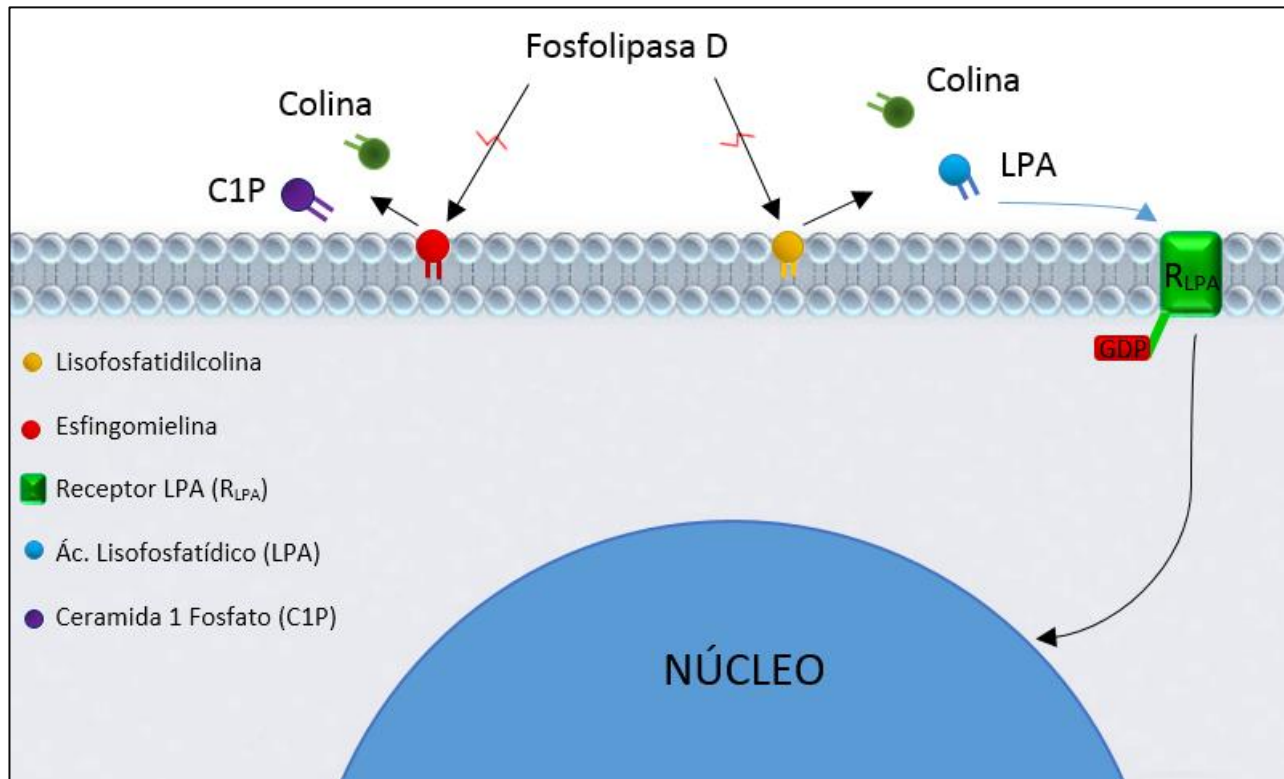


Fig. 7. Vía metabólica de acción de Fosfolipasa-D tipo I utilizando como sustrato Lisofosfatidilcolina (LPC) y esfingomielina (SM). Fosfolipasa-D actúa sobre esfingomielina formando dos metabolitos colina y ceramida-1-fosfato (C1F). Por otro lado, puede escindir lisofosfatidilcolina (LPC) formando colina y ácido lisofosfatídico (LPA), esta vía no ocurre de no estar asociado este esfingolípido con albúmina (torrente sanguíneo), por lo que la proporción en que se escinden ambos tipos de esfingolípidos no es muy clara. Está descrito que LPA se une a un receptor acoplado a proteína G de LPA, el cual, se desacopla al haber niveles altos de LPA internalizándose al núcleo. Ambas vías están asociadas a gatillar respuesta inflamatoria mediada mayormente por citosinas/quimiocinas y algunos lípidos (PG2) lo que se ha estudiado en animales a los que se les ha inoculado el veneno y cultivos celulares. C1F está asociada a la activación de iNOS y la producción de NO que genera una respuesta pro-inflamatoria (Modificado por, de van Dijk et al. 1998; Veiga et al. 2000; Domingos et al. 2003; Meeteren et al. 2004; Lee et al. 2005; Lee and Lynch et al. 2005; Gangoiti et al. 2008; Vacaru et al. 2013; Lajoie et al. 2015)

Es importante tomar en consideración que LPA es un mediador lipídico; es crucial como factor de crecimiento pleiotrópico que puede inducir diversos efectos en el organismo generando patologías fisiológicas, tales como, agregación plaquetaria, quimiotaxis, inflamación, secreción de citoquinas y quimioquinas, producción tumoral, entre otros (Veiga *et al.* 2001). Sin embargo, resulta interesante cuando se considera que el veneno puede estar produciendo tanto LPA como C1F, ambos asociados a respuesta inflamatoria.

Está bien descrito que el veneno de araña de rincón genera un cuadro necrótico e inflamatorio en conejillos de indias, conejos y humanos, pero en ratones y ratas no. Fue este hecho lo que llevo a analizar este modelo, dando cuenta que la esfingomielina de ratas y ratones posee una cadena de ácido graso que no está presente en humanos, además, de que la cantidad del esfingolípido no es similar a la que hay en conejos y humanos (Barbaro *et al.* 1996; Bettger *et al.* 1998). Domingos por esta razón hizo un estudio en ratón y determinó que al inocular veneno de *L. gaucho* intradermal adicionando esfingomielina exógena se genera una respuesta inflamatoria que dura días y que permitió la sobrevivencia del animal, en cambio al no adicionarlo la respuesta inflamatoria es muy baja y hay muerte del animal a las 24 horas (Domingos *et al.* 2003). Este dato resulta sustancial para comprender que la esfingomielina es probablemente el lípido hidrolizado precursor de la formación de la necrosis y de una inflamación bastante más aguda que la generada por LPA por sí sola.

Existen de igual modo, estudios que asocian la respuesta inflamatoria y de regulación de la sobrevivencia celular a una enzima activada por C1F, la cual se llama óxido nítrico sintasa inducible (NOS II o iNOS). Esta enzima es la encargada de la liberación de óxido nítrico solo en circunstancias que activen esta acción, tales como, endotoxinas o citoquinas. Óxido nítrico es un gas que actúa como un metabolito activo que se ha implicado en varias vías como en la regulación de varias funciones fisiológicas y patológicas. Además, se cree que probablemente está asociado a favorecer la viabilidad celular o inducir muerte apoptótica, lo que depende de la célula o cantidad de NO producido en ella. (Kroncke *et al.* 2001; Perrota *et al.* 2005). Un estudio llevado a cabo en macrófagos demostró que al utilizar esfingomielinasa endógena se gatilla la producción de C1F a partir de esfingomielina, y, a su vez, la activación de iNOS y liberación de NO, la que resultó activar alguna vía anti-

apoptótica y pro-inflamatoria en el cultivo, por lo que se hipotetizó que la regulación positiva de iNOS está implicada en el mecanismo por el que C1F bloquea la muerte celular (Gangoiti *et al.* 2008).

Hasta la fecha, existen varias teorías de cómo podría generarse el cuadro a partir de una mordedura siendo, en algunos casos, relacionado con la respuesta inmune. En general, ninguna explica en totalidad la aparición de los síntomas que se agravan al paso de las horas. Sin embargo, se ha demostrado que el veneno de la araña de rincón no afecta directamente a los neutrófilos, que son leucocitos que se activan en la respuesta inmune, pero de igual modo depende de ellos. Es por ello que se piensa que, de algún modo, activa el complemento por una vía indirecta que finalmente afectará la activación de los neutrófilos, y, por ende, su migración y acumulación en el sitio de entrada del veneno, lo que se piensa está asociado a la formación de C1F y LPA (Patel *et al.* 1994).

Debido a que el veneno posee tantas toxinas, se sabe que la reacción que tiene en distintos tipos celulares es variada. Por ejemplo, en eritrocitos, la Fosfolipasa-D escinde esfingomielina y lisofosfatidilcolina, entre otras posibilidades generando productos bioactivos que estimulan la afluencia de calcio en los glóbulos rojos, mediada por canales tipo L (Chaves-Moreira *et al.* 2011). En células de la aorta torácica endotelial de conejos suministrando veneno de *L. intermedia* se demostró que se induce un proceso de anoikis, ya que hay pérdida del anclaje celular (Nowatzki *et al.* 2012); en queratinocitos humanos se demostró que veneno de *Loxosceles* induce apoptosis, en donde se asocia al aumento de expresión de metaloproteinasas-2- y -9. A partir de esto, otro estudio que encontró el mismo fenómeno en queratinocitos de conejo, trataron a estos con tetraciclina, la cual reduce la expresión de la metaloproteinasa-2 y así se previene la inducción de la metaloproteinasa-9; ellos observaron una disminución de las lesiones necróticas (Paixão-Cavalcante *et al.* 2007). Por otro lado, para fines de este trabajo Arthur Dantas y colaboradores, trabajaron con un cultivo primario de fibroblastos humanos sometidos a veneno de la especie *Loxosceles similis*. En su estudio determinaron que el cultivo primario expuesto a veneno muere por apoptosis, activada por caspasa-3,-6,-7 y -9, además de observarse inflamación celular. En este trabajo también se demostró, que el veneno de *L. similis* no genera efecto alguno sobre

líneas celulares como SK-HEP-1 (línea celular de adenocarcinoma hepático en humano), Vero (línea de células epiteliales de riñón aisladas del Mono Verde Africano) y MEF (células embrionarias de ratón) (Dantas *et al.* 2014).

Para efectos del estudio se pretende adaptar un protocolo de extracción de veneno de la especie *Loxosceles laeta*, su almacenamiento y utilización en un cultivo primario para determinar su posible efecto y, con ello, la concentración mínima que causaría un efecto nocivo en las células. Para esto, se utilizaron fibroblastos humanos, un cultivo ideal para el estudio del efecto del veneno según los estudios hechos por Arthur Dantas, con el fin de demostrar si el mismo tipo de cultivo muere por la misma vía, apoptosis con veneno de *Loxosceles laeta* (Dantas *et al.* 2014).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La araña de rincón es la especie más venenosa de Chile, y en comparación a su tamaño y cantidad de veneno que inyecta una de las arañas más venenosas del mundo. La incidencia de mordeduras de arañas de rincón no es un tema aislado en el mundo, y, aunque los casos que generan Loxoscelismo sistémicos son pocos, existen. Hasta el momento la vía de acción del veneno no es muy comprendida, estudiándose tanto en modelos animales envenenados, o bien, en modelos celulares para determinar en cuales causa un efecto. Hasta la fecha, se sabe que la toxina más implicada por causar el cuadro a nivel sistémico por sí sólo, es la enzima Fosfolipasa-D, la cual escinde sustratos lipídicos, siendo mayormente lisofosfatidilcolina y esfingomielina, lípidos que se encuentran mayormente en la membrana de las células de los mamíferos. Hasta la fecha se conoce que estos dos metabolitos tienen mayormente un rol en la respuesta inflamatoria, activando distintos mediadores dependientes del tipo celular estudiado. Sin embargo, lo que resulta interesante es que las células sometidas al veneno en todos los casos mueren, por lo que es sustancial comprender los mecanismos que están ligados a esta cascada en específico. Es por esto, que se cree que son otros los blancos de esta enzima Fosfolipasa-D u de otras enzimas que están en el veneno las implicadas en la activación de la cascada de muerte celular. Por otro lado, resulta sustancial entender la respuesta inflamatoria en cuanto a que sustancias están implicadas ya que hasta el momento los venenos estudiados del género *Loxosceles* son pocos, en especial la especie *L. laeta*. En fibroblastos humanos con veneno de *Loxosceles similis* se ha podido determinar que mueren por apoptosis, sin embargo, no se comprende cómo se activa esta vía ya sea por un componente o un grupo de ellos. Por todo lo anterior, es sustancial aportar con información de la acción del veneno a nivel celular en fibroblastos humanos como modelo de estudio de envenenamiento, en especial verificar si la acción del veneno de *L. laeta* activa la misma vía de muerte registrada en el mismo tipo celular. La finalidad de aportar con esta información es para que en el futuro se entienda el mecanismo de acción de este a nivel celular y finalmente a nivel sistémico, y así generar una cura sustentable en la población y en el mundo, ya que, hoy no existe un protocolo de acción en contra de este en ninguno de los casos presentados de forma eficiente por la no comprensión de los blancos de todas las toxinas implicadas.

HIPÓTESIS

Muestras de veneno de *Loxosceles laeta* generarán muerte celular por apoptosis de manera dosis-dependiente en cultivos primarios de fibroblastos humanos.

OBJETIVOS GENERALES

- Adaptar un protocolo estándar para la extracción y almacenamiento de veneno de la araña *L. laeta*.
- Comprender el modo de acción del veneno de *L. laeta* en fibroblastos humanos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Definir la concentración mínima de veneno suministrado en fibroblastos humanos que puede causar un cambio morfológico a las células a las 24 horas hasta causar apoptosis a partir de captura de fotos.
- Determinar la concentración de los stocks para definir cantidad aproximada de proteínas en las placas de cultivo usando un fluorómetro.
- Determinar EC₅₀ en ensayos con fibroblastos humanos a distintas concentraciones.
- Determinar el modo de muerte celular causado por el veneno de *L. laeta* en fibroblastos humanos.

1) Protocolo de extracción de veneno en *Loxosceles laeta*

Se adaptaron tres protocolos descritos para araña Viuda negra y *Loxosceles* respectivamente (Barbaro *et al.* 1992; Feitosa *et al.* 1998; Garb *et al.* 2014).

a) Recolección de arañas y su almacenamiento

- Las arañas fueron obtenidas de manera aleatoria por petición en el entorno universitario y en inspecciones a casas.
- Todas las arañas usadas en el protocolo fueron hembras de tamaño mediano-grande (de Oliveira *et al.* 2005). Se consideraron arañas adultas las que midieron alrededor de 1-1,5 cm del cuerpo, llegando a alcanzar el largo de 4,5 cm con patas extendidas; las cuales han pasado por 9-10 mudas (Canals *et al.* 2014).
- Se adaptaron contenedores aptos para el almacenamiento con orificios para entrada de aire en las tapas. Además, se modificaron agregando recipientes con agua y marcando a cada espécimen con un código, el cual fue agregado a una base de datos Excel. En la base de datos se marcó nombre, tamaño y fecha de uso. Los recipientes se encuentran en un bioterio en donde la temperatura es aproximadamente constante de 20 °C y mayoritariamente en oscuridad y humedad constante.
- La alimentación fue esporádica, siendo ocasionalmente con larvas de lepidóptero y pequeños coleópteros.

b) Electroestimulador

- Se instaló un electroestimulador (Grass s6 stimulator s6c) y se marcaron los siguientes parámetros:

Frecuencia: 18,8 pulsos/segundo

Duración: 20 milisegundos

Voltaje: 10 voltios

El electrodo de salida está conectado a la jeringa de estimulación y el de entrada a la pinza. Además, se conectó en la salida del electroestimulador a un osciloscopio (Hameg HM 512).

c) Manipulación de la araña

- El área de trabajo consta de una lupa estereoscópica, a la que se le incorporó un iluminador de fibra óptica.
- Se instaló un manipulador sobre un soporte, unido a un holder. A este se le agregó una pinza invertida unida a una prensa para regular la abertura. Esta a su vez está conectada a un electrodo.
- En el manipulador se agregó un imán para sostener una punta de jeringa de 1,0 mL de registro conectada a una bomba de acuario con una sonda, a la cual se le invirtió la presión para que fuera de vacío.

d) Capilares

- Se preparó un set de capilares en un Puller vertical (Narishige Scientific 1754-6).

e) Cámara de gas

- Se adaptó una cámara (Nalgene) que contiene un filtro de 0,2 μm PES, la que fue sellada herméticamente con látex. Esta cámara tiene una boquilla para conectarlo a una manguera y esto a su vez a un regulador de CO_2 y a un cilindro de CO_2 (Air liquide).

Extracción

La araña se colocó en la cámara de CO_2 y se expuso a este gas durante 2 minutos y medio. Mientras tanto, se depositaron sobre una cámara de hielo tubos eppendorf con 50 μL de Buffer Fosfato Salino (PBS) (rotulados con fecha) y también se agregó en la pinza de registro gel de electrodos. Transcurrido el tiempo, se fijó la araña en la pinza dejando visible la parte ventral del cefalotórax de esta, lo que se ejemplifica en la imagen (Fig. 8). Se limpió la zona bucal donde se encuentran los quelíceros y labios para eliminar residuos, luego se

estimuló en la zona interna bucal donde se encuentran las glándulas del veneno lo que es especificado anatómicamente en (Foelix, 2011) y en la imagen (Fig. 8). En paralelo se almacenaron las gotas de veneno que fueron expulsadas con un microcapilar (las arañas en general regurgitaron en el proceso, por lo que aquellas muestras contaminadas con este líquido se desecharon). El veneno se almacenó en los tubos eppendorf en un congelador a -36°C. La araña fue de vuelta a su recipiente y monitoreada por 24 horas.



Fig. 8. A la izquierda, araña siendo estimulada con la punta de jeringa y con la mano izquierda se sostiene un microcapilar para la recolección de veneno. A la derecha, una araña inmovilizada en la zona ventral mostrando con la flecha el sitio a estimular en quelíceros.

2) Aislamiento y cultivo de fibroblastos dérmicos

Se adaptó el procedimiento descrito por Hager y colaboradores (Hager *et al.* 1999). Los fibroblastos dérmicos humanos fueron aislados de muestras de piel de prepucios de donantes sanos (<12 años), bajo consentimiento informado. Las muestras de piel fueron lavadas a lo menos cinco veces con una solución que contenía PBS 1X suplementado con antibióticos (penicilina 100 unds/mL y estreptomycin 100 µg/mL, HyClone). Se realizó una disgregación de la piel en una placa de vidrio estéril de 100 mm, para facilitar las sucesivas digestiones con colagenasa II (3 mg/ml, Worthington) se dejó incubando por 1,5 horas.

Luego de las 1,5 horas, el producto de las digestiones enzimáticas se transfirió a una placa de cultivo de vidrio estéril de 100 mm, posteriormente, se cambió el medio por DMEM-F12 suplementado con 10% de SBF, los fibroblastos se dejaron proliferar durante 24 horas en un ambiente controlado a 37°C, en una atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de humedad. Todos los experimentos se hicieron durante 24 horas.

3) Cultivos para ensayos con veneno

Los fibroblastos que se encontraban a una confluencia del 100% fueron tripsinizados con 1,5 mL de Tripsin-EDTA 1X (HyClone). Se cultivaron en placas de 24 (12 mm), se mantuvieron en medio DMEM-F12 (al 10% SBF) y se cultivaron en un ambiente controlado a 37 °C, en una atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de humedad. Posteriormente, se dejaron proliferar los fibroblastos durante 24 horas hasta que se alcanza el 60-70% de confluencia. Transcurrido el tiempo, se extrajo el medio y fue reemplazado por el medio de registro F-12 [HAM] mezcla nutricia (Biological industries 01-095-1A) al que se le agregó suero al 10% en cada pocillo. Las condiciones a considerar fueron de 4, 8 y 24 horas de exposición al veneno más un control.

4) Cultivos para ensayo de curva dosis respuesta

Se realizó un cultivo con una cantidad aproximada de 11000 células. Para ello se siguió el protocolo de subcultivo anterior, con la diferencia de que se resuspendieron las células en tres mL de medio HAM-12. Luego en un tubo eppendorf se mezclaron 40 µL de este líquido más 40 µL de azul de tripan. De este, se tomaron 20 µL y se depositaron en una cámara de Neubauer para hacer conteo de células por campo en un microscopio invertido, en donde se contabilizan sólo las células que tienen la membrana azul en los cuadrantes más grandes como se puede observar en la imagen (Fig. 9). Finalmente, se promedia el número de células por campo y se calcula la concentración de células en 3 mL de medio (1). Posterior a esto, se calcula el volumen necesario final a usar considerando que se utilizan 200 µL por pocillo. Luego se calcula la cantidad de volumen del medio que debe depositarse en cada pocillo para que crezcan 11000 células.

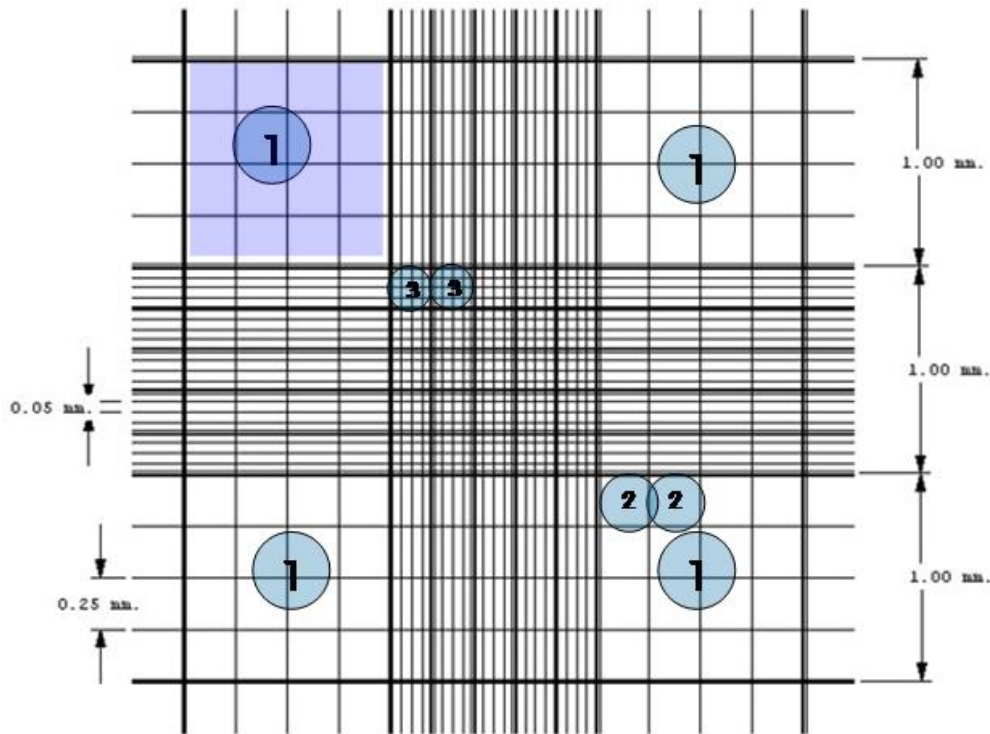


Fig. 9. Cuadrantes de la cámara de Neubauer, el conteo de fibroblastos se realiza en los cuadrantes que tienen el número 1, que corresponde a un cuadrado de 1 mm². No se cuentan aquellas células que están sobre las líneas engrosadas.

$$[\] \text{ células} = 11000 * \left(\frac{\sum x}{4} \right) * 2$$

[] células= cantidad de células en 3 mL.

$\frac{\sum x}{4}$ = promedio de número de células en los cuatro campos.

(1) Ecuación para determinar concentración de células en 3 mL de medio.

5) Medición de concentración de proteínas con fluorómetro

Se utilizó un Kit llamado Qubit protein assay (Molecular probes, Q33211). Este kit se utilizó en las muestras de veneno, lo que fue medido en un fluorómetro Qubit™ (Molecular probes- invitrogen), el cual puede medir ácidos nucleicos y proteínas.

El fluorómetro Qubit utiliza colorantes fluorescentes para determinar la concentración de las moléculas de interés. Permite medir ácidos nucleicos y proteínas por medio de la

discriminación del colorante unido v/s el colorante libre, ya que, la fluorescencia del colorante en el medio acuoso, en relación al unido a la molécula es considerablemente bajo dando sustento a la medición.

La peculiaridad de este aparato es que, a una cantidad de colorante conocida, la intensidad de fluorescencia es directamente proporcional a la concentración de proteínas en la mezcla. El aparato convierte esta señal en concentración de proteínas basándose en valores estándares conocidos. Qubit al terminar la medición arroja un número que corresponde a un valor llamado QF, este valor según la ecuación del manual del fluorómetro (2) permite determinar la concentración de proteínas en la muestra en $\mu\text{g/mL}$.

$$QFvalue * \frac{200}{x} = \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$$

QF value= Valor que arroja fluorómetro.
x= μL de muestra (5 μL en este caso).

(2) Ecuación para determinar concentración de proteínas en Fluorómetro.

El procedimiento está detallado en la siguiente imagen (Fig. 10).

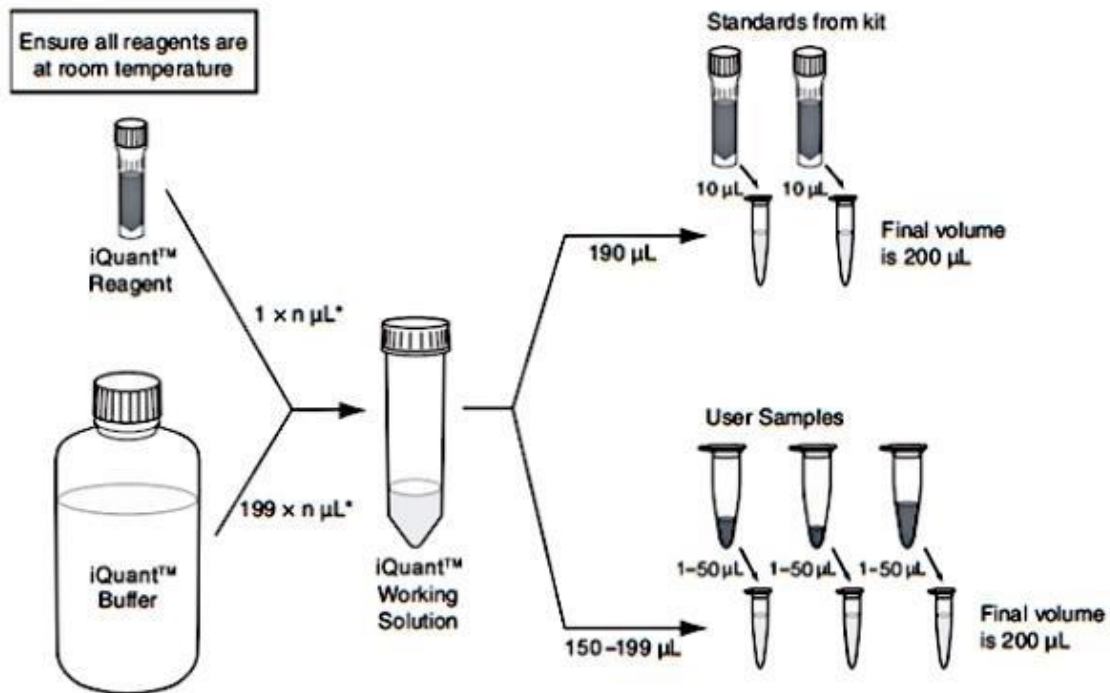


Fig. 10. Ensayo de medición de proteínas con un kit en Fluorómetro Qubit (2007 Invitrogen Corporation).

6) Ensayo de curva dosis respuesta a exposición a veneno

Se usó la concentración efectiva media máxima (EC_{50}), la cual se utiliza para efectos de una curva de dosis respuesta en toxicología. Para este caso, se utilizaron distintas concentraciones de un mismo stock de veneno para una curva en específico, en los rangos de tiempo de 0, 4, 8 y 24 horas de suministrar el veneno, incluyendo un control sin este. En estos rangos se hicieron capturas de fotos en todo el cultivo con el microscopio invertido (Nikon Eclipse TE200-U) promediando al menos 6 campos con el objetivo 10X más una magnificación de 1X.

7) Cuantificación del efecto del veneno

- *Toma de fotos*

Para cuantificar el efecto del veneno se sacaron fotos en dos campos del cubre-objeto en los horarios mencionados de 0, 4, 8 y 24 horas de exposición a cada concentración más los controles.

- *Análisis de imagen*

Luego se utilizó el plugin “Cell counter” del programa Fiji de imageJ para realizar el conteo de células vivas en cuanto a su morfología. Con ello, se graficaron los $-\log$ de las concentraciones v/s el porcentaje de células viables en el tiempo. Para este caso, el EC_{50} es la concentración ideal cuando el 50% de las células mueren al paso de las 24 horas.

8) Protocolo de inmunocitoquímica

- Se aislaron los cubreobjetos de cada condición y se traspasaron a un nuevo multipocillo. En él se hicieron tres lavados con PBS 1X.
- Se retiró el PBS y se le agregó el fijador paraformaldehído 4% (PFA) durante 30 minutos para luego lavar con PBS 1X nuevamente dos veces. En el caso de que se quisiera hacer la inmunocitoquímica inmediatamente se desecha el líquido y se prosigue el protocolo, o bien, se deja sellado con PBS a 4°C cubriendo el multipocillo con parafilm.
- Para inmunocitoquímica, el PBS 1X fue eliminado de la placa que contenía los cubreobjetos y las células fueron permeabilizadas agregando a la placa una solución de PBS 1X /1% Tritón X-100 y se dejaron a temperatura ambiente por 30 minutos.
- Transcurrido el tiempo, se eliminó la solución permeabilizadora y se colocó solución bloqueo, la que está constituida de solución permeabilizadora más 2% de Suero Normal de Cabra (SNC). Se dejó incubando a temperatura ambiente durante 30 minutos.
- Luego los cubreobjetos fueron incubados con el o los anticuerpos primarios, los que fueron diluidos en solución bloqueo. Esto se colocó en una cámara húmeda durante la noche a 4°C.

- Posterior a las horas transcurridas, los cubreobjetos fueron sacados de la cámara húmeda, y depositados nuevamente en placas de multipocillos.
- Se lavaron con solución permeabilizadora 6 veces por 5 minutos cada vez.
- Luego los cubreobjetos fueron incubados en una cámara húmeda con los anticuerpos secundarios conjugados con fluoróforos indicados en la Tabla de Anticuerpos Secundarios, por una hora a temperatura ambiente y en oscuridad.
- Una vez transcurrido el tiempo, se vuelve a lavar con solución permeabilizadora 6 veces durante 5 minutos.
- Una vez listo, se lavan portaobjetos con agua destilada y se dejan secar para luego colocar 5 μ L de medio de montaje (Dako). Sobre él se colocan los cubreobjetos con la cara de las células sobre este.
- Se deja secar a temperatura ambiente a oscuridad un par de horas y luego se almacenan a 4°C.
- Las células se observaron bajo un microscopio confocal (Nikon C1 plus), equipado con los láseres adecuados para los fluoróforos utilizados.

Tabla 1. Anticuerpos primarios utilizados.

Anticuerpos primarios	Marca	Dilución para inmunocitoquímica
Mouse anti MTCO2	Abcam	1:500
Rabbit anti iNOS	Novus Biologicals	1:50
Rabbit anti Cx43	Sigma-Aldrich	1:500
DAPI	Sigma-Aldrich	0,25 µg/ml
Faloidina	Sigma-Aldrich	0.5 µg/mL

Tabla 2. Anticuerpos secundarios utilizados.

Anticuerpos secundarios	Marca	Dilución para inmunocitoquímica	Filtro
DyLight 488—donkey anti—rabbit IgG	Jackson ImmunoResearch	1:500	Verde
Cy3—donkey anti—mouse IgG	Jackson ImmunoResearch	1:500	Rojo

RESULTADOS

1) Ensayos para curva dosis respuesta

Ensayo en fibroblastos humanos sometidos a diluciones de veneno de *Loxosceles laeta* a concentraciones de un mismo stock de 50 μL ; usándose 30 μL , 10 μL , 3 μL y control con medio de registro.

Las imágenes son representativas para los ensayos de diferentes concentraciones, en donde el promedio de ellas fue de 17,05 $\mu\text{g/mL}$, 5,68 $\mu\text{g/mL}$ y 1,71 $\mu\text{g/mL}$ (N=2).

En el ensayo con concentración más alta (Fig. 11) se observa que hay un cambio sustancial en la morfología celular, lo que se puede comenzar a notar a las 4 horas con un adelgazamiento de las células, que va en aumento a las 8 horas, y finalmente habiendo un cambio de células alargadas a ovoides o circulares a las 24 horas, en este caso como se observa en la tabla resumen (1) la concentración promedio de proteínas es de 17,05 $\mu\text{g/mL}$. En el caso de la dilución de 10 μL , (Fig. 12) se puede observar un cambio morfológico en donde se van adelgazando las células conforme al paso de las horas, aunque es algo más paulatino que en el caso anterior, hasta volverse deformes a las 24 horas, en donde la concentración promedio corresponde a 5,68 $\mu\text{g/mL}$. El caso de 3 μL , (Fig. 13) no generó cambios significativos en la morfología, resultando una concentración de proteínas finales de 1,71 $\mu\text{g/mL}$. Tanto en los casos de 30 μL como en 10 μL se observa la formación de vesículas internas y destrucción del núcleo. En estos ensayos, se observa la mantención de las células en el protocolo, habiéndose agregado suero al 10% (SBF) lo que adjudica la viabilidad del cultivo (Fig. 14).

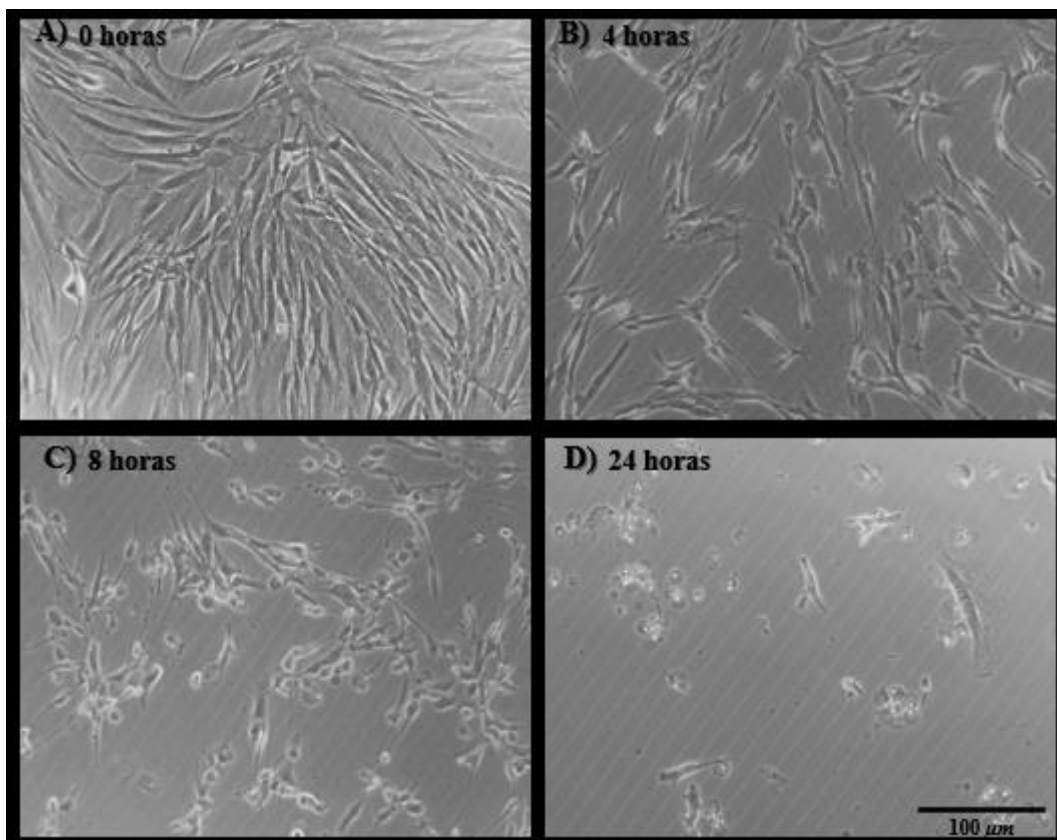


Fig. 11. Cultivo de fibroblastos humanos a las 0 (a), 4 (b), 8 (c) y 24 (d) hrs. De aplicar 17,05 $\mu\text{g/mL}$ de proteínas promedio totales.

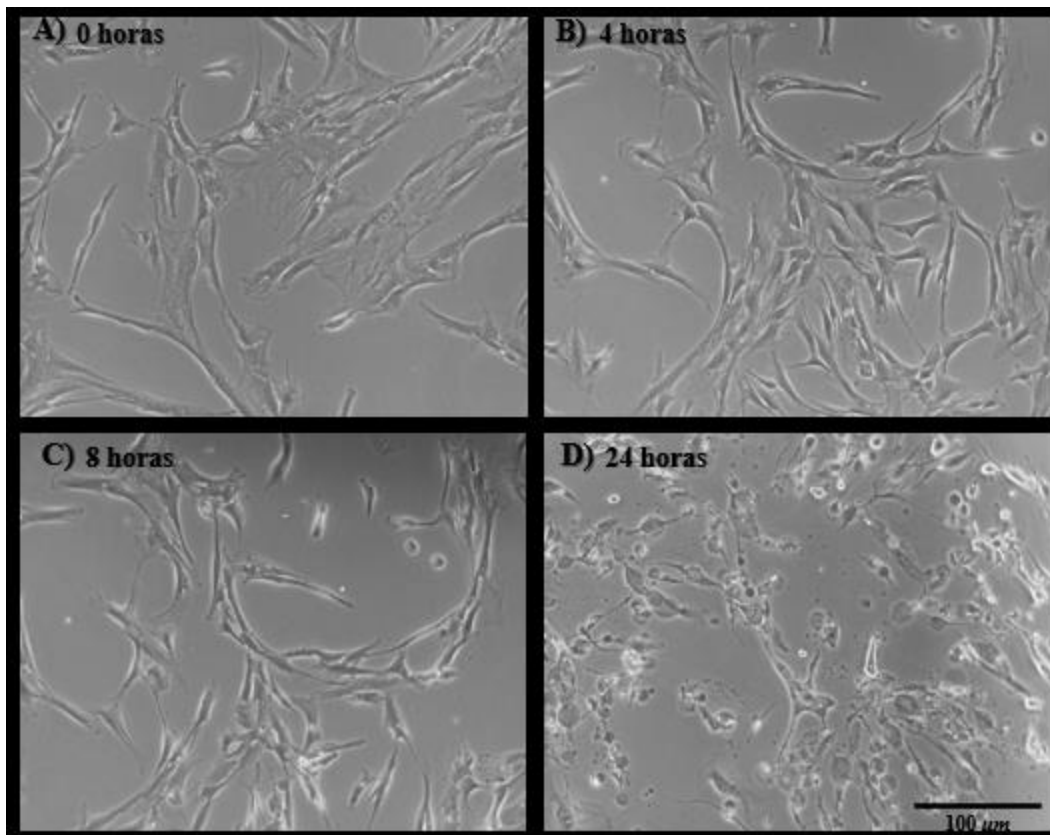


Fig. 12. Cultivo de fibroblastos humanos a las 0 (a), 4 (b), 8 (c) y 24 (d) hrs. De aplicar 5,68 $\mu\text{g/mL}$ de proteínas promedio totales.

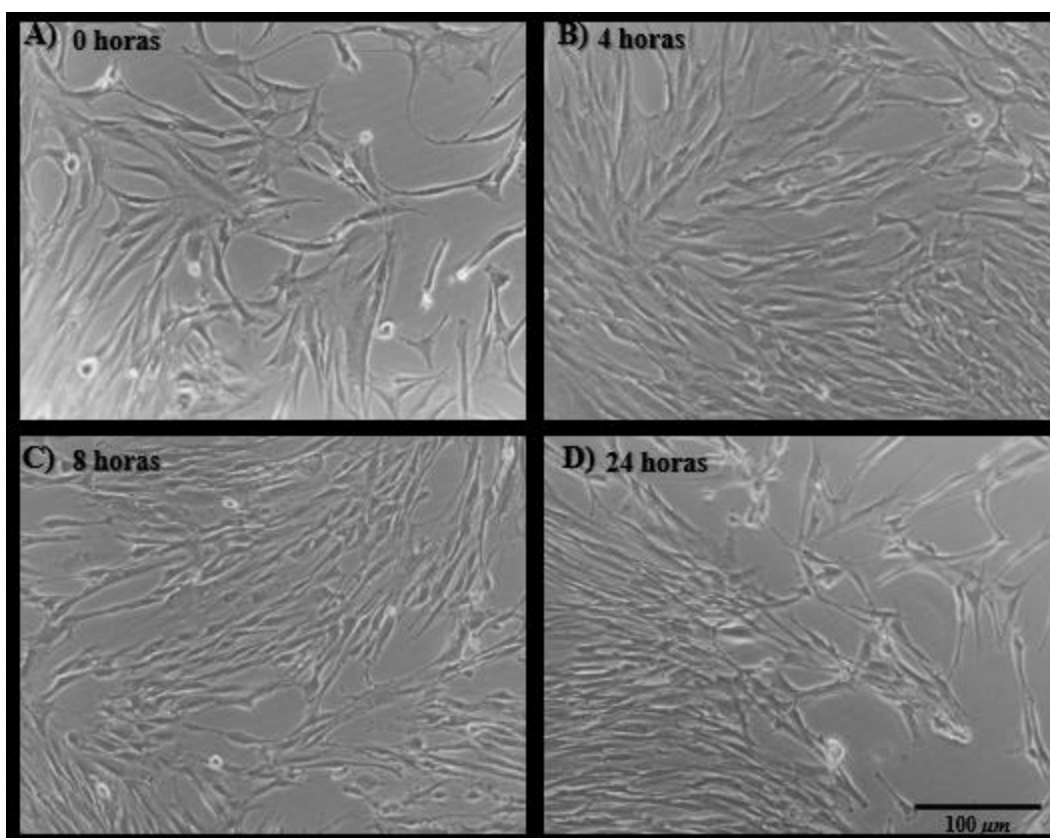


Fig. 13. Cultivo de fibroblastos humanos a las 0 (a), 4 (b), 8 (c) y 24 (d) hrs. De aplicar $1,71 \mu\text{g/mL}$ de proteínas promedio totales.

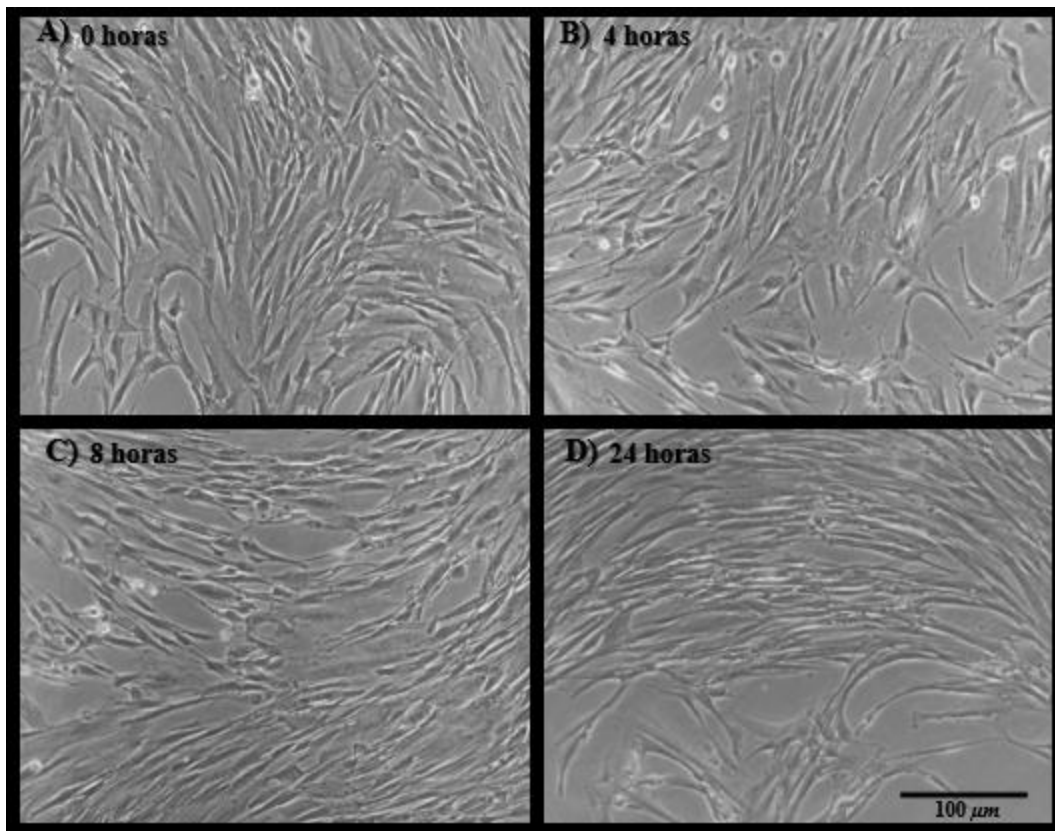


Fig. 14. Cultivo de fibroblastos humanos a las 0 (a), 4 (b), 8 (c) y 24 (d) hrs. De aplicar 200 μ L de medio de registro, correspondiendo al control.

2) Conteo de proteínas

De los 4 experimentos llevados a cabo para la curva de dosis e inmunocitoquímica se calculó la cantidad de proteínas contenidas en 5 μL en cada caso con un fluorómetro, los cálculos llevados a cabo se pueden observar en el Anexo.

QF cubit arrojó el valor de 2,27 para el ensayo 1 y 3,41 para el ensayo 2 de curva dosis. QF arrojó el valor de 1,30 y 2,45 en ensayos de inmunocitoquímica. QF es directamente proporcional a la concentración, por lo que se determinaron los valores de proteínas totales.

Los datos se pueden observar en las tablas resumen (Tabla 3 y 4).

Tabla resumen 3. Concentración de proteínas en las muestras para curva dosis respuesta.

	Dilución de stock PBS más veneno [μL]	Concentración de proteínas en 200 μL final [$\mu\text{g}/\text{mL}$]
Ensayo 1	30	13,62
	10	4,54
	3	1,36
Ensayo 2	30	20,46
	10	6,82
	3	2,05

Tabla resumen 4. Concentración de proteínas en las muestras para curva dosis respuesta.

	Dilución de stock PBS más veneno [μL]	Concentración de proteínas en 200 μL final [$\mu\text{g}/\text{mL}$]
Ensayo 1	10	2,6
Ensayo 2	10	4,9

3) Cuantificación del efecto del veneno sobre fibroblastos humanos

Finalmente, se graficó el efecto del veneno en los lapsos de tiempo de 0, 4, 8 y 24 horas, por medio del conteo de células vivas en los dos ensayos paralelos al que se les adicionó distintas concentraciones de proteínas del veneno.

En la figura **15A** se puede observar que la viabilidad celular decae progresivamente a las pocas horas, habiendo a las 24 horas un porcentaje muy bajo de células vivas. Por tanto, para efectos de los trabajos posteriores esta concentración no es la ideal ya que para medir que ocurre a nivel celular en el tiempo es necesario que la acción del veneno sea de forma progresiva y lenta y en este caso a las 4 horas, e incluso antes, ya se ve un efecto citopático en las células, lo que lo sustenta de igual manera la morfología de las células vistas en las imágenes (Fig. 11). Por otro lado, en **15B** se observa como decae el número de células vivas en el transcurso del tiempo, pero de forma más paulatina, para que a las 24 horas el porcentaje de células viables sea del 25%, lo que resultó ser la concentración más ideal para términos de los experimentos, aunque el 50% sería aún mejor para realizar una curva de dosis respuesta. Por otro lado, en **15C** se utilizó una concentración menor, y se observa que no hay una pérdida importante de células vivas después de 24 h, lo que demuestra que esta concentración es sub-letal para este tipo de células. **15D** permite dar cuenta una vez más que el medio de registro más la adición de suero al 10%, más la incubación con las condiciones mencionadas anteriormente, no tienen un efecto significativo sobre la supervivencia celular.

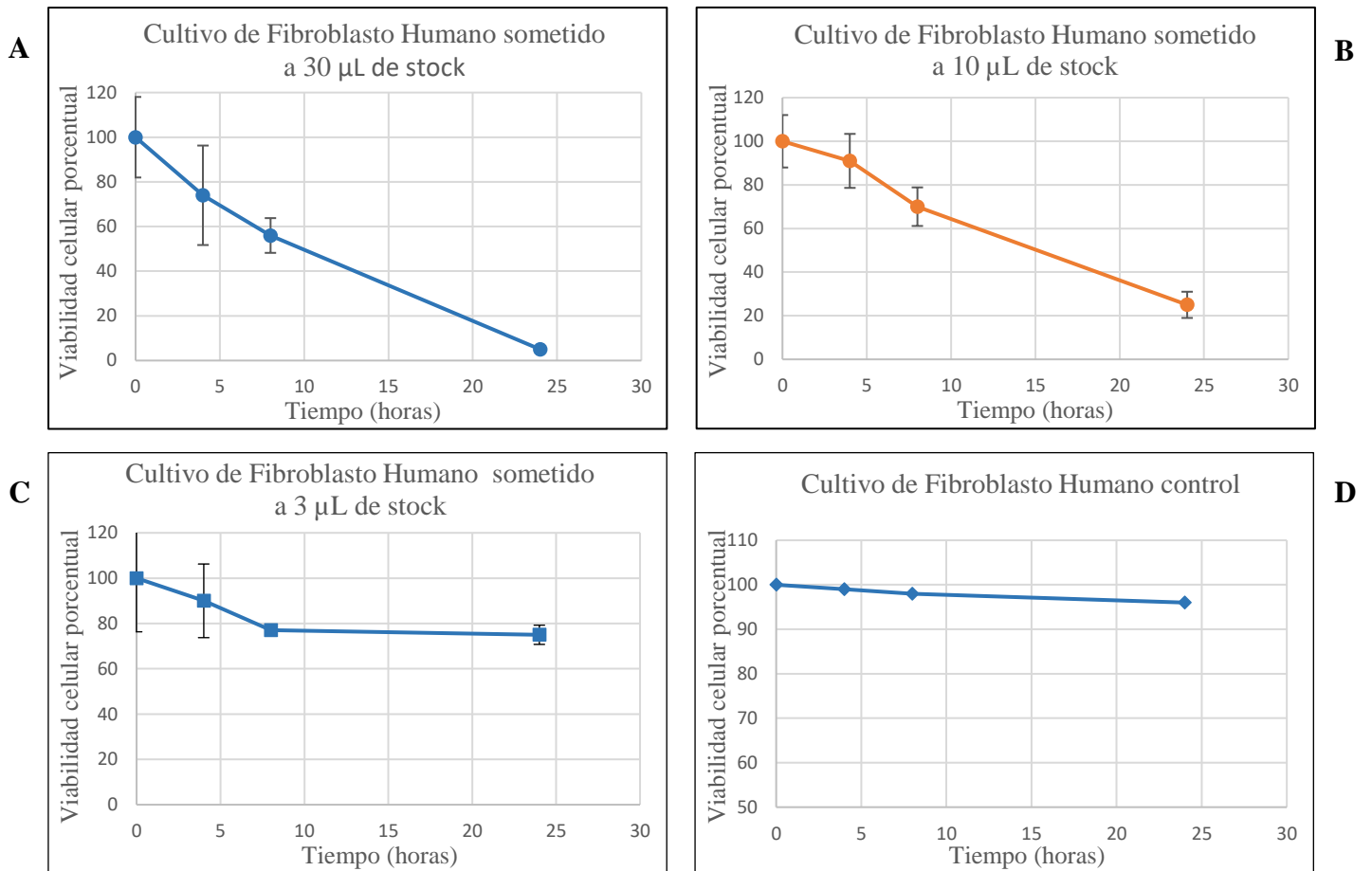


Fig. 15. Medición de viabilidad celular. *Conteo de células viables en cultivos con medio HAM-12 (SFB 10%) en el caso de control y adicionando veneno en diferentes concentraciones a una confluencia de 60-70 %. Los cultivos se mantuvieron en incubación a 37°C, 5% CO₂ y 95% humedad constante. Se utilizaron dos fotos por condición dividido en dos ensayos paralelos con stocks de veneno diferentes (N=2). A. Efecto del veneno sobre el cultivo sometido a 17,05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteínas promedio totales. B. Viabilidad celular medida en porcentaje de cultivo incubado con 5,68 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteínas promedio totales. C. Efecto del veneno sobre un cultivo al que se le adicionó 1,71 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteínas promedio totales. D. Control negativo de cultivo de fibroblasto humano sin adición de veneno.*

4) Curva de dosis respuesta en relación a los experimentos anteriores

La curva llevada a cabo en la figura mostrada a continuación (Fig. 16) muestra que el cultivo de fibroblastos humanos responde de manera dosis-dependiente en relación a una mayor a menor concentración de veneno de *Loxosceles laeta*.

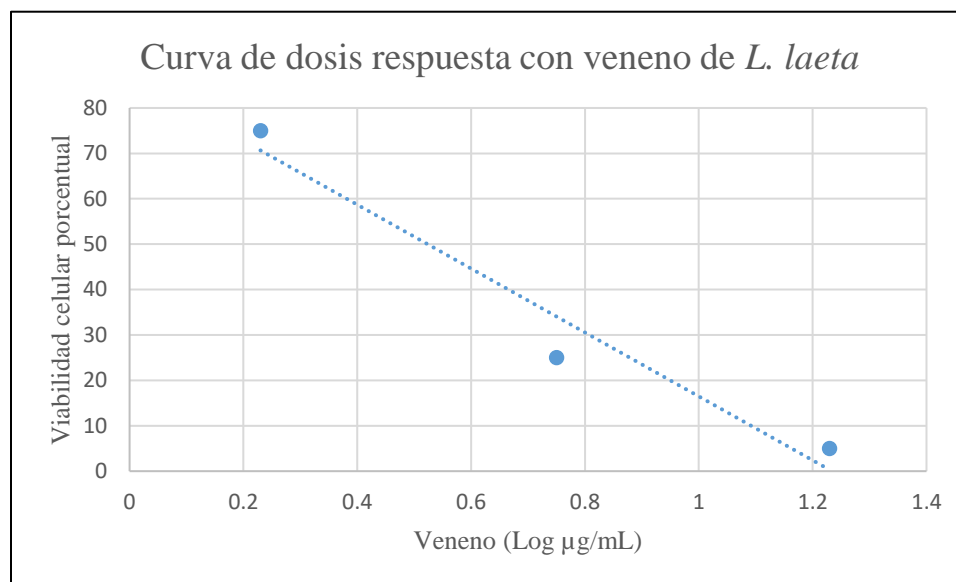


Fig. 16. Curva de dosis respuesta de dos ensayos hechos en cultivos de fibroblastos humanos sometidos a tres diferentes concentraciones de veneno promedio que fueron 1,23 (17,05 µg/mL); 0,75 (5,68 µg/mL) y 0,23 (1,71 µg/mL).

5) Inmunocitoquímica

Se realizaron dos ensayos de inmunocitoquímica para 0, 4, 8 y 24 horas de exposición a 10 μL de un stock de 50 μL de PBS con 1 μL de veneno.

En el primer caso se realizó una doble marcación con el anticuerpo MTCO2 (rojo) que permite observar las mitocondrias, y, cx43 (verde) que marca la proteína conexina 43 (Fig. 17). En este ensayo se puede observar en el caso de las mitocondrias, que su morfología típica en una célula viable es de forma alargada y en espiral desordenado, sin embargo, a las 4 horas ya se puede observar en las zonas aledañas al núcleo que la mitocondria empieza a formar agregados, a las 8 horas se ve de forma notoria como la mitocondria posee una morfología completamente distinta, siendo, de hecho, redondeada y en forma de cúmulos, para luego de 24 horas verse toda la extensión de forma redondeada y separadas unas de otras. Esta es una morfología típica de las mitocondrias fragmentadas en procesos de apoptosis, sin embargo, no es un indicio suficiente. En el control con conexina 43, por otra parte, se observa tanto la presencia de canales (conexones) que están en la extensión de la membrana en contacto con otras células, lo que se conoce como zona de aposición, como la marcación en el resto de la célula que corresponde a conexina 43 en no-aposición, normalmente en forma de hemicanal libre. A las 4 horas, se observa que la expresión de conexinas en aposición es casi nula, en relación a la de no-aposición que se observa mayormente en el núcleo, en cambio a las 8 horas se observa que hay marcación de esta en la extensión de la membrana. A las 24 horas, no hay expresión de conexina 43 en la zona de aposición mientras persiste la marcación en la zona de no-aposición.

El segundo ensayo corresponde a la doble marcación con faloidina (rojo), que marca el citoesqueleto de actina, y óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS, verde) que marca la expresión de óxido nítrico en algunos tipos de células por una vía no dependiente de calcio (Fig. 18). En el control se observa la marcación típica de faloidina que marca la extensión de la célula, mientras iNOS tiende a expresarse en la zona perinuclear reticular, en este caso, la expresión o relocalización de iNOS es fundamental ya que hay un cambio sustancial de este entre el control y las 4 horas, pasando de la zona perinuclear a ocupar el volumen de la célula.

A las 8 y 24 horas, no obstante, no se ven cambios relevantes en relación a las 4 horas. Sigue siendo llamativo que no se observe la fragmentación del núcleo, lo que sugiere que 24 horas resulta ser poco tiempo para observar muerte celular por apoptosis o necrosis.

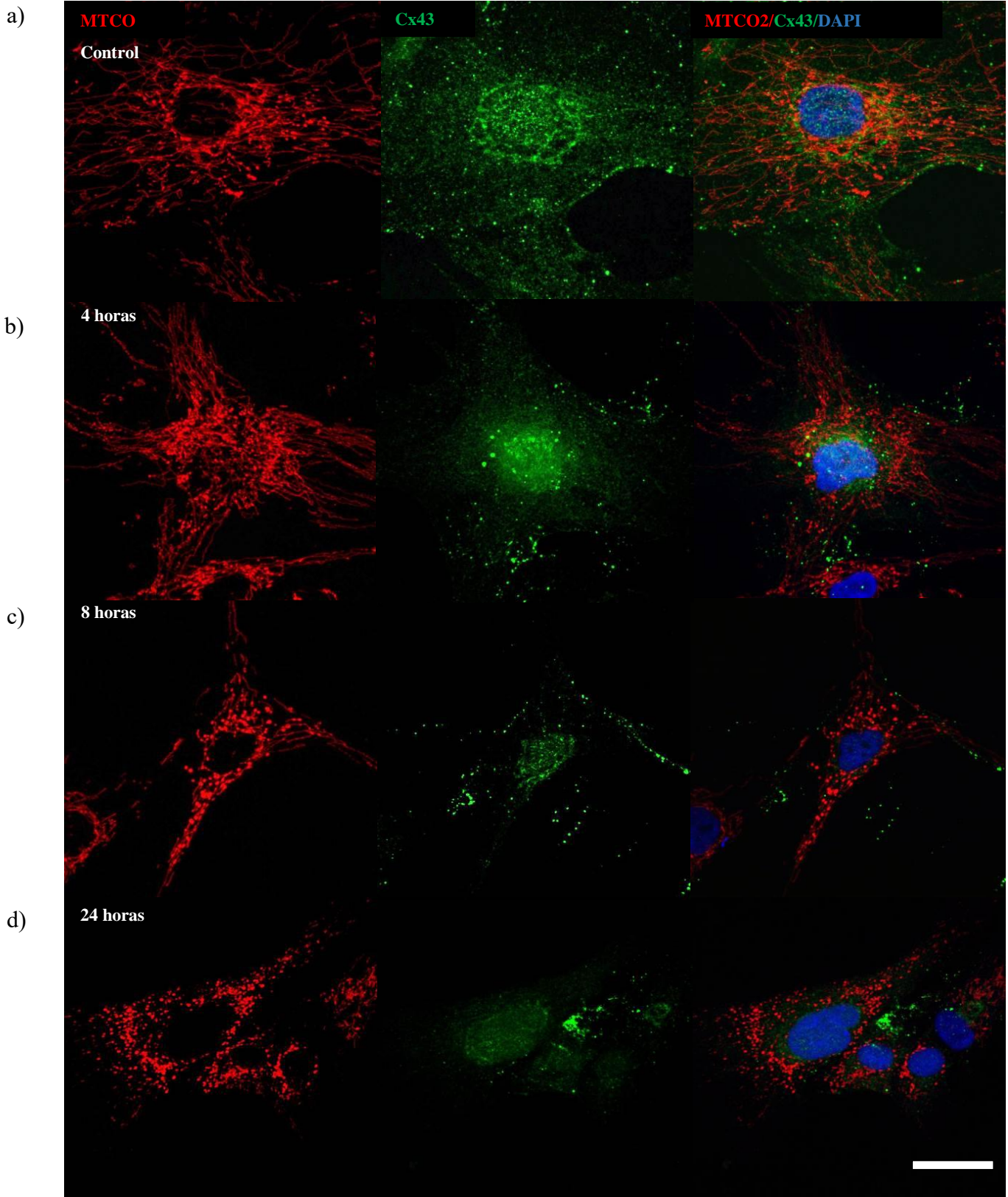


Fig. 17. Inmunocitoquímica con marcador MTCO2 (rojo), Conexina 43 (verde) y DAPI (azul) en cuatro cultivos de fibroblastos humanos después de 4, 8 y 24 horas de aplicación del veneno, incluido el control. Escala= 20 μ m.

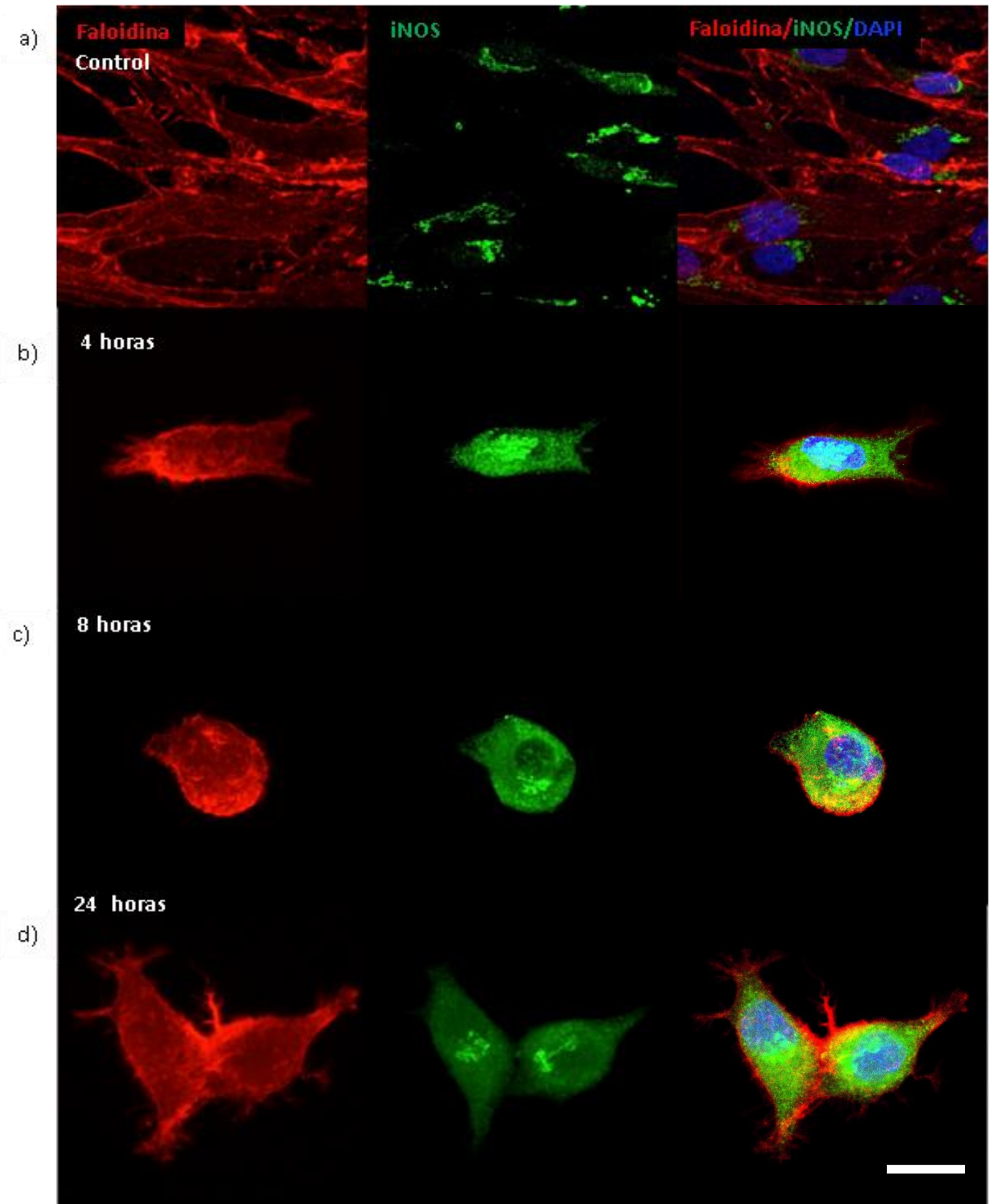


Fig. 18. Inmunocitoquímica con marcador Faloidina (rojo), iNOS (verde) y DAPI (azul) en cuatro cultivos de fibroblastos humanos después de 4, 8 y 24 horas de aplicación del veneno, incluido el control. Escala= 20 μm .

DISCUSIÓN

En primer lugar, fue posible llevar a cabo el protocolo de extracción de veneno corrigiendo múltiples errores acarreados a lo largo del proceso. Por ende, se estandarizó el procedimiento definiendo rangos y valores para cada fase. Por ejemplo, en cuanto a los valores para la electroestimulación de protocolos prescritos (Barbaro *et al.* 1992; Garb *et al.* 2014), se adaptaron rangos en base al aparato que se disponía, y, además, a la reacción negativa y/o positiva de la araña frente a cada estímulo, tanto para la expulsión de veneno (respuesta física a corriente) como para la sobrevivencia del ejemplar después de someterla al ensayo, siendo $U=10$ V el parámetro ideal de estimulación.

Un estudio hecho por Canals y colaboradores (Canals *et al.* 2014), ha permitido definir los conflictos de la mantención de los ejemplares. En el bioterio donde se encuentran las arañas, los machos tienden a morir mucho más rápido en relación a las hembras, lo que es algo consistente con la literatura. Por otro lado, la temperatura ideal para mantenerlas en cautiverio es alrededor de 15-20°C (Canals *et al.* 2014), siendo en nuestro caso entre 19-20°C una condición efectiva. La longevidad en machos es alrededor de 696 días para machos ya apareados y de 1155 para machos vírgenes. Mientras las hembras fecundadas 1536 días y hembras vírgenes 1894 días (Canals *et al.* 2014). Con esto último, se justifica la muerte de la gran mayoría de los machos a los pocos meses de su captura, ya que, algunos de ellos eran adultos al momento de su captura, por lo que su esperanza de vida en su ciclo ya era baja en primer lugar. Las hembras, sin embargo, en su mayoría son juveniles cerca de entrar al estado de adultas, por lo que eso explica su mayor durabilidad en cautiverio. Existe el conflicto de la alimentación continua que se menciona en la literatura (Canals *et al.* 2014), aunque es claro que no es necesario por su baja tasa metabólica; sin embargo, una buena alimentación permitiría una mejora en el almacenamiento del veneno por parte de los ejemplares, con el fin de mejorar la extracción reiterada de este en una misma araña.

Como base de la extracción se asume que cada muestra obtenida está contaminada. Esta contaminación no sólo es por la mezcla con fluidos internos (en algunos casos por cristalizarse en la zona bucal siendo complejo de remover con agua), sino, también por

colonias bacterianas que se han descrito que conviven en la zona de las glándulas de veneno y quelíceros. Catalán y colaboradores hicieron un estudio de 140 glándulas y quelíceros de ejemplares de *L. laeta* para extraer posibles bacterias ya mencionadas en la literatura con *L. intermedia*. Ellos de este número encontraron en 22 glándulas y quelíceros (15,7%) bacterias del género *Clostridium*, siendo mayormente *Clostridium perfringens* y otras como *C. beijerinckii butyricum*, *C. histolyticum*, *C. bifementans* y *C. botulinum*. Este dato es crucial, definiendo que no en todos los casos existe comensalismo de especies bacterianas en las glándulas de la araña, pero en los casos en que sí, puede causar un aumento del efecto necrótico. La razón está dada porque la bacteria *C. perfringens* genera cuadros clínicos variados, pero uno de ellos corresponde a la gangrena gaseosa, además de liberar múltiples toxinas (enterotoxinas, hialuronidasas, colagenasas, entre otros) que son similares a algunos componentes propios del veneno (Catalán *et al.* 2010; Chaim *et al.* 2011). Con lo anterior, para efectos de la investigación resulta complejo realizar una curva de dosis respuesta rigurosa, y que no cambie en relación a las distintas muestras provenientes de diferentes arañas hembras. La presencia de esta bacteria potenciaría el efecto del veneno, siendo un dato clave para el momento de su uso en los ensayos.

En cuanto al estudio en cultivos celulares se demostró la factibilidad de extraer veneno de arañas de la especie *L. laeta* y su uso en ensayos celulares. Se determinó que una concentración promedio de 5,68 µg/mL es capaz de matar el 75 % de las células presentes en un cultivo con confluencia de 60-70%. Sin embargo, la idea de calcular el EC50 es para utilizar una concentración representativa que mate el 50% de las células, por ende, como en este caso se utilizaron tres concentraciones y la más representativa resultó dejar al 25 % de las células totales viables, significa que aún se podría usar una concentración menor y así poder utilizar menos veneno en cada experimento. Por otro lado, es importante mencionar que el conteo de células viables está limitado en cierto modo por realizarlo con el parámetro de morfología típica y no con marcadores de muerte celular.

Con los experimentos llevados a cabo, se puede afirmar en cierto modo la hipótesis postulada, ya que se demostró que las células expuestas a veneno responden de manera dosis-dependiente lo que se puede observar en la curva llevada a cabo. Por otro lado, no se pudo

determinar el tipo de muerte celular asociada, para ello se necesitan llevar a cabo más experimentos. Sin embargo, se pudo determinar a grandes rasgos fenómenos como la pérdida de conexiones intercelulares, fragmentación mitocondrial e inflamación celular.

En cuanto a lo visto en la marcación de conexina 43 (Fig. 18) en el experimento de inmunocitoquímica, se pudo observar que las conexiones célula-célula desaparecen a las 24 horas. El hecho de que los hemicanales en aposición disminuyen progresivamente al paso de las horas hasta desaparecer prácticamente a las 24 horas, es algo que se ha visto en otros estudios, en donde se menciona que moléculas de la matriz extracelular podrían ser blancos de algunas toxinas que posee el veneno, tales como, proteasas y hialuronidasas, lo que generaría la interrupción del contacto de célula-célula, célula- matriz (Veiga *et al.* 2000, 2001; Ferrer *et al.* 2013). Por otro lado, en fibroblastos humanos expuestos a veneno de *L. similis*, en donde se reportó vía de muerte celular por apoptosis, se observó que las uniones intercelulares desaparecen al paso de las horas (Dantas *et al.* 2014). Por todo lo anterior, resulta sustancial definir si las uniones desaparecen realmente por ser blancos de toxinas, o bien, si es un proceso indirecto en donde el tipo de muerte celular provoca el desacoplamiento de las uniones entre células. Es importante tomar en cuenta que tanto en los experimentos llevados a cabo como en lo reportado en bibliografía, se ha demostrado que la acción del veneno no solo depende de la concentración a la que se expone un cultivo dado, sino, también, en gran medida por la cantidad de células que están presentes en el cultivo, y en especial mientras más comunicadas están unas con otras el efecto citotóxico siempre es menos drástico y de acción más lenta, en relación a células que están más aisladas (Dantas *et al.* 2014). Sin embargo, por otra parte, no se ha determinado la vía de muerte celular de este cultivo con veneno de *L. laeta*, pero antes que eso es importante tomar en consideración cuando efectivamente mueren las células, ya que, en los estudios reportados por Dantas hay un margen entre las 24-48 horas de exposición, siendo variable por la confluencia y cantidad de células en el cultivo a utilizar (Dantas *et al.* 2014), esto es interesante ya que en los cultivos usados en todos los experimentos las células fueron expuestas sólo durante 24 horas con veneno, en donde al menos en las usadas en inmunocitoquímica no se observó rompimiento del núcleo, por lo que talvez es necesario incubar por más tiempo.

Por otro lado, como está descrito en la publicación de Dantas, la caspasa-3 es un efector asociado en la vía de muerte celular por apoptosis en un cultivo primario de fibroblastos humanos expuesto a veneno de *L. similis* (Dantas *et al.* 2014), por tanto, una inmunocitoquímica con caspasa-3 e iNOS permitiría dilucidar si el tipo de muerte celular es el mismo con un veneno diferente, además de observar si hay inflamación celular al mismo tiempo, lo que sería similar a lo reportado por esta publicación. Es importante, de igual modo, entrar en más detalle para definir si la muerte celular es gatillada efectivamente por apoptosis, ya que en esencia no se sabe que toxina o grupo de ellas actúan en el gatillamiento de muerte celular.

Es importante mencionar la respuesta inflamatoria celular asociada a los cultivos. Horta llevó a cabo un estudio en una línea celular de fibroblastos HFF1 y estudió que mediadores inflamatorios se gatillan al suministrar veneno de *L. similis* y un recombinante de una proteína dermonecrótica de *L. intermedia* recLiD1. Ellos observaron que la respuesta inflamatoria está asociada directamente con receptores de LPA dependiente de proteína G, que a su vez liberaron citoquinas/quimiocinas pro-inflamatorias como IL6, IL8, CXCL1 y CXCL2. En esta investigación además dieron cuenta que LPA no participa en la apoptosis inducida de estas células (Horta *et al.* 2013), lo que resulta sustancial porque su modelo de estudio son fibroblastos humanos, además de haber visto lo mismo en células endoteliales umbilicales humanas. De igual modo, anteriormente se había visto en un estudio hecho en ratones inyectados con veneno de *L. gauchoi* que no hay aumento de IL-1b, TNF-a, TXB2 y LTB4. Sino, una respuesta inflamatoria compleja y rápida donde se secretaron muchas citoquinas y mediadores lipídicos (PGE2) además de reclutamiento de leucocitos al sitio (Barbaro *et al.* 2010). Lo anterior es sustancial para definir que la respuesta inflamatoria está mediada inicialmente por la escisión de LPC en LPA, pero también es importante considerar que en ambos artículos se menciona que la liberación de estos mediadores pro-inflamatorios disminuye a las 8 horas mientras la concentración de proteínas a nivel sanguíneo se mantiene. Por otro lado, un estudio hecho en ratones inyectados con veneno de *L. gauchoi* más esfingomielina exógena mostró una respuesta inflamatoria mucho mayor y duradera (6 días) que con el veneno por sí solo (24 horas), esto además de considerar que la estructura química

de la esfingomielina de ratones es diferente, da hincapié a que la respuesta inflamatoria se produce por ambas vías, pero en gran medida está asociada a esfingomielina con grupos de fosfocolina y fosfoceramida como poseen conejillos de indias, conejos y humanos (Domingos *et al.* 2003). Por lo que el estudio de la inflamación desde el punto de vista de LPA es importante, pero se ha demostrado que C1F genera una respuesta más aguda y que se mantiene en el tiempo. Con todo lo anterior, también se puede decir que LPA podría no estar asociado al gatillamiento de muerte celular, pero si a una respuesta inflamatoria importante a nivel sanguíneo, por otro lado, C1F tiene incidencia en la viabilidad celular, ya que, altas concentraciones de este pueden resultar letales (Rivera *et al.* 2015).

Hay estudios hechos en donde se suministra la enzima esfingomielinasa endógena en cultivos de macrófagos, en donde demuestran que el aumento de la concentración de C1F extracelular, gatilla la activación de la enzima iNOS, la que a su vez activa la liberación de NO (Gaingoiti *et al.* 2008). Este dato permite formular la hipótesis de que el mediador inflamatorio más importante de la vía de acción de Fosfolipasa-D es probablemente C1F, el cual entre las tantas posibles vías que activa estimula la actividad de iNOS, la que a su vez libera NO, lo que se puede comprobar observando las células tratadas con inmunocitoquímica con el marcador anti-iNOS (Fig. 17) donde se puede ver que al paso de las horas en presencia de veneno de *L. laeta* la expresión de iNOS aumenta considerablemente manteniéndose en el tiempo (24 horas). Es por esto que resulta importante estudiar a fondo la vía de C1F que se ha demostrado que está altamente relacionada con la sobrevivencia, migración, inflamación y muerte celular (Veiga and da Silveira *et al.*, 2000; Sales *et al.* 2008; Rivera *et al.* 2015). De igual manera, está descrito que NO actúa inflamando la célula, pero de igual modo podría actuar como un metabolito señalizador que podría evitar la muerte celular (Brune *et al.* 2002), por lo que puede que no sea una vía que se anteponga necesariamente a la posible muerte celular por apoptosis. Es sustancial mencionar que la muerte por apoptosis no genera inflamación en las células, sin embargo, el aumento de óxido nítrico suele estar ligado a una respuesta pro-inflamatoria aguda, por tanto, observando las imágenes se esperaría que la vía de muerte de estas células no fuera apoptosis. Sin embargo, en el estudio llevado a cabo en fibroblastos con veneno de *L. similis* de Dantas, se demostró que la vía de muerte celular del cultivo

primario es por apoptosis y con presencia de inflamación celular que aumenta progresivamente al paso de las horas. No obstante, en este estudio parte del cultivo entra a un estado secundario de necrosis sobre las 48 horas de exposición, y, aunque, no es un porcentaje significativo ellos lo extrapolan a lo que debe ocurrir en una mordedura ocasionada por alguna de estas arañas, por lo que ellos sugieren que la apoptosis inducida es tan masiva en las primeras horas que los macrófagos pueden no ser capaces de fagocitar todas las células sometidas a este proceso, por lo que, estas células entran entonces en un estado de necrosis secundaria en el que sus membranas pierden integridad, mostrando fugas de su contenido intracelular (Dantas *et al.* 2014). Por tanto, ellos relacionan la inflamación a la vía secundaria necrótica, no obstante, el cultivo celular que utilizaron no tiene macrófagos por lo que no se sustenta del todo ésta especulación.

También es importante mencionar que de estudios hechos en animales como en conejos, se ha visto que el aumento progresivo de la inflamación local está directamente relacionado con la difusión del veneno, lo que fue cuantificado (Gomez *et al.* 2001). Esto, resulta interesante desde el punto de vista de que la acción de esfingomielina en la escisión de C1F y su difusión no está bien descrito, sin embargo, de LPC sí. Meeteren demostró que cuando Fosfolipasa-D entra en contacto con la sangre, provoca la ruptura de LPC unido a albúmina lo que genera LPA, y este, activa receptores LPA acoplados a proteína G, vía que se inhibe al no haber albúmina asociada al esfingolípido (Meeteren *et al.* 2004), esto demuestra que al haber una mordedura en un área no altamente vascularizada no debiese formarse este mediador en exceso, lo que también explica porque la inflamación no es tan severa y el cuadro resulta ser local. Sin embargo, esfingomielina se escinde sin necesidad de unión a albumina, y está en el foliolo externo de las membranas plasmáticas, por lo que, de igual modo, se demuestra que al haber una respuesta inflamatoria grave en un área poco vascularizada esta debe estar gatillada mayormente por la actividad de la Fosfolipasa-D sobre esfingomielina, lo que demuestra una vez más su potente efecto por sobre LPC en la respuesta inflamatoria local.

Finalmente, hay que considerar que mediante el estudio de diferentes tipos celulares con veneno de *Loxosceles* se ha observado que diversas toxinas actúan a nivel de membrana, es decir, de superficie celular, lo que progresivamente podría inducir la citotoxicidad, por lo que

se ha hipotetizado que probablemente hay blancos plantados en diferentes zonas de la membrana celular, por lo que la muerte de esta debe estar asociada a múltiples eventos simultáneos. Falta ahondar en que componentes activan las cascadas de muerte celular en cada modelo de estudio para poder entender a mayor cabalidad el mecanismo tan complejo que acontece a tantos niveles, pero una vez que esta tarea se complete podrá ser posible buscar medidas en su contra (Chaim *et al.* 2006; Chaves-Moreira *et al.* 2009; Dias-Lopes *et al.* 2010)

CONCLUSIÓN

En esta investigación se puede rescatar que la mayoría de los objetivos fueron logrados. En términos generales, se adaptó un protocolo de extracción y almacenamiento de veneno de *Loxosceles laeta* y, por otra parte, se pudo demostrar la presencia de veneno en las muestras extraídas de arañas, mediante pruebas biológicas en ensayos de cultivos de fibroblastos humanos, usando como control células no expuestas a este. La concentración ideal para los experimentos resultó ser de 5,68 µg/mL el que actúa dejando alrededor del 25% de células vivas a las 24 horas. Por otro lado, mediante inmunocitoquímica se dilucidó ciertos posibles mecanismos implicados en la acción del grupo de toxinas, afectando directa o indirectamente las uniones de tipo Gap (conexina 43), además de observarse un aumento progresivo de la expresión y localización de iNOS lo que debe implicar una respuesta pro-inflamatoria celular local y estar relacionado directa o indirectamente en la viabilidad celular, por otro lado, sólo faltó dilucidar en el último objetivo que consistía en determinar el tipo de muerte celular.

PROYECCIONES

Debido a que en esta tesis no se determinó el tipo de muerte celular del cultivo primario de fibroblastos humanos expuestos a veneno de *Loxosceles laeta*, el cual era uno de los objetivos específicos más importantes para comparar la acción del veneno de esta especie con la de *Loxosceles similis* se pretende llevar a cabo un par de experimentos extras.

En primer lugar, es necesario hacer nuevamente la curva de dosis-respuesta con concentraciones intermedias entre 1,71 $\mu\text{g/mL}$ y 5,68 $\mu\text{g/mL}$ para obtener realmente el EC_{50} y así utilizar menos material de los stocks en cada experimento. En esta curva las muestras a las 24 horas serán fijadas y se les llevará a cabo una reacción enzimática llamada TUNEL, la cual marca preferentemente roturas de cadena de ADN generadas durante la apoptosis, lo que permitiría discriminar la apoptosis de la necrosis. Sin embargo, esta reacción solo sirve cuando las células ya están muertas y no en estadios previos, por lo que es importante determinar qué cantidad de células por cultivo y que concentración de proteínas del veneno generará efectivamente la muerte de este en un rango de tiempo específico.

Por otro lado, en las muestras con inmunocitoquímica se pretende usar un marcador anti-caspasa-3, el cual es específico en la cadena de activación de la apoptosis, por lo que permitiría discriminar aun en estadios previos que células morirán por esta vía. En caso de que no marcara, o que solo fuera un porcentaje menor de células se utilizaría un marcador específico para necrosis.

ANEXO

Tabla suplementaria 1. Cuadro resumen de las familias de toxinas que componen el veneno del género *Loxosceles* (Chaim et al. 2011).

Toxina	PM (kDA)	Característica y acción descrita	N° secuencia*
Fosfolipasas-D (Familia de las SicTox)	30-35	Varias isoformas con características variantes tales como: <ul style="list-style-type: none"> - Dermonecrosis. - Hidrólisis lipídica. - Hemólisis. - Agregación plaquetaria (in vitro). - Infiltración de células inflamatorias. - Edema. - Daño renal. - Letalidad. - Citotoxicidad (in vitro). - Activación de citoquinas. 	335
Péptidos insecticidas	5-8	<ul style="list-style-type: none"> - Miembros de la familia LiTx y Magi3-péptidos relacionados. - LiTx: Letal para <i>S. frugiperda</i> (parálisis flácida). - LiTx3: aparentemente actúa sobre canales de Na⁺. 	8
Metaloproteasas	28-35	<ul style="list-style-type: none"> - Astacina como Metaloproteasa (LALPs). - Presente en diferentes arañas del género. - Actividad sobre gelatina, fibronectina, fibrinógeno y entactina. 	4
Hialuronidasas	41-43	<ul style="list-style-type: none"> - Clasificada como endo-beta-N-acetil-d-hexosaminidasas hidrolasas. - Actividad sobre ácido hialurónico y sulfato de condroitina. - Presente en veneno de diferentes especies de <i>Loxosceles</i>. 	-
Serina-proteasas	85-95	<ul style="list-style-type: none"> - Actividad Gelatinolítica. - Actividad in vitro por tripsina. - Presente en veneno de <i>L. intermedia</i> y <i>L. laeta</i>. 	-
Serina/Cisteina Inhibidores de la proteasa	N.D	<ul style="list-style-type: none"> - Pertenece a la superfamilia de Serpina. - Identificada en <i>Loxosceles</i> spp. Transcriptomas y proteomas. - Puede relacionarse con proceso de coagulación, fibrinólisis e inflamación. 	-

Tabla suplementaria 2. Ensayo 1; número de células contadas en dos campos por pocillo tratado con una dilución específica (30, 10 y 3 μ L)

Dilución	N° Células 0 horas	N° Células 4 horas	N° Células 8 horas	N° Células 24 horas
30	224	172	148	8
	149	155	87	12
Promedio	186.5	163.5	117.5	10
10	162	192	137	48
	207	146	123	32
Promedio	184.5	169	130	40
3	192	190	145	128
	197	153	132	143
promedio	194.5	171.5	138.5	135.5
Control	207	187	190	183
	179	194	188	188
Promedio	193	190.5	189	185.5

Tabla suplementaria 3. Ensayo 2; número de células contadas en dos campos por pocillo tratado con una dilución específica (30, 10 y 3 μ L)

Dilución	N° células 0 horas	N° células 4 horas	N° células 8 horas	N° células 24 horas
30	173	129	115	10
	251	135	98	9
Promedio	212	132	106.5	9.5
10	175	155	110	55
	160	148	125	42
Promedio	167.5	151.5	117.5	48.5
3	154	165	128	98
	168	132	145	161
Promedio	161	148.5	136.5	129.5
Control	245	232	169	207
	210	215	275	230
Promedio	227.5	223.5	222	218.5

Tabla suplementaria 4. Número promedio de células de ensayo 1 y 2 de la dilución de 30 μ L más error asociado.

30	Promedio 1	Promedio 2	Promedio total	Desviación estándar
0 horas	186.5	212	199.25	18.03122292
4 horas	163.5	132	147.75	22.27386361
8 horas	117.5	106.5	112	7.778174593
24 horas	10	9.5	9.75	0.353553391

Tabla suplementaria 5. Número promedio de células de ensayo 1 y 2 de la dilución de 10 μ L más error asociado.

10	Promedio 1	Promedio 2	Promedio total	Desviación estándar
0 horas	184.5	167.5	176	12.02081528
4 horas	169	151.5	160.25	12.37436867
8 horas	130	117.5	123.75	8.838834765
24 horas	40	48.5	44.25	6.01040764

Tabla suplementaria 6. Número promedio de células de ensayo 1 y 2 de la dilución de 3 μ L más error asociado.

3	Promedio 1	Promedio 2	Promedio total	Desviación estándar
0 horas	194.5	161	177.75	23.68807717
4 horas	171.5	148.5	160	16.26345597
8 horas	138.5	136.5	137.5	1.414213562
24 horas	135.5	129.5	132.5	4.242640687

Tabla suplementaria 7. Número promedio de células de ensayo 1 y 2 del control más error asociado.

C	Promedio 1	Promedio 2	Promedio total	Desviación estándar
0 horas	193	227.5	210.25	24.395184
4 horas	190.5	223.5	207	23.3345238
8 horas	189	222	205.5	23.3345238
24 horas	185.5	218.5	202	23.3345238

Cálculo de medición de concentración de proteínas para curva de dosis respuesta:

Ensayo 1

$$\text{Concentración de proteínas en } 5 \mu\text{L} = 2,27 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \times \frac{200\mu\text{L}}{5 \mu\text{L}} = 90,8 \mu\text{g/mL}$$

$$1) \text{ Concentración de proteínas en volumen final de } \mathbf{30 \mu\text{L del stock}} = \frac{90,8 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} * 30 \mu\text{L}}{200 \mu\text{L}} =$$

$$13,62 \mu\text{g/mL}$$

$$2) \text{ Concentración de proteínas en volumen final de } \mathbf{10 \mu\text{L del stock}} = \frac{90,8 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} * 10 \mu\text{L}}{200 \mu\text{L}} =$$

$$4,54 \mu\text{g/mL}$$

$$3) \text{ Concentración de proteínas en volumen final de } \mathbf{3 \mu\text{L del stock}} = \frac{90,8 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} * 3 \mu\text{L}}{200 \mu\text{L}} =$$

$$1,36 \mu\text{g/mL}$$

Ensayo 2

$$\text{Concentración de proteínas en } 5 \mu\text{L} = 3,41 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \times \frac{200\mu\text{L}}{5 \mu\text{L}} = 136,4 \mu\text{g/mL}$$

$$4) \text{ Concentración de proteínas en volumen final de } \mathbf{30 \mu\text{L del stock}} = \frac{136,4 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} * 30 \mu\text{L}}{200 \mu\text{L}} =$$

$$20,46 \mu\text{g/mL}$$

$$5) \text{ Concentración de proteínas en volumen final de } \mathbf{10 \mu\text{L del stock}} = \frac{136,4 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} * 10 \mu\text{L}}{200 \mu\text{L}} =$$

$$6,82 \mu\text{g/mL}$$

$$6) \text{ Concentración de proteínas en volumen final de } \mathbf{3 \mu\text{L del stock}} = \frac{136,4 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} * 3 \mu\text{L}}{200 \mu\text{L}} =$$

$$2,05 \mu\text{g/mL}$$

Cálculo de medición de concentración de proteínas para inmunocitoquímicas

Ensayo 1 (marcación conexina43 y mitocondria)

$$\text{Concentración de proteínas en } 5 \mu\text{L} = 1,30 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \times \frac{200\mu\text{L}}{5 \mu\text{L}} = 52 \mu\text{g/mL}$$

1) Concentración de proteínas en volumen final de **10 μL del stock** = $\frac{52 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} * 10 \mu\text{L}}{200 \mu\text{L}} =$
2,6 $\mu\text{g/mL}$

Ensayo 2 (marcación de faloidina e iNOS)

$$\text{Concentración de proteínas en } 5 \mu\text{L} = 2,45 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \times \frac{200\mu\text{L}}{5 \mu\text{L}} = 98 \mu\text{g/mL}$$

2) Concentración de proteínas en volumen final de **10 μL del stock** = $\frac{98 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} * 10 \mu\text{L}}{200 \mu\text{L}} =$
4,9 $\mu\text{g/mL}$

BIBLIOGRAFÍA

- Appel, M., Bertoni da Silveira, R., Gremski, W., Veiga, S. (2005). Insights into brown spider and loxoscelism. *Invertebr. Surviv. J.* 2: 152–158.
- Atkins, J., Wingo, C., Sodeman, W. (1957). Probable cause of necrotic spider bites in the Midwest. *Science.* 126:73.
- Ballou, L.R., Laulederkind, S.J.F., Roloniec, E.F., Raghov, R. (1996). Ceramide signalling and the immune response. *Biochim. Biophys. Acta.* 1301: 273–287.
- Barbaro, K.C., Cardoso, J.L.C., Eickstedt, V.R.D., Mota, I., (1992). Dermonecrotic and lethal components of *Loxosceles gaucho* spider venom. *Toxicon.* 30: 331–338.
- Barbaro, K.C., Sousa, M.V., Morhy, L., Eickstedt, V.R.D., Mota, I. (1996). Compared chemical properties of dermonecrotic and lethal toxins from spiders of the genus *Loxosceles* (Araneae). *J. Prot. Chem.* 15: 337–343.
- Barbaro, K. C., Lira, M. S., Araújo, C. A., Pareja-Santos, A., Távora, B. C., Prezotto-Neto, J. P., Santoro, M. L. (2010). Inflammatory mediators generated at the site of inoculation of *Loxosceles gaucho* spider venom. *Toxicon.* 56(6): 972-979.
- Baruch, W., Cartes, M., Morales, L., Hauck, I., Oliveri, R., Hidalgo, M., Izata, E., Alarcón, A., Martínez, E. (2016). Guía para el Manejo de Mordeduras de Araña de los Rincones- *Loxosceles laeta*. Ministerio de Salud – Gobierno de Salud. 1-16.
- Benamú, M. (2007). Clave para la determinación de algunas familias de arañas (araneae araneomorphae) del Uruguay. *Bol. Soc. Zool. Uruguay.* 16: 1-19.
- Berkut, A., Peigneur, S., Myshkin, M., Paramonov, A., Lyukmanova, E., Arseniev, A., Grishin, E., Tytgat, J., Shenkarev, Z., Vassilevski, A. (2015). Structure of membrane-active Toxin from crab Spider *Heriades melloteei* Suggest Parallel Evolution of Sodium Channel Gating Modifiers in Araneomorphae and Mygalomorphae. *J Biol Chem.* 290(1): 492-504.
- Bettger, W.J., Blackader, C.B., McCorquodale, M.L., Ewing, R. (1998). The occurrence of iso 24:0 (22 Methyltricosanoic acid) fatty acid in sphingomyelin of rat tissues. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 119: 229–304.
- Binford, G. J., Bodner, M. R., Cordes, M. H., Baldwin, K. L., Rynerson, M. R., Burns, S. N., and Zobel-Thropp, P. A. (2009). Molecular evolution, functional variation, and proposed nomenclature of the gene family that includes sphingomyelinase D in sicariid spider venoms. *Mol. Biol. Evol.* 26: 547–566.

Binford, G.J., Wells, M.A. (2003). The phylogenetic distribution of sphingomyelinase D activity in venoms of Haploglyne spiders. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 135: 25–33.

Brune, B., von Knethen, A. (2002). The role of nitric oxide and cyclooxygenase-2 in attenuating apoptosis. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 21: 103–112.

Canals, M. (2011). Biología e historia natural de la araña de rincón *Loxosceles laeta*. *Parasitol.* 1: 4-5.

Canals, M., Solís, R. (2014). Desarrollo de cohortes y parámetros poblacionales de la araña del rincón *Loxosceles laeta*. *Revista chilena de infectología.* 31(5): 555-562.

Catalán, A., Espoz, M.C., Cortés, W., Sagua, H., González, J., Araya, J.E. (2010). Tetracycline and penicillin resistant *Clostridium perfringens* isolated from the fangs and venom glands of *Loxosceles laeta*: Its implications in loxoscelism treatment. *Toxicon.* 56: 890-896.

Chaim, O.M., Sade, Y.B., da Silveira, R.B., Toma, L., Kalapothakis, E., Chávez Olórtegui, C., Mangili, O.C., Gremski, W., von Dietrich, C.P., Nader, H.B., Veiga, S.S. (2006). Brown spider dermonecrotic toxin directly induces nephrotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 211: 64–77.

Chaim, O., Trevisan-Silva, D., Chaves-Moreira, D., Wille, A., Ferrer, V., Matsubara, F., Mangili O., da Silveira, R., Gremski, L., Gremski, W., Senff-Riveiro, A., Veiga, S. (2011). Brown Spider (*Loxosceles* Genus) Venom Toxins: Tools for Biological Purposes. *Toxins.* 3(3): 309–44.

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. (2009). Identification of a direct hemolytic effect dependent on the catalytic activity induced by phospholipase-d (dermonecrotic toxin) from brown spider venom. *J. Cell. Biochem.* 107 (4): 655–666.

Dantas, A., Horta, C.C., Martins, T., do Carmo, A., Mendes, B., Goes, A., Kalaphotakis, E., Gomez, Dawidson. (2014). Whole venom of *Loxosceles similis* activates caspases-3, -6, -7, and -9 in human primary skin fibroblasts. *Toxicon.* 84: 56–64.

Da Silva, P. H., Da Silveira, R. B., Appel, M. H., Mangili, O. C., Gremski, W., & Veiga, S. S. (2004). Brown spiders and loxoscelism. *Toxicon.* 44(7): 693-709.

Da Silveira, R. B., Pigozzo, R. B., Chaim, O. M., Appel, M. H., Dreyfuss, J. L., Toma, L., Mangili, O. C., Gremski, W., Dietrich, C. P., Nader, H. B., and Veiga, S. S. (2006). Molecular cloning and functional characterization of two isoforms of dermonecrotic toxin from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom gland. *Biochimie.* 88: 1241–1253.

de Oliveira, K.C., Gonçalves-de-Andrade, R.M., Piazza, R.M.F., Ferreira Jr., J.M.C., van den Berg, C.W., Tambourgi, D.V. (2005). Variations in *Loxosceles* spider venom composition and toxicity contribute to the severity of envenomation. *Toxicon*. 45: 421–429.

de Santi Ferrara, G. I., Fernandes-Pedrosa Mde, F., Junqueira-de-Azevedo Ide, L., Gonçalves-de-Andrade, R. M., Portaro, F. C., Manzoni-de Almeida, D., Murakami, M. T., Arni, R. K., van den Berg, C. W., Ho, P. L., and Tambourgi, D. V. (2009). SMase II, a new sphingomyelinase D from *Loxosceles laeta* venom gland: molecular cloning, expression, function and structural analysis. *Toxicon*. 53: 743–753

Dias-Lopes, C., Felicori, L., Guimarães, G., Gomes, E.R., Roman-Campos, D., Duarte, H., Damasceno, D., Martins, M., Kalapothakis, E., Almeida, A.P., Granier, C., Cruz, J.S., Guatimosim, S., Chávez-Olórtegui, C. (2010). Cardiotoxic effects of *Loxosceles intermedia* spider venom and the recombinant venom toxin rLiD1. *Toxicon*. 56 (8): 1426–1435.

Domingos, M. O., Barbaro, K.C., Tynan, W., Penny, J., Lewis, D., New, R. (2003). Influence of Sphingomyelin and TNF- α Release on Lethality and Local Inflammatory Reaction Induced by *Loxosceles gaucho* Spider Venom in Mice. *Toxicon*. 42(5): 471–79.

Dyachenko, P., Ziv, M., Rozenman, D. (2006). Epidemiological and clinical manifestations of patients hospitalized with brown recluse spider bite. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 20: 1121-1125.

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

Fernandes-Pedrosa, M.F., Junqueira-de-Azevedo, I.L.M., Gonçalves-de-Andrade, R.M., van den Berg, C.W., Ramos, C.R., Ho, P.L., Tambourgi, D.V. (2002). Molecular cloning and expression of a functional dermonecrotic and haemolytic factor from *Loxosceles laeta* venom. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 298: 638–645.

Ferrer, V. P., de Mari, T. L., Gremski, L. H., Silva, D. T., da Silveira, R. B., Gremski, W., Veiga, S. S. (2013). A novel hyaluronidase from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom (Dietrich's Hyaluronidase): from cloning to functional characterization. *PLoS Negl Trop Dis*. 7(5): e2206.

Foelix, R. (2011). *Biology of spiders*. New York: Oxford University Press.

Futrell, J. (1992). Loxoscelism. *Am. J. Med. Sci*. 304: 261–267.

Garb, J. (2014). Extraction of Venom and Venom Gland Microdissections from Spiders for Proteomic and Transcriptomic Analyses. *Journal of Visualized Experiments*. 93: e51618.

Hager, B., Bickenbach, J., Fleckman, P. (1999). Long-term culture of murine epidermal

keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 112: 971– 976.

Horta, C. C., Oliveira-Mendes, B. B., Do Carmo, A. O., Siqueira, F. F., Barroca, T. M., Lacerda, S. M. D. S. N., Kalapothakis, E. (2013). Lysophosphatidic acid mediates the release of cytokines and chemokines by human fibroblasts treated with *Loxosceles* spider venom. *The Journal of investigative dermatology.* 133(6): 1682.

Hogan, C.J., Barbaro, K.C., Winkel, K. (2004). Loxoscelism: old obstacles, new directions. *Ann. Emerg. Med.* 44: 608–624

Kroncke, K.D., Fehsel, K., Suschek, C. and Kolb-Bachofen, V. (2001). Inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide in gene regulation, cell death and cell survival. *Int. Immunopharmacol.* 1: 1407–1420.

Lajoie, D., Roberts, S., Zobel-Thropp, P., Delahayes, J., Bandarian, V., Binford, G., Cordes, M. (2015). Variable Substrate Preference among Phospholipase-D Toxins from Sicariid Spiders. *The Journal of Biological Chemistry.* 290(17): 10994–11007.

Lee, S., Lynch, K.R. (2005). Brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) venom phospholipase D (PLD) generates lysophosphatidic acid (LPA). *Biochem. J.* 391: 317–323.

Macchiavello A. (1937). *La Loxosceles laeta*, causa el aracnoidismo cutáneo o mancha gangrenosa en Chile. *Rev Chil His Nat.* 41: 11-9.

Patel, K.D., Modur, V., Zimmerman, G.A., Prescott, S.M., McIntyre, T.M. (1994). The necrotic venom of brown recluse spider induces dysregulated endothelial cell-dependent neutrophil activation. *J. Clin. Invest.* 94: 631–642.

Perrotta, C., De Palma, C., Falcone, S., Sciorati, C., Clementi, E. (2005). Nitric oxide, ceramide and sphingomyelinase-coupled receptors: a tale of enzymes and messengers coordinating cell death, survival and differentiation. *Life sciences.* 77(14): 1732-1739.

Platnick, N. I. (2004). *The world spider catalog.* The American Museum of Natural History, Merret p & HD Cameron EDS, New York.

Platnick, N. I. (2009). *The world spider catalog, version 10.0.* American Museum of Natural History. New York.

Rivera, I.G., Ordoñez, M., Presa, N., Gomez-Larrauri, A., Simón, J., Trueba, M., Gomez-Muñoz, A. (2015). Sphingomyelinase D/ceramide 1-Phosphate in Cell Survival and Inflammation. *Toxins.* 7(5): 1457–66.

Saupe, E.E., Papes, M., Selden, P.A., Vetter, R.S. (2011). Tracking a medically important spider: climate change, ecological niche modeling, and the brown recluse (*Loxosceles reclusa*). *PLoS One.* 6(3): 1-10.

Suter, R., Stratton G. (2013). Predation by spitting spiders. Elaborate venom gland, intricate delivery system. In: Nentwig W (ed) Spider ecophysiology. Springer, Heidelberg.

Swanson, D., Vetter, R. (2006). Loxoscelism. Clinics. Dermatol. 24: 213–221.

Vacaru, A. M., van den Dikkenberg, J., Ternes, P., and Holthuis, J. C. (2013). Ceramide phosphoethanolamine biosynthesis in *Drosophila* is mediated by a unique ethanolamine phosphotransferase in the Golgi lumen. J. Biol. Chem. 288: 11520–11530

van Dijk, M. C., Postma, F., Hilkmann, H., Jalink, K., van Blitterswijk, W. J., & Moolenaar, W. H. (1998). Exogenous phospholipase D generates lysophosphatidic acid and activates Ras, Rho and Ca²⁺ signaling pathways. Current biology. 8(7): 386-392.

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

Veiga, S.S., da Silveira, R.B., Dreyfus, J.L., Haoach, J., Pereira, A.M., Mangili, O.C., Gremski, W. (2000). Identification of high molecular weight serine-proteases in *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. Toxicon. 38: 825–839.

Veiga, S.S., Feitosa, L., dos Santos, V.L., de Souza, G.A., Ribeiro, A.S., Mangili, O.C., Porcionatto, M.A., Nader, H.B., Dietrich, C.P., Brentani, R.R., Gremski, W. (2000). Effect of brown spider venom on basement membrane structures. Histochem. J. Med. Biol. 32: 397–408.

Veiga, S.S., Zanetti, V.C., Braz, A., Mangili, O.C., Gremski, W. (2001). Extracellular matrix molecules as targets for brown spider venom toxins. Braz. J. Med. Biol. Res. 34: 843–850.

Wood, D.L., Miljenovic, T., Cai, S., Raven, R.J., Kaas, Q., Escoubas, P., Herzig, V., Wilson, D., King, G.F. (2009). ArachnoServer: A database of protein toxins from spiders. BMC Genomics. 2, 10, 375.

Xu, X., Liu, F., Chen, J., Ono, H., Li, D., Kuntner, M. (2015). A genus-level taxonomic review of primitively segmented spiders (Mesothelae, Liphistiidae). Zookeys. 21(488): 121-51.

Zobel-Thropp, P.A., Kerins, A.E., Binford, G.J. (2012). Sphingomyelinase D in Sicariid spider venom is a potent insecticidal toxin. Toxicon. 60: 265–271.