

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**E.A.P DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Análisis y purificación de las enzimas proteolíticas  
presentes en el veneno de *Loxosceles laeta* “Araña del  
rincón”**

**TESIS**

**para optar al título profesional de Biólogo, con mención en Zoología**

**AUTOR**

Frank Enrique Huari Chulluncuy

**ASESOR**

Dr. Armando Yarlequé Chocas

**Lima – Perú**

**2013**

## DEDICATORIA

Este trabajo va dedicado en primer lugar a Sabina y Juan Carlos, pues pienso y pensaré en ustedes en cada paso que doy, de él sé que desde donde esté me cuida de todo lo malo y me ayuda en mis planes; a ella que procura hacer de mí una persona de bien y me enseña a valerme por mi mismo; también para Augusto, por el apoyo sin condición a mis proyectos, a los tres gracias por su amor, dedicación y paciencia que me dan y darán.

A Rocsana, mi querida y adoraba hermana mayor tu que has sido y eres como una madre para mí, espero estés orgullosa, tu siempre serás mi ejemplo a seguir.

A mis sobrinitas Fiorella y Camila, por desarrollar en mí una faceta desconocida y permitirme ser un adecuado referente, en ustedes trataré de retornar toda la dedicación, amor y paciencia que su madre me ha dado. A Javier, por ser quien las vigila y protege.

A mi abuelita Lorenza, pues sin sus ánimos e insistencia no hubiera estado en esta  
universidad

**Para todos ustedes mi verdadero corazón.**

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Armando Yarlequé Chocas, jefe del Laboratorio de Biología Molecular, asesor, profesor y, con el debido respeto, amigo; gracias por encaminarme rigurosamente en el desarrollo de este trabajo, por los conocimientos brindados, los detalles, las discusiones. Y por los consejos no científicos recibidos fuera del laboratorio.

A la Mg. Fanny Lazo Manrique, por su minucioso trabajo al revisar este trabajo, por ser un apoyo constante, brindar consejos y preocuparse por la feliz culminación de este trabajo, a su manera, y por evitarme la necesidad de arruinar algo para conseguirlo.

A la Mg. Edith Rodríguez Quispe, por inculcar el orden, disciplina y rigurosidad del desarrollo de los trabajos de investigación.

A la Dra. Mónica Paredes y al Blgo. Miguel Neira, por revisar este trabajo, hacer las críticas pertinentes y darme sus valorables consejos.

A los todos los profesores que conocí durante mi carrera universitaria, entre ellos Elba Canahuire, Erasmo Colona, Cesar Aguilar; cada uno con un estilo característico que uno, como estudiante, recordará siempre.

A los Mgs. Gustavo Sandoval y Dan Vivas, gracias por sus discusiones y críticas a los avances, dando consejos que enriquecieron este trabajo; a los biólogos Julio Mendoza y Edgar Gonzalez, mis más cercanos colaboradores con quienes aprendí muchísimas cosas en el laboratorio, pero no solo en el aspecto académico, sino también en el aspecto humano, gracias por compartir sus acontecimientos y confiar en uno para darles consejos y recibirlos también.

Al Blgo. Cesar Ortiz, Fabiola Espinoza y Candy Bellido, por trabajar directamente con ellos y aprender lo que significa el trabajo en equipo.

A Areli Benito, Wolfram Seifert, Jon Rojas, Luis Ruiz y Richard Aching por la colaboración en las capturas, ayuda en las actividades del laboratorio, observaciones y apreciaciones de los resultados.

## ABREVIATURAS

<b>Abreviatura</b>	<b>Nombre completo</b>
TNBS	Ácido trinitrobencenosulfónico
DMC	N´N´dimetilcaseína
PMSF	Fenil-metil-sulfonil-fluoruro
EDTA	Ácido etilendiamo tetra acético
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio
EGT	Extracción glandular total
TCA	Ácido tricloro acético
BCTA	Ácido bromilcetiltrimetial amonio
PSA	Persulfato de amonio
TEMED	N, N, N, N´- tetrametiletildiamino
kDa	Kilo Daltons
rpm	Revoluciones por minuto
nm	Nanómetros

# ÍNDICE GENERAL

## CONTENIDO

RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	7
III. MATERIALES Y MÉTODOS	10
a. Material biológico	10
b. Material de laboratorio	11
c. Determinación de cantidad de proteína	15
d. Actividades enzimáticas	15
e. Fraccionamiento del veneno	19
f. Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio	20
g. Diferenciación entre metalo y serino proteasas	21
h. Reactividad inmunogénica	21
i. Actividad hemorrágica	22
IV. RESULTADOS	
a. Contenido proteico del veneno glandular de <i>L. laeta</i>	23
b. Actividades enzimáticas detectadas	23
c. Fraccionamiento del veneno	23
d. Características del veneno en estudio	25
e. Reactividad inmunogénica de las enzimas aisladas	26
f. Actividad hemorrágica	26
V. DISCUSIÓN	27
VI. CONCLUSIONES	36
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
VIII. TABLAS Y FIGURAS	44

## RESUMEN

*Loxosceles laeta*, conocida como “araña del rincón” o “araña casera”, es el principal artrópodo de importancia clínica en nuestro país debido a las graves alteraciones fisiológicas, con secuelas irreversibles que produce su mordedura en humanos pudiendo llevar a la muerte. El objetivo de este trabajo fue explorar y caracterizar parcialmente las enzimas proteolíticas presentes en este veneno; las enzimas evaluadas fueron proteolíticas sobre caseína y dimetilcaseína (DMC), así como la acción pro-coagulante sobre plasma humano citratado. El veneno fue fraccionado usando una columna cromatográfica de filtración molecular sobre Sephadex G-100, equilibrado con buffer acetato de amonio 0,05M pH 5,0. Mediante PAGE-SDS se determinó que la proteasa que hidroliza DMC es de naturaleza monomérica, con un peso aproximado de 35 kDa. En los ensayos de inhibición, con el agente quelante EDTA y el inhibidor de serinoproteasas (PMSF), se obtiene una inhibición de 60,4% de la actividad proteolítica usando 5 mM de EDTA y empleando 5 mM de PMSF la actividad pro-coagulante se redujo al 6,7%. Las pruebas de inmunodifusión doble, usando el antiveneno loxoscélico comercial (INS-Perú) mostraron la antigenicidad de las proteasas en estudio, así como del antiveneno total. Se concluye que el veneno de la araña *L. laeta* contiene por lo menos 2 tipos de proteasas, una del tipo metaloproteasa y la otra serinoproteasa, siendo ambas enzimas reconocidas por el antiveneno loxoscélico comercial.

**Palabras clave:** veneno, araña, proteasas, pro-coagulante y TNBS

## Abstract

In Peru, *Loxosceles laeta* known as “araña del rincón” is the main spider which bite causes local and systemic physiological disorders with irreversible consequences and in some cases it could be deathly. The main **objective** of this work was to identify and partially characterize enzymes with protease activity present in the whole venom. For this reason total gland extraction method was used to obtain the venom, then it was analyzed in its content and to find the most important enzymatic activities, including protease activities upon casein and dimethylcasein (unspecific proteases), and pro-coagulant action (specific protease) upon citrated human plasma. Furthermore, venom was fractionated in Sephadex G-100 in ammonium acetate buffer 0,05M pH 5,0 and exploring the protease and pro-coagulant activities in each fraction. The results of SDS-PAGE determine that the unspecific protease is a monomeric protein and has 35 kDa of molecular weight. Additionally, assays with chelating agent (EDTA) and serine proteases inhibitor (PMSF), resulting in inhibition of 60,4% of the unspecific protease using 5mM EDTA, meanwhile, with 5mM PMSF pro-coagulant activity was reduced until 6,7%. Double immunodiffusion assay using anti-venom anti-loxoscélico (INS-Peru) showed the antigenic property of the proteases under study, as well as, the whole venom. In **summary** the *Loxosceles laeta* has 2 kinds of proteases, one of them a metalloprotease and the other one a serine protease, resulting both of them recognized by the anti-loxoscélico serum.

**Keywords:** venom, spider, proteases, pro-coagulant and TNBS

## INTRODUCCIÓN

El orden Araneae comprende 110 familias, 3 600 géneros y cerca de 39 000 especies en el mundo (Platnick, 2005; Ubick, 2005). Estos artrópodos son los principales controladores biológicos de insectos, principalmente de moscas y zancudos, al alimentarse tanto de los estadios larvales como adultos.

No obstante, las arañas también representan un considerable problema de salud pública debido a los casos de mordedura a las personas que habitan tanto en las zonas rurales como urbanas. Sólo cuatro géneros de arañas, *Phoneutria* (Sudamérica), *Atrax* (Australia) *Loxosceles* y *Latrodectus* (a nivel mundial) son los principales responsables de aracneísmo, cuadro denominado a la mordedura en humanos, con consecuencias fatales.

En América, las arañas del género *Loxosceles sp* (Familia Sicariidae, subfamilia Loxoscelinae, Platnick, 1991) son las principales causantes de aracneísmo (Zavaleta, 1987; Vetter, 2008; Quintana y Otero, 2010); debido a que estos artrópodos presentan características sinantrópicas es decir, se desarrollan en ambientes habitados por el hombre o cercanos a ellos, lo que incrementa la posibilidad de las mordeduras.

Estas arañas comúnmente conocidas como “araña marrón”, “araña de los rincones”, “araña violín” o “araña casera”; poseen un tamaño promedio de 8-15 mm (desde el cefalotórax hasta el abdomen) y 35 mm considerando las patas, de color marrón, marrón grisáceo, marrón oscuro o negruzco. En el dorso del cefalotórax posee una depresión más oscura en forma de violín. Poseen tres pares de ojos en forma de “V” (Zavaleta, 1983; Zavaleta, 1987; Sanabria y Zavaleta, 1997; Parra et al., 2002), son lucífugas y sensibles a la humedad, pueden habitar el interior de las viviendas por lo que se las halla en lugares poco iluminados, entre junturas de ladrillos, muebles en desuso, ropa

guardada, detrás de cuadros, muebles y espejos. La mordedura se produce por defensa ante la imposibilidad de huida o cuando resulta atacada.

Clínicamente el envenenamiento causado por arañas del género *Loxosceles sp* es conocido como loxoscelismo, el cual desencadena un cuadro de alteraciones fisiológicas severas ocasionadas por la acción de los distintos componentes del veneno. En América del Norte, los cuadros de loxoscelismo son causados por las especies: *L. reclusa*, *L. deserta*, *L. arizonica* y *L. apachea* (Millikan, 1974; Vetter, 2008). Para el caso de América del Sur sólo 3 de las 34 especies de *Loxosceles* (Gertsch, 1967; Gertsch et al., 1983; Platnick, 2005), son las causantes de los cuadros de envenenamiento, estas son: *L. laeta*, presente en toda la región; *L. guacho*, localizada en Brasil y *L. intermedia*, localizada principalmente en Brasil y Argentina.

En el Perú, el loxoscelismo es causado por la especie *Loxosceles laeta* (Nicolet, 1849) y es considerado como el principal problema de salud pública causado por artrópodos (Zavaleta, 1983), los casos de loxoscelismo se dan con mayor frecuencia en la franja costera del país, siendo las ciudades más afectadas Trujillo, Arequipa, Lima y Callao (Sanabria y Zavaleta, 1997; DISA I Callao, 2008; INS, 2007), especialmente en la época de calor. De la población tratada por loxoscelismo, los pacientes menores a 13 años son los que presentan mayor vulnerabilidad al trastorno. (Zavaleta, 1987; Schenone et al., 1989; Sanabria y Zavaleta; 1997).

Existen dos manifestaciones clínicas de loxoscelismo: el cutáneo o dermonecrótico y el cutáneo-visceral o viscerohemolítico. La primera es la más frecuente, oscila entre el 80 al 90% de casos totales de acuerdo a los reportes de loxoscelismo a nivel global (Yarlequé et al., 1985; Zavaleta, 1987; Schenone et al., 1989; Parra et al., 2002; MINSA, 2003; Swanson et al., 2006; Bowles y Swaby, 2006; Zaragoza et al., 2008). La mordedura suele producir dolor de poca intensidad inicialmente y muchas veces la víctima no sabe precisar

cuándo ocurrió. La lesión inicial se caracteriza por edema, eritema y a veces dolor urente. Evoluciona de 24 a 36 horas a la característica “placa marmórea” o “livelode” (áreas intercaladas de palidez y equimosis) de bordes irregulares, circundada por eritema y edema indurado, dolorosa a la palpación. Las lesiones presentan un patrón de necrosis hemorrágico gravitacional, posiblemente relacionado a la acción conjunta de las proteasas, hialuronidasas, nucleasas y esfingomielinasas, entre otras enzimas presentes en el veneno. Entre el quinto y séptimo día la lesión cutánea se circunscribe a la formación de una escara negra, que comienza a desprenderse a partir de la segunda semana. Ésta deja una úlcera con fondo de granulación que tarda varios meses en cicatrizar y puede requerir cirugía reparadora.

La manifestación cutáneo-visceral, la cual se considera un cuadro más grave, pero menos frecuente con el 10 al 20% de los casos de loxoscelismo reportados se caracteriza por generar hemólisis intravascular y coagulación intravascular diseminada (CID) asociadas a la lesión cutánea (Yarlequé et al., 1985; Zavaleta, 1987; Schenone et al., 1989; Parra et al., 2002; MINSA, 2003; Swanson et al., 2006; Bowles y Swaby, 2006; Zaragoza et al., 2008). Se presenta entre 6 a 24 horas posteriores a la mordedura y menos frecuentemente 48 horas más tarde. Las manifestaciones sistémicas son fiebre, escalofríos, decaimiento, ictericia y orina oscura (hemoglobinuria, hematuria), aumento de bilirrubina y descenso del hematocrito como consecuencia del efecto hemolítico del veneno (Bowles DE y Swaby JA, 2006). Pueden observarse petequias y equimosis si existe CID. Las víctimas pueden evolucionar a una insuficiencia renal aguda (IRA), que es la principal causa de muerte por loxoscelismo.

Los mecanismos por los cuales las arañas del género *Loxosceles sp* producen los cuadros clínicos locales y/o sistémicos, se deben a las toxinas proteolíticas presentes en el veneno, capaces de degradar fibrinógeno, fibronectina, entactina y provocar

alteraciones en las estructuras de las membranas basales que están asociadas a la hemorragia local, efectos necróticos, así como a la difusión gravitacional de la lesión necrótica y los problemas sistémicos como la coagulación intravascular diseminada y desordenes renales (Feitosa et al., 1998; Veiga et al., 2000; da Silveira et al., 2002).

El componente principal del veneno es una esfingomielinasa del tipo D (SM-D), clasificada como una fosfolipasa del tipo D (PLD), a la cual se le atribuye participación directa tanto en el proceso dermonecrotico como en el víscero-hemolítico; sin embargo, otras proteasas presentes en la ponzoña también tienen un rol importante, ya que, en los últimos años varios autores han realizado importantes estudios para explicar sus implicancias en el proceso de envenenamiento por tratarse de enzimas hidrolíticas de proteínas plasmáticas y/o tisulares, que pueden agudizar el envenenamiento (Suarez et al., 1983; Barbaro et al., 1992; Feitosa et al., 1998; Veiga et al., 2000; da Silveira et al., 2002; Kalapothakis et al., 2007; Vetter, 2008; Chaim et al., 2011;).

Las proteasas detectadas en el veneno de la araña del género *Loxosceles* corresponden principalmente a 2 grupos:

- a) Metaloproteasas; que tienen una acción de amplio espectro.
- b) Serinoproteasas; que están involucradas en los desórdenes de coagulación.

Otros componentes enzimáticos como hialuronidasas, nucleasas, factores de agregación plaquetaria, activadores del complemento entre otros, están siendo estudiados por diversos autores con distintas especies.

Las investigaciones que se han realizado en el Perú con *L. laeta* han demostrado la existencia de componentes como hialuronidasa, fosfatasa alcalina, proteasa, actividad pro-coagulante (Yarlequé et al., 1985, 1986; Zavaleta, 1987; Heredia, 1989), siendo todos

estos trabajos obtenidos a partir del veneno total, no llegándose a aislar ninguno de los componentes que se encontraron en el veneno, esto representa un punto de partida para poder trabajar y aislar una de estas enzimas.

Por lo tanto, el objetivo de la presente investigación fue aislar y purificar, al menos, una de las proteasas presentes en el veneno de *Loxosceles laeta* del Perú. Cabe resaltar, que este es el primer trabajo en aislar y caracterizar enzimas presentes en el veneno de esta araña, una de las más abundantes en nuestro país, que tiene contacto con el hombre y sin embargo, la información que se tiene acerca de su veneno es escasa.

## MARCO TEÓRICO

Las investigaciones sobre los componentes del veneno de las arañas del género *Loxosceles sp* en nuestro país son escasas, encontrándose datos preliminares sobre la presencia o ausencia de determinadas enzimas en el veneno crudo y algunas características de sus patrones electroforéticos (Zavaleta et al., 1984; Yarlequé et al., 1985; Yarlequé et al., 1986; Heredia et al. 1989), sin embargo, no se encuentra información con enzimas aisladas.

Los trabajos más detallados son los que se encuentran en el estudio de la especie norteamericana *L. reclusa* (Futrell, 1992), esto ha permitido que otros autores los hayan tomado como base para sus investigaciones. El país sudamericano que tiene un mayor número de trabajos al respecto es Brasil, donde se han estudiado especies endémicas como *L. intermedia* y *L. gaucho*; del mismo modo, se ha estudiado a la *L. laeta* brasilera, que es diferente a la peruana tanto en su morfología como en varios aspectos bioquímicos de su veneno (Guimarães et al., 2013).

En cuanto al estudio de proteínas hidrolíticas o proteasas, se encontraron dos metaloproteasas Loxolisina A y Loxolisina B, de 20-28 y 32-35 kDa de peso molecular respectivamente, en el veneno total de *L. intermedia* (Feitosa et al., 1998); estas proteasas son capaces de hidrolizar tanto gelatina, fibronectina y fibrinógeno usados como sustratos en ensayos con zimogramas. La naturaleza metaloproteasa de las enzimas, fue demostrada al utilizar agentes quelantes como el EDTA y la 1,10 fenantrolina, que inhibieron totalmente la actividad proteolítica sobre los mencionados sustratos.

En algunos trabajos, la acción proteolítica se evidenció al agregar tripsina para activar a la enzima proteolítica en estudio, lo que habla de la naturaleza zimógena que pueden llegar

a presentar algunas proteínas del veneno, teniendo que ser procesadas antes de generar su forma activa.

Al realizar las primeras investigaciones con el veneno, la incertidumbre que surgió fue con respecto a la diferencia en la manera de obtener el veneno; básicamente ésta se centraba en el método empleado, desde entonces se ha contado con dos métodos: extracción por estimulación eléctrica (EE) y extracción glandular total (EGT). En la primera, se utiliza un estimulador eléctrico y descargas de pequeños voltajes a nivel ventral del cefalotórax que hacen que la araña expulse el veneno a través de sus quelíceros, siendo recogidos con la ayuda de una micropipeta, con este método los investigadores tenían la ventaja de no destruir todo su material biológico de trabajo, quedándose con porcentajes variables del mismo para futuras extracciones, el problema residía en el hecho que con este método la cantidad que se obtiene de veneno por araña era cercana a los 10  $\mu$ L por espécimen, necesitándose de una gran cantidad de arañas (Bucherl, 1969). La principal observación que varios científicos han formulado al uso de este método consistía en el riesgo que se corría de contaminar el veneno obtenido con los jugos gástricos del artrópodo (Zavaleta, 1983).

Con el método de extracción glandular total (EGT), se obtienen las glándulas venenosas completas, las cuales son lavadas con buffer isotónico, homogenizadas y luego llevadas a centrifugación para separar las impurezas y restos de quelíceros del extracto glandular, conservándose en condiciones de temperatura adecuada. En este caso no hay posible contaminación con jugos gástricos y aún más, para saber si las enzimas proteolíticas digestivas intervenían en la actividad del veneno, Da Silveira en el 2002, hizo pruebas con venenos de *L. intermedia* y *L. laeta* obtenidos por los dos métodos, ensayados sobre gelatina en zimogramas. El resultado fue la demostración de que las proteasas tenían la misma actividad independientemente del método de obtención. Este resultado fue

corroborado posteriormente por Nagaraju *et al.*, 2007; Devaraja *et al.*, 2008 y Suarez *et al.*, 1983.

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.

- **Hipótesis nula:**

El veneno de la “araña casera” *Loxosceles laeta* no presenta enzimas proteolíticas.

- **Hipótesis alternativa:**

El veneno de la “araña casera” *Loxosceles laeta* presenta enzimas proteolíticas.

### Formulación de Objetivos general y específicos

Objetivo general:

- Purificar y caracterizar bioquímicamente las proteasas del veneno de la “araña casera” *Loxosceles laeta*

Objetivos específicos:

- Determinar la presencia *in vitro* de enzimas proteolíticas en el veneno total, usando caseína y otros sustratos.
- Estandarizar un protocolo de purificación de proteasas, usando sistemas cromatográficos.
- Caracterizar bioquímicamente a la o las metaloproteasas y serinoproteasas, purificadas previamente.
- Establecer la antigenicidad de las proteasas en estudio con el anti veneno loxoscélico.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Material Biológico

#### 1.1. Colección de arañas

Se colectaron 250 ejemplares adultos vivos de la especie *Loxosceles laeta* de la zona sur de Lima Metropolitana (Lurín y Pachacamac)

Los especímenes fueron llevados al Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM, donde se las mantuvo separadas individualmente en frascos de plástico transparentes de 60 ml, con agua *ad libitum*, siendo sexadas y revisadas durante las 3 semanas que se las tenía sin alimento.

#### 1.2. Extracción de glándulas

La obtención del veneno se realizó utilizando la metodología de extracción glandular total (Da Silveira *et al.*, 2002), para ello las arañas fueron puestas en ayuno por tres semanas con la finalidad de evitar la presencia de restos digestivos contaminantes en el momento de la extracción de las glándulas, luego con la ayuda de un estereoscopio se retiraron cuidadosamente los quelíceros, en cuyo extremo superior se encuentran las glándulas venenosas. Una vez extraídas las glándulas éstas fueron lavadas 3 veces con un volumen apropiado de buffer acetato de amonio 0,05M pH 5,0 a 4°C, inmediatamente se las llevó a un homogenizador de vidrio, donde se las trituró vigorosamente durante 5 minutos, luego se centrifugó el homogenizado a 3 000 rpm durante 15 minutos, se separó el sobrenadante de los restos de quelíceros y se mantuvo a -20°C hasta su utilización.

### **1.3. Antiveneno**

Se utilizó el antiveneno en estado líquido contra el veneno de *Loxosceles laeta* producido por el Instituto Nacional de Salud – Perú, correspondiente al lote N° 10200151, vigente hasta febrero del 2014, cada frasco contiene 5 mL de inmunoglobulinas de origen equino que neutralizan no menos de 80 glándulas de arañas de la especie *Loxosceles laeta*.

### **1.4. Plasma humano citratado**

Se obtuvo a partir de sangre venosa de personas voluntarias y en buen estado de salud, la sangre se colectó en tubos de 13,100 mm conteniendo citrato de sodio 3,8% (1/10). Luego los tubos con la muestra fueron centrifugados a 3000 rpm por 15 minutos y el plasma sobrenadante fue alicuotado en fracciones de 0,2 mL para su uso.

## **2. Material de laboratorio**

### **2.1. Reactivos**

#### **Sustratos**

- Caseína (Sigma Chemical Company).
- Dimetil caseína (Sigma Chemical Company).
- Ácido Hialurónico comercial.
- p-nitrofenil fosfato.

#### **Buffers**

- Acetato de Amonio 0,05 M pH 5,0
- Acetato de Amonio 0,05 M pH 5,0 NaCl 0,85%

- Fosfato 0,1 M pH 8,0
- Fosfato 0,15 M pH 7,0
- Tris-HCl 0,05 M pH 8,1
- Tris-HCl 0,2 M pH 7,6 CaCl<sub>2</sub> 10mM
- Tris-HCl 0,2 M pH 8,5
- Buffer de resolución (Tris-HCl 1,5 M pH 8,8)
- Buffer compactador (Tris-HCl 1,5 M pH 6,8)
- Buffer muestra (Tris-HCl 50 mM pH 6,8; SDS 2%; azul de bromofenol 0,1%, glicerol 10%)
- Buffer de corrida (Tris-HCl 25 mM pH 8,3; glicina 0,192 M; SDS 0,1%)

## 2.2. Estándares de peso molecular

Se empleó el kit comercial de Sigma Chemical Company

- Albúmina sérica bovina (66 000 Da)
- Ovoalbúmina (45 000 Da)
- Lisozima (14 300 Da)

## 2.3. Electroforesis

- Stock de acrilamida (acrilamida 30%, bis-acrilamida 0,8%).
- Tetra etil metilen diamino (TEMED).
- Persulfato de amonio (PSA 10%).
- Sodio dodecil sulfato (SDS).
- Azul brillante de Coomassie R-250.
- Solución decolorante (metanol, ácido acético, agua).

#### **2.4. Gel para cromatografía**

- Columna de filtración molecular de Sephadex G-100.

#### **2.5. Agentes modificadores de la actividad enzimática**

- Fenil Metil Sulfonil Fluoruro (PMSF)
- Ácido etilen diamino tetracético (EDTA)

#### **2.6. Otros**

- TNBS (2, 4, 6 ácido trinitrobencenosulfónico).
- BApNA (benzoil Arginil p-nitroanilida).
- TCA (ácido tricoloacético) concentrado.
- Ácido acético concentrado.
- Cloruro de Calcio 0,025 M.
- Citrato de sodio 3,8%.
- Reactivo de Folin–Ciocalteu (1/6).
- Sulfato de cobre 2%.
- Tartrato de sodio y potasio 4%.
- Carbonato de sodio 4%.
- Pipetas automáticas.
- Equipo de disección.
- Frascos de polietileno.

#### **2.7. Instrumental de vidrio**

- Homogenizador de émbolo
- Probetas graduadas de 10, 100 y 250 mL.

- Pipetas de vidrio graduadas de 1, 2, 5 y 10 mL.
- Tubos de ensayo (13 x 100 mm).
- Tubos de ensayo (10 x 75 mm).
- Beakers de 50, 100 y 250 mL.

## **2.8. Equipos**

- Equipo para cromatografía en columna.
- Colector de fracciones automático LKB – Pharmacia.
- Balanza analítica, Ainsworth.
- Baño de temperatura graduable, Memmert.
- Equipo de electroforesis en placa vertical, SIGMA ALDRICH.
- Espectrofotómetro UV, Shimadzu 120-02.
- Fotocolorímetro, Spectronic Bausch & Lomb.
- Fuente de poder para electroforesis, Duostat Beckman.
- Potenciómetro digital, Orion Research 610
- Centrífuga Sorvall Instruments modelo Easy Spin.
- Microcentrífuga, Denver Instrumental.
- Estereoscopio (Bausch & Lomb).

### **3. Métodos**

#### **3.1. Determinación de la cantidad de proteína**

El contenido proteico se evaluó usando los siguientes métodos:

##### **Método de absorción de luz ultravioleta (UV)**

Se utilizó el método de Warburg y Christian (1941) midiendo la absorbancia de luz UV a 280 nm de los radicales aromáticos de las proteínas en un espectrofotómetro Shimadzu UV, cuantificando el contenido proteico crudo, así como las fracciones colectadas en el proceso de purificación.

##### **Método de Lowry**

Se empleó el método descrito por Lowry *et al.*, (1951) modificado por Loayza *et al.*, (1985), basado en la reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu por la oxidación de aminoácidos aromáticos en una reacción catalizada por cobre. Se usó un fotolorímetro Bausch & Lomb Spectronic-20, provisto de un fototubo y un filtro infrarrojo para la medición de la lectura a una longitud de onda de 660 nm.

#### **3.2. Actividades enzimáticas**

Se investigaron las siguientes actividades tanto sobre el veneno crudo como sus fracciones.

##### **A. Hialuronidasa**

Basándonos en el método turbidimétrico de Di-Ferrante, (1955) modificado en este laboratorio por Hurtado *et al.*, 2007; se preparó la mezcla de reacción que contenía 0,3 mL de buffer acetato de amonio a 0,05M pH 5,0 con NaCl 0,15 M; 0,1 mL de ácido hialurónico comercial 0,5 mg/mL diluido en el mismo buffer, se agregó 0,1

mL de veneno de *L. laeta* y se incubó a 37°C por 15 minutos. La reacción fue detenida con 2 mL de Bromuro Cetil trimetil Amonio (BCTA) 2,5% en NaOH 2%, midiéndose la absorbancia a 400 nm con un volumen final de 2,5 mL.

La mezcla turbia y parcialmente insoluble formada por el ácido hialurónico y el BCTA, la cual detiene la actividad al elevar el pH hasta 12,5 tiene una absorbancia proporcional a la concentración del mucopolisacárido, la actividad enzimática se expresó en unidades Di-Ferrante por mg de proteína. Una unidad Di-Ferrante equivale a la reducción del 50% de la turbidez inicial generado por 0,1 mg de ácido hialurónico.

### **B. Fosfolipasa A<sub>2</sub>**

Se usó el método del retardo de la coagulación de la yema de huevo (Vidal y Stoppani, 1971), empleándose como sustrato yema de huevo al 45% en buffer Tris-HCl Ca<sub>2</sub>Cl 10 mM a pH 7,6; a esta mezcla se añadió 50 µL del veneno crudo o las fracciones y se incubó a 37°C durante 10 minutos, seguidamente los tubos se colocaron a 100°C donde se evaluó el retardo de la coagulación del sustrato con respecto al blanco que no contenía el veneno en estudio.

La actividad específica fue calculada con respecto al tiempo de retardo de coagulación de la lipoproteína de yema de huevo por minuto y por miligramo de proteína de estudio.

### **C. Fosfatasa alcalina**

Se utilizó el protocolo de Sulkowsky *et al.* (1963), modificado por Yarlequé *et al.*, 1983; la mezcla de reacción contenía: 0,5 mL de para nitrofenil fosfato 0,001 M; 0,4 mL de buffer Glicina-NaOH 0,1 M pH 9,5; 0,1 mL MgCl<sub>2</sub> 0,1 M y 50 µL de

veneno. Luego de 20 minutos de incubación a 37°C se detuvo la reacción con 2 mL de NaOH 0,2 N, midiéndose la absorbancia a 400 nm.

#### **D. Amidolítica**

Fue determinada por el método de Erlanger *et al.* (1961) empleando el sustrato cromogénico Benzoil-Arginil-p-Nitroanilida (BApNA) midiéndose la liberación de p-Nitroanilina a 405 nm.

La mezcla de reacción contenía 1 mL de BApNA a una concentración de  $9 \times 10^{-4}$  M; 0,5 mL de buffer Tris-HCl 0,05 M pH 8,1 y 50  $\mu$ L del veneno crudo o las fracciones correspondientes. Luego de incubar por 15 minutos a 37°C se adicionó 1 mL de ácido acético al 60% para detener la reacción y luego medirla a 405 nm.

#### **E. Pro-coagulante**

Se usó el método descrito por Yarlequé *et al.* (1986), que consiste en medir el tiempo de recalcificación del plasma humano citratado cuando se adiciona el cloruro de calcio 0,025 M.

Se colocó en un tubo de ensayo (10x75 mm) 0,2 mL de plasma humano citratado, 50  $\mu$ L de veneno o fracciones incubándose por 5 minutos a 37°C, luego se adicionó 0,1 mL de  $\text{CaCl}_2$  0,025 M registrándose el tiempo, en segundos, requeridos para la coagulación. El tubo control se preparó reemplazando la muestra de veneno por solución salina 0,85%. La acción pro-coagulante fue calculada por la regla de tres inversa, considerando como 100% el tiempo normal de recalcificación.

## **F. Proteolítica**

Se ensayaron 2 metodologías:

### **i. Actividad sobre caseína**

Se determinó mediante el método de Kunitz, modificado por Takahashi y Ohsaka (1970), donde se midió la liberación de ácidos solubles producto de la digestión enzimática.

La mezcla de reacción contenía 1 mL. de caseína al 1% en buffer Tris-HCl 0,2 M pH 8,5; 0,5 mL de agua destilada y 50  $\mu$ L del veneno en estudio o sus respectivas fracciones. La mezcla se incubó a 37°C durante 30 minutos, luego se agregó ácido tricloro acético (TCA) 0,44 M en frío para detener la reacción y se llevaron los tubos a centrifugación a 4 000 rpm durante 15 minutos. Finalmente se midió la absorbancia a 280 nm de los productos ácidos solubles.

### **ii. Actividad sobre dimetilcaseína (DMC)**

El protocolo utilizado se basó en el trabajo publicado por Lin *et al.*, 1969 y modificado por Sánchez *et al.*, 2002; para ello los tubos de reacción contenían 250  $\mu$ L de Dimetilcaseína 0,2% y 250  $\mu$ L de buffer fosfato 0,1M pH 8,0 que fueron pre incubados a 37°C durante 5 minutos, luego de ello, se agregó la muestra (20-50  $\mu$ L) dejándola reaccionar a la temperatura ya mencionada durante 5 minutos. Inmediatamente después se detuvo la reacción colocando los tubos en agua a 100°C por dos minutos, después se adicionó 250  $\mu$ L del reactivo TNBS 0,5% y 250  $\mu$ L de NaHCO<sub>3</sub> 4% pH 8,0; dejándose durante 30 minutos a 50°C en oscuridad. Luego, se retiraron los tubos del baño de temperatura y se agregó 250  $\mu$ L de SDS 10% y 125

$\mu$ L de HCl 1,0 N para leer la absorbancia a una longitud de onda de 340 nm.

### **3.3. Fraccionamiento del veneno**

Usando 9,2 mg del extracto glandular venenoso de *L. laeta* diluido en buffer acetato de amonio 0,05 M pH 5,0 se procedió a realizar el fraccionamiento en una columna de filtración molecular sobre Sephadex G-100 (32,5 x 0,58 cm) con un volumen total de 34,3 mL, previamente equilibrada con el mismo buffer. Se colectaron volúmenes de 1 mL por fracción con un flujo de 10 mL/hora a temperatura ambiente. Las fracciones fueron leídas a una longitud de onda de 280 nm en un espectrofotómetro Shimadzu.

Adicionalmente en cada fracción se midieron las actividades de fosfatasa alcalina, hialuronidasa, amidolítica, proteolítica y pro-coagulante, tal como se describió previamente.

### **3.4. Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil-sulfato de sodio (SDS-PAGE)**

Se utilizó el protocolo de Laemmli (1970) usando concentraciones de 10% y 12% de acrilamida para analizar la pureza de la proteína, así como para conocer su peso molecular. Para ello se empleó 30  $\mu$ g del conjunto de fracciones que presentaban actividad proteolítica, se analizó también los otros picos proteicos expresados en el cromatograma, además del veneno crudo. Se usó como proteínas patrones a la albúmina sérica bovina (66 kDa), ovoalbúmina (45 kDa) y lisozima (14,3 kDa).

Las proteínas en estudio fueron tratadas con buffer muestra para PAGE-SDS tanto en condiciones reductoras, es decir en presencia de  $\beta$ -mercaptoetanol, y no reductoras. Luego se puso las muestras en el gel de poliacrilamida e inmediatamente fueron sometidas a una corriente eléctrica de 100 voltios durante 2 horas. Al finalizar la

corrida, el gel fue teñido con azul brillante de Coomassie al 0,1% por 15 minutos y luego decolorado con sucesivas lavadas con solución decolorante: metanol, ácido acético, agua (25: 8: 67 respectivamente), hasta visualizar las bandas de proteínas.

### **3.5. Diferenciación entre metalo y serino-proteasas**

Para ello se usaron inhibidores específicos que permitieron conocer si la entidad proteolítica en evaluación corresponde a uno de estos dos grupos.

**A.** Para el caso de metaloproteasas, se usó el agente EDTA a concentraciones finales variables en el rango de 1,25 a 15 mM, se mezcló 60  $\mu$ L de la enzima (0,130 mg/ml) y 20  $\mu$ L del agente inhibidor pre-incubándose por 10 minutos a 37°C, luego se tomó 30  $\mu$ L y se midió la actividad proteolítica sobre dimetilcaseína y pro-coagulante sobre plasma humano citratado.

**B.** Para el caso de las serinoproteasas, se midió la actividad en presencia del inhibidor específico fenil metil sulfonil fluoruro (PMSF) dirigido a serina, en concentraciones finales crecientes de 1,25 a 5 mM, se mezcló 30  $\mu$ L de la enzima (0,390 mg/mL) con 30  $\mu$ L de agente inhibidor pre-incubándose por 10 minutos a 37 °C, luego se tomó 20  $\mu$ L de la mezcla y se midió la actividad proteolítica sobre dimetilcaseína y pro-coagulante sobre plasma humano citratado.

### **3.6. Reactividad Inmunogénica.**

#### **Antigenicidad de las enzimas en estudio**

La reactividad de las proteasas aisladas, fueron ensayadas con el antiveneno loxoscélico comercial mediante la técnica de inmunodifusión doble (Ouchterlony y

Nilsson, 1978). Para ello se prepararon geles de agarosa al 1% en buffer fosfato 0,15M pH 7,0, esta solución se extendió en una placa Petri dejándose enfriar por 10 minutos hasta su gelificación. Se hicieron 4 pocillos equidistantes de iguales dimensiones, en uno de ellos se colocó 20 µL de suero antiloxoscélico, en los pocillos laterales se colocaron el mismo volumen de veneno total o de las enzimas aisladas y en otro albúmina sérica bovina (BSA) 2 mg/mL como control negativo. La difusión se llevó a cabo en una cámara húmeda a 4°C durante 72 horas, luego de lo cual se realizaron 2 lavados, con intervalos de 2 horas, con buffer fosfato 0,15M pH 7,2.

### 3.7. ACTIVIDAD HEMORRÁGICA

Empleando el método de Kondo *et al.* (1960), modificado por Isla *et al.* (2003) se probaron las fracciones que presentaban actividad proteasa en ratones de la cepa Balb C (18-22 g) vía intradérmica. Luego de dos horas los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y se les removió la piel de la zona abdominal para calcular el diámetro y área hemorrágica producida en el lado interno, midiendo el área con ayuda de un papel milimetrado. De acuerdo a ello se calculó el diámetro hemorrágico usando:

$$\text{Diámetro hemorrágico} = 2x. \sqrt{\frac{\text{área hemorrágica}}{\pi}}$$

## RESULTADOS

### 1. CONTENIDO PROTEICO DEL VENENO GLANDULAR DE *L. laeta*

En las extracciones glandulares realizadas a las arañas, se cuantificó el contenido proteico por el método de Lowry, obteniendo una cantidad promedio de 119,5 µg. veneno/araña, en un rango que varía entre 87 a 166 como se aprecia en la tabla N° 1. Para ello se tomaron sólo las arañas hembras y adultas, procedentes de la misma zona de muestreo.

### 2. ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS DETECTADAS

Los resultados de las pruebas enzimáticas realizadas tanto con el veneno crudo, como con las fracciones obtenidas se muestran en las tablas N° 2 y 3. De todas las actividades ensayadas se verificó y cuantificó las actividades de hialuronidasa, proteasa, tanto sobre caseína, como sobre dimetilcaseína y la actividad pro-coagulante; por otro lado, las actividades fosfolipasa del tipo A<sub>2</sub>, fosfatasa alcalina y amidolítica no fueron detectadas.

### 3. FRACCIONAMIENTO DEL VENENO

El veneno crudo de *Loxosceles laeta* se fraccionó empleando un gel de filtración molecular sobre Sephadex G-100. Trabajando con 9,2 mg de veneno se obtuvieron 3 picos proteicos (Fig. N° 1). El análisis de la relación cromatográfica ( $V_e/V_0$ ) de los 3 picos proteicos obtenidos se puede observar en la Tabla N°4.

Con las fracciones obtenidas se ensayaron las actividades hialuronidasa, proteasa y pro-coagulante (Fig. N° 2). La enzima hialuronidasa se ubicó en la subida del segundo pico proteico, mientras la proteasa se encuentra entre la bajada del segundo

y la subida del tercer pico, así mismo, la enzima pro-coagulante se ubica en el tercer pico.

En las tablas N° 5 y 6 se indican los valores de actividad específica y la posición cromatográfica relativa para cada una de las enzimas.

La actividad proteolítica sobre caseína y dimetilcaseína registran valores diferentes (tabla N° 5), siendo el método para DMC el de mayor sensibilidad a juzgar por la cantidad de enzima utilizada y los valores de actividad obtenida. Usando caseína como sustrato los valores de purificación y rendimiento fueron 20,1 veces y 41,4%, en tanto que con DMC los valores fueron de 13,3 veces y 85,2% respectivamente.

Para la actividad hialuronidasa se obtuvo una purificación de 6,6 veces y un rendimiento de 37,2%, en cuanto a la actividad pro-coagulante los valores de rendimiento y purificación fueron del 87% y 7,43 veces, respectivamente.

#### **4. CARACTERÍSTICAS DE LAS ENZIMAS EN ESTUDIO**

##### **4.1. Análisis electroforético**

Mediante la técnica PAGE-SDS se determinó el número de bandas proteicas correspondientes tanto al veneno crudo, como a los 3 picos proteicos, así como a las enzimas identificadas; estableciéndose los rangos de pesos moleculares (Tabla N° 7). El veneno crudo presentó un total de 24 bandas proteicas, con un rango de peso molecular va de 15,9 a 97 kDa. La enzima con actividad proteolítica inespecífica se evidenció como una banda prominente de 35 kDa, la cual persiste en condiciones reductoras, de lo que se puede inferir que se trata de una proteína monomérica (Fig. N° 4). En cuanto a la proteína pro-coagulante, su peso molecular fue de 15.9 kDa (Fig. 5).

#### **4.2. Efectos de agentes químicos**

En las tablas N° 8 y 9 se muestran los resultados obtenidos al evaluar el efecto del agente quelante EDTA y del PMSF, inhibidor dirigido a la serina. Con EDTA en concentraciones de 1,25 a 15 mM se observó que con una concentración de 5 mM el porcentaje de inhibición de la enzima proteolítica empleando DMC como sustrato fue de 60,4%; con 3,2 mM de PMSF se obtuvo un máximo de inhibición de 7% sobre la enzima pro-coagulante. En cambio en el caso de la enzima pro-coagulante al tratarla con 2,5 mM de PMSF el porcentaje de inhibición registrado fue de 93,3%, es decir una severa inhibición.

#### **5. REACTIVIDAD INMUNOGÉNICA DE LAS ENZIMAS AISLADAS**

En las pruebas de inmunodifusión doble se nota en la Fig. N° 5 que, tanto el veneno crudo como la enzima proteolítica, son reconocidas por el antiveneno loxoscélico comercial al formarse bandas de precipitina y para el caso de la enzima pro-coagulante ocurre también la aparición de bandas de precipitina, pero de menor intensidad.

#### **6. ACTIVIDAD HEMORRÁGICA**

Probando la fracción proteolítica en ratones albinos no se encontró actividad hemorrágica sobre éstos, al revisar la parte interior de la piel.

## DISCUSIÓN

### **Contenido del veneno de *L. laeta***

Los venenos de origen animal se caracterizan por su alto contenido proteico, el cual fluctúa entre el 50 y 95% del peso total de la ponzoña, las proteínas constituyentes son diversas y algunas de ellas típicas de cada veneno, estas proteínas pueden clasificarse en 3 grupos: enzimas, toxinas y principios de acción biológica selectiva (Stocker, 1974; Chippaux *et al.*, 1991).

Teniendo que, en la mayoría de los casos el veneno es un vehículo de acción rápida sobre la presa para inmovilizarla, matarla y digerirla; las enzimas cumplen un rol fundamental actuando sobre proteínas tisulares y plasmáticas (proteasas), sobre fosfolípidos de diferentes clases (fosfolipasas) y sobre los componentes de la cascada de coagulación interfiriendo en su actividad; así mismo, existen enzimas que degradan DNA y RNA, componentes fosfatados, entre ellos nucleótidos, ácido hialurónico y L-aminoácidos, en este último caso vía desaminación oxidativa. El segundo grupo corresponde a las toxinas, que actúan sobre el sistema nervioso central o periférico, a nivel pre y/o post sináptico y que tienen alta especificidad y eficacia para paralizar y matar a sus presas. Además se encuentran cardiotoxinas, miotoxinas y nefrotoxinas entre otros.

Adicionalmente se ha encontrado en los venenos, especialmente de origen ofídico, proteínas de importancia médica, tales como las lectinas de tipo C y las desintegrinas, estas últimas asociadas a la inhibición de la metástasis y la angiogénesis en tumores cancerígenos. También existen péptidos que inducen hemólisis directa, especialmente en los venenos de abejas y avispas; así como proteínas hemorrágicas de diferentes clases, sin dejar de mencionar a inhibidores proteolíticos como el inhibidor de angiotensinasa renal.

En el caso de las arañas, dado su pequeño tamaño y el hecho de alimentarse, fundamentalmente de insectos, se puede asumir que sus venenos sólo son capaces de actuar sobre tales presas, sin embargo, se sabe que además de las insecto-toxinas, pueden estar presentes toxinas dirigidas a mamíferos, las cuales ejercen diversas acciones biológicas, esto obedece a la presencia en el veneno de compuestos encargados de defender a la araña, quien es víctima natural tanto de mamíferos, como aves, reptiles e inclusive otras arañas. Un detalle muy interesante acerca de estos artrópodos ha sido el aislamiento de algunas enzimas de acción marcadamente tóxica, tales como la esfingomielinasa D del veneno de *Loxosceles reclusa*, la cual se comporta como una dermatoxina y nefrotoxina. Así también, la  $\alpha$ -latrotoxina, neurotoxina que afecta a los mamíferos presente en el veneno de *Latrodectus mactans*, entre otras.

Algunos arácnidos como las arañas *L. mactans* y *Phoneutria negriventer* poseen potentes neurotoxinas siendo ésta última responsable de numerosos accidentes mortales en Brasil y cuya presencia en la amazonia peruana ya ha sido reportado (Maguiña *et al.*, 2008). Los escorpiones son otro grupo de arácnidos que presentan toxinas mortales para el hombre, como las halladas en el veneno de *Tytus serrulatus*, especie que causa una alta mortandad en niños y ancianos, especialmente en los estado de Paraná y Minas Gerais en Brasil.

Los reportes previos en la presente investigación permiten afirmar que el veneno de *L. laeta* es un complejo proteico. Lo típico en cada caso es la variabilidad de los componentes y por ende el cuadro clínico que podrían originar al producir accidentes en humanos.

Si bien es cierto que en la extracción del veneno por estimulación eléctrica, éste se obtiene líquido y sin contaminantes, como restos de quelíceros, el principal riesgo con este método es la contaminación del veneno con el contenido estomacal de la araña,

procurando tener mucho cuidado al momento de la extracción, además, pulsos entre 5 y 15 voltios que se usan comúnmente causan a la larga la muerte de los animales luego de 3 ó 4 extracciones. El otro procedimiento: la extracción glandular, con el consiguiente sacrificio de la araña, nos permite separar el veneno del resto del contenido por un procedimiento mecánico, que a pesar de su sencillez genera pérdida parcial del material, además de matar al espécimen.

La cantidad de proteínas en el veneno de *L. laeta*, que se aprecia en la tabla N° 1 y que se encuentran en el rango de 86,7 a 166 µg. veneno/araña, fueron obtenidos empleando sólo especímenes hembras y adultos, además el último dato de dicha tabla muestra una extracción obtenida usando tanto hembras como machos, evidenciando la disminución de la cantidad de proteína, a pesar de contar con un mayor número de especímenes. Esta proporción ya encontrada en otros trabajos (Yarlequé *et. al*, 1985; Suarez *et al*, 1983) muestra que el contenido proteico venenoso en el caso de los machos es inferior en comparación con las hembras; adicionalmente, factores como edad y estado alimentario influyen bastante en este aspecto, pero el control de estos factores demandan una mayor inversión de tiempo; sin embargo, con un grupo de las *Loxosceles* en estudio se hizo una prueba para controlar la alimentación y desarrollo en condiciones de laboratorio, manteniendo por un lapso de 6 meses los especímenes en buen estado, brindándoles larvas de *Musca domestica* como alimento.

A pesar de lo anterior, se puede remarcar que cantidades tan pequeñas de proteína son capaces de generar cuadros dermonecróticos y/o viscerohemolíticos de gran severidad en el hombre, que pueden conducir a la muerte, sabiendo aún, que el hombre no es la presa natural de este arácnido y la mordedura ocurre fundamentalmente por razones de defensa.

Todo ello implica un trabajo destinado a tipificar un veneno, tomando como base su contenido proteico en el lumen glandular o en la glándula total. En este aspecto, se debe realizar un cuidadoso trabajo destinado a obtener un veneno de alta pureza, ya sea por extracción glandular total o usando pulsos de bajo voltaje que dan lugar a la liberación de este compuesto biológico.

### **Análisis de las proteasas presentes en el veneno**

En la figura N° 1 se muestra el perfil cromatográfico obtenidos al fraccionar el veneno de *L. laeta*. En primer lugar puede señalarse que la cromatografía de filtración molecular sobre Sephadex G-100 fue idónea para separar al menos en 3 fracciones el contenido proteico total. A juzgar por la posición relativa de los 3 picos proteicos, la separación lograda fue suficientemente resolutive para establecer por un lado los picos proteicos y por otro la posición de la proteasa inespecífica que actúa sobre caseína y DMC, así como la proteasa específica, que se evidenció por su acción pro-coagulante en la porción correspondiente al tercer pico proteico (Figura N°2).

Adicionalmente se ha logrado fraccionar la actividad de hialuronidasa, enzima que por su naturaleza termolábil no sólo es difícil de identificar sino mantenerla en el tiempo. Como puede notarse en la tabla N° 4 la relación  $V_e/V_0$  de las 3 actividades están debidamente diferenciadas.

Al complementar el fraccionamiento del veneno con el análisis electroforético, se puede apreciar la drástica reducción de bandas proteicas de dichas fracciones con respecto al veneno crudo, determinándose el peso molecular de la enzima en estudio.

La sensibilidad de la actividad proteolítica sobre DMC desarrollada cuidadosa y expertamente para este trabajo permitió una fácil detección, identificación, así como

separación de la enzima. Los valores de rendimiento y purificación de la enzima aislada son mayores que usando la técnica sobre caseína.

Sabiendo que la DMC está conformada por la molécula de caseína, a la que se adiciona químicamente 2 grupos metilos, cuando la proteasa de *L. laeta* reconoce el sustrato, éste es escindido y los residuos amino liberados reaccionan con el reactivo cromóforo ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS) formando un complejo coloreado que es reconocido y cuantificado a una longitud de onda de 340 nm. Con esta técnica se puede emplear cantidades menores de enzima (10 veces) que cuando se trabaja con caseína; esto permitió realizar los trabajos de caracterización de la enzima aislada al tomar volúmenes pequeños para las pruebas. Para esta investigación esto fue un punto importante, ya que al trabajar con extractos glandulares de araña el principal problema fue la baja cantidad de veneno.

El trabajo de estandarización de esta técnica a las condiciones de laboratorio fue laborioso desde que se redujeron los volúmenes de los reactantes sin afectar la sensibilidad de la prueba. Así pues, se dispone a partir de la fecha de un nuevo método para medir actividad proteolítica empleando en este caso DMC. Por otro lado, la falta de actividad coagulante es decir de la enzima similar a trombina, que está presente en muchos venenos ofídicos, tendría dos explicaciones: el veneno carece de actividad sobre el fibrinógeno y los factores de coagulación o más bien algunos de estos factores son sensibles a la escisión enzimática. Habiéndose demostrado en 1986 (Yarlequé *et al.*) la presencia de actividad pro-coagulante en el veneno crudo de *L. laeta*, la posibilidad de obtener este componente parcialmente purificado a través de la cromatografía de filtración en Sephadex G-100, era atractiva, lo que motivó también su exploración.

Como se observa en las figura N° 2 existe una fracción pro-coagulante debidamente separada de la fracción proteolítica inespecífica. Es interesante observar que el reactivo

dirigido a serina, es decir PMSF sólo inhibe la actividad pro-coagulante, pero no la proteasa inespecífica, mientras que el EDTA, agente quelante de iones divalentes produce una severa inhibición de la actividad proteolítica sobre DMC.

Entonces es posible diferenciar a estas enzimas por la arquitectura de su sitio activo, ya que en el caso de las proteasas, la presencia del ión calcio u otro ión divalente es crucial para esta actividad. En cambio, la fracción pro-coagulante se trataría de una típica serinoproteasa, en lugar de una metaloproteasa como la anterior. Al respecto, las serinoproteasas son enzimas muy específicas capaces de promover la coagulación activando uno o más factores pro-coagulantes, En estos casos se refiere específicamente a proteínas activadoras del factor II (activadores de pro-trombina) o del factor X, que es el factor central de la cascada de coagulación por vía intrínseca y extrínseca. La determinación precisa de cual activador proteico dispone este veneno se realizaría en investigaciones futuras usando sustratos cromogénicos específicos.

Adicionalmente la presencia de hialuronidasa propone nuevos retos exploratorios. Por un lado, es necesario investigar la estabilidad de esta enzima que como ya se mencionó es muy pobre en la mayoría de los venenos, pero que al parecer tiene una mayor resistencia al tratamiento cromatográfico de acuerdo con los resultados obtenidos. Inicialmente, el solo hecho de la existencia de esta enzima se relacionaría con la capacidad difusora del veneno tal como se ha demostrado en estudios sobre esta enzima en venenos de serpientes.

### **Análisis electroforético.**

Una vez detectadas las actividades enzimáticas y observando que no coincidían con los picos proteicos se pasó a “juntar” tanto las fracciones donde se detectó actividad, así como aquellas que comprendían los picos sin actividad bioquímica. En este punto la figura

N° 4 muestra claramente las diferencias en los contenidos de los picos proteicos, donde en el primer pico proteico se encuentran la mayoría de los componentes del veneno con pesos superiores a 65 kDa, el segundo pico contiene 7 bandas de mediano peso molecular y el tercer pico se muestra vacío, esto posiblemente al hecho de que las proteínas presentes en dicho pico son de un peso molecular inferior a 14,3 kDa, o a la baja cantidad de proteína presente en estas fracciones

Otro aspecto importante en mencionar es lo referido a las diferencias de los pesos moleculares establecidos a partir de este trabajo para el veneno total, que fluctúan en un rango de 15,9 a 97 kDa, y el de las enzimas en estudio registrando la proteasa un valor de 35 kDa, la enzima pro-coagulante un peso menor y la enzima hialuronidasa un peso mayor.

### **Rol del antiveneno loxoscélico**

Toda la literatura experimental acerca de los venenos de origen animal ha demostrado que la única terapia específica para combatir el envenenamiento de este tipo, es con el uso de un antiveneno o suero anti-arácnido, el cual también se denomina más específicamente suero antiloxoscélico, producto biológico producido en el Perú únicamente por el INS.

La prueba de inmunodifusión doble, realizadas en este estudio (Figura N° 7) muestra claramente la reactividad inmunogénica de los componentes del veneno de *L. laeta* ya que forman líneas de precipitina con el antiveneno loxoscélico empleado. Aun cuando las concentraciones finales de las metalo proteasas fueron bajas (0,2 mg/mL), se pudo verificar su reactividad antigénica, al igual que el veneno crudo. No obstante la serinoproteasa o proteína pro-coagulante no fue ensayada por el momento, teniendo en cuenta el poco material recuperado. A pesar de ello, se asume que tanto la proteína pro

coagulante como la hialuronidasa tienen reactividad antigénica, teniendo en cuenta que sus pesos moleculares están por encima de 15 kDa.

Como se deduce de todo lo expuesto aún quedan aspectos muy relevantes por investigar en trabajos futuros. Empero, se ha logrado diferenciar claramente las fracción proteolítica inespecífica y específica de este veneno, además de desarrollar una importante técnica microcuantitativa para medir la actividad proteolítica inespecífica.

La presencia de arañas en los ambientes naturales a despecho de las creencias populares, constituye un eslabón ecológico de máxima importancia en el control de insectos, puesto que los arácnidos en general y *L. laeta* en particular, son especies que se alimentan de moscas, zancudos y otros insectos potencialmente dañinos para el hombre. Como ya se ha dicho las mordeduras en seres humanos son fortuitos y provocados directa o indirectamente por el hombre al tratar de alejarlas o matarlas.

## CONCLUSIONES

1. El veneno de la araña *Loxosceles laeta* contiene proteasas y hialuronidasa dentro de la composición de su veneno.
2. La proteasa inespecífica es una metaloproteasa de bajo peso molecular (35 kDa) y es de naturaleza monomérica.
3. El veneno presenta una proteasa específica con actividad pro-coagulante.
4. La enzima pro-coagulante es una serinoproteasa.
5. Ninguna de las fracciones proteolíticas posee actividad hemorrágica al hacer pruebas *in vivo*.
6. El suero antiloxoscélico comercial del INS-Perú reconoce tanto al veneno crudo como a las proteasas en estudio.

## RECOMENDACIONES

- Estandarizar un protocolo de crianza y mantenimiento de arañas en condiciones de laboratorio.
- La obtención del veneno debe ser complementado con aquel obtenido por estimulación eléctrica, para evitar contaminantes.
- Los alcances del presente trabajo permitirán dar soporte a las investigaciones preclínica y clínicas para el desarrollo de nuevos sueros antiloxoscélicos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Aguilar P. Fauna desértico-costera peruana invertebrados más frecuentes en las lomas. Revista Peruana de Entomología 1976; 19(1): 67-70.

Barbaro K, Cardoso JLC, Eickstedt VRD, Mota I. Dermonecrotic and lethal components of *Loxosceles gaucho* venom. Toxicon 1992; 30(3):331-338.

Bowles DE, Swaby JA. Field Guide to Venomous and Medically Important Invertebrates Affecting Military Operations: Identification, Biology, Symptoms, Treatment. USAF Institute for Operational Health, Version 2.0, 2006 July 31.

Bucherl W. Biology and venoms of the most important South American spiders of the genera *Phoneutria*, *Loxosceles*, *Lycosa*, and *Latrodectus*. Am. Zool. 1969; 9: 157–159.

Chippaux, J.; Williams, V., and White, J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. Toxicon 1991; 29: 1279-1303.

Chaim OM, Tresvisan-Silva D, Chavez-Moreira D, Wille ACM, Ferrer VP, Matsubara FH, Mangili OC, da Silveria RB, Gremski LH, Gremski W, Senff-Ribeiro A, Veiga SS. Brown spider (*Loxosceles* genus) venom toxins: tools for biological purposes. Toxins 2011; 3: 309 – 44.

Coddington JA. Phylogeny and classification of spiders. En: Ubick D, Paquin P, Cushing PE. and V. Roth, Editores. Spider of North America: an identification manual. American Arachnological Society; 2005 .p. 18-24.

Da Silveira RB, dos Santos Filho JF, Mangili OC, Viega SS, Gremski W, Nader H, Von Dietrich CP. Identification of proteases in the extract of venom glands from brown spiders. Toxicon 2002; 40(6): 815-22.

Da Silveira RB, Chaim OM, Mangili O, Gremski W, Dietrich CP, Nader H, Veiga SS. Hyaluronidases in *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom are endo- $\beta$ -N-acetyl-D-hexosaminidases hydrolases. *Toxicon* 2007; 49(6): 758 – 68.

Devaraja S, Nagaraju S, Mahadeswaraswamy YH, Girish KS, Kemparaju K. A low molecular weight serine-protease: purification and characterization from *Hippasa agelenoides* (funnel web) spider venom gland extract. *Toxicon* 2008; 52: 130-138.

Dirección de Salud I Callao-Ministerio de Salud, Boletín epidemiológico 2008, SE. N°4 del 20/01 al 26/01/2008.

Estadísticas de accidente por animales ponzoñosos, 2007 – INS.

Fan T, Wang J, Yuan W, Zhong Q, Shi Y, Cong R. Purification and characterization of hatching enzyme from brine shrimp *Artemia salina*. *Acta Biochim Biophys Sin* 2010; 165–171.

Feitosa L, Gremski W, Veiga SS, Elias MCQB, Granner E, Mangili OC, Brentani RR. Detection and characterization of metalloproteinases with gelatinolytic, fibronectinolytic and fibrinogenolytic activities in brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. *Toxicon* 1998; 36(7): 1039-1051.

Futrell JMJ. Loxoscelism. *The American Journal of the Medical Sciences* 1992; 304(4): 261-267.

García PJ, Yarlequé A, Bonilla-Ferreyra C, Pessah S, Vivas D, Sandoval G, Lazo F. Características bioquímicas y evaluación preclínica de un antiveneno liofilizado contra el veneno de la serpiente *Bothrops atrox*. *Rev. Peru Med. Exp. Salud Publica* 2008; 25(4): 386-390.

Gertsch WJ. The spider genus *Loxosceles* in South America (Araneae, Scytodidae). Bulletin of the American Museum of Natural History 1967; 136 Art. 3.

Gómez de la Torre G, Zavaleta A, Castro de la Mata R, Arana MM, Yarlequé A. El conejo: un modelo experimental de loxoscelismo cutáneo viscerohemolítico. DIAGNOSTICO 1986; 18(3): 65-73.

Guimarães G, Dias-Lopes C, Duarte CG, Felicori L, Machado de Avila RA, Figueiredo LFM, de Moura J, Faleiro BT, Barro J, Flores K, Silva W, Tintaya B, Yarleque A, Bonilla C, Kalapothakis E, Salas CE, Chávez-Olortegui C,\* Biochemical and immunological characteristics of Peruvian *Loxosceles laeta* spider venom: Neutralization of its toxic effects by anti-loxoscelic antivenoms. Toxicon 2013; 70: 90–97.

Gutierrez JM. Determinación de actividades tóxicas de venenos de serpientes y su neutralización por anti venenos - Manual de métodos de laboratorio; Universidad de Costa Rica Facultad de Microbiología- Instituto Clodomiro Picado 2007.

Heredia V, Arbaiza E, Venegas J, Yarlequé A, Zavaleta, A. Aportes al estudio de las acciones proteolíticas, pro-coagulantes y caracterización electroforética de las proteínas de dos extractos tóxicos de venenos de *Loxosceles laeta*. Bol. Chil. Parasitol. 1989; 44: 8-16.

Kalapothakis E, Chatzaki M, Gonçalves-Dornelas H, de Castro CS, Silvestre FG, Laborne FV, de Moura JF, Veiga SS, Chávez-Olórtegui C, Granier C, Barbaro KC. The Loxtox protein family in *Loxosceles intermedia* (Mello-Leitao) venom. Toxicon 2007; 50(7): 938-946.

Lin Y, Means GE, Feeney RE. The action of proteolytic enzymes on N,N-dimethyl proteins. J. Biol. Chem. 1969; 244: 789–793.

Lowrie DC. Effects of diet on the development of *Loxosceles laeta* (Nicolet) (Araneae, Loxoscelidae). *The Journal of Arachnology* 1987; 15: 303-308.

Ministerio de Salud (Minsa). Manual de Animales Ponzosñosos, 2003. Lima, Perú.

Maguiña C, Soto L, Juárez A, Magnifico B, Villón A, Osoro F. Primer reporte de Phoneutrismo en el Perú. Presentación de dos casos. *Rev. Med Hered.* 2008; 19:128-133).

Monteiro CLB, Rubel R, Cogo LL, Mangili OC, Gremski W, Viega SS. Isolation and identification of *Clostridium perfringens* in the venom and fangs of *Loxosceles intermedia* (brown spider): enhancement of the dermonectrotic lesion in loxoscelismo. *Toxicon* 2002; 40(4): 409-418.

Nagaraju S, Devaraja S, kemparaju K. Purification and properties of hyaluronidase from *Hippasa partita* (funnel web) venom gland extract; *Toxicon* 2007; 50(3):383- 393.

Ouchterlony O, Nilsson L. Inmunodufussion and inmunolectrophoresis. *Handbook of experimental immunology* 1967; I(34):655-660.

Parra D, Torres M, Morillas J, Espinoza P. *Loxosceles laeta*, identificación y una mirada bajo microscopía de barrido. *Parasitol Latinoam.* 2002; 57:75-78.

Quintana JC, Otero R. Envenenamiento aracnídico en las Américas. *MEDUNAB* 2001.

Sanabria H, Zavaleta A. Panorama epidemiológico del loxoscelismo en el Perú. *Rev. Med. Exp. INS* 1997; XIV (2):33-41.

Schenone H, Saavedra T, Rojas A, Villaroel F. Loxoscelismo en Chile, estudios epidemiológicos, clínicos y experimentales. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 1989; 31(6):403-415.

Suarez G, Biggemann U, Schenone H. Effects of venom gland extracts of the South American brown spider, *Loxosceles laeta*, on *in vitro* protein synthesis. *Toxicon* 1983; 21(4):553-557.

Stocker, K.;Christ, w. and Leloup, P. Characterization of the venoms of various Bothrops species by immunoelectrophoresis and reaction with fibrinogen. *Toxicon*. 1974. 12:415-417.

Swanson DL, Vetter RS. Loxoscelism. *Clinics in Dermatology* 2006; 24:213-221.

Veiga SS, da Silveira RB, Dreyfuss JL, Haoach J, Pereira AM, Mangili OC, Gremski W. Identification of high molecular weight serine-proteases in *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. *Toxicon* 2000; 38(6):825-839.

Vetter, RS. Spiders of the genus *Loxosceles* (Araneae, Sicariidae): a review of biological, medical and psychological aspects regarding envenomations. *The Journal of Arachnology* 2008; 36:150–163.

Yarlequé A, Heredia V, Arbaiza E, Campos S, Zavaleta A. Contenido proteico y actividades enzimáticas presentes en el veneno de la araña casera *Loxosceles laeta* (II parte). *DIAGNOSTICO* 1985; 15(1):5-9.

Yarlequé A, Heredia V, Arbaiza E, Zavaleta A. Estudios electroforéticos y acción procoagulante del veneno de *Loxosceles laeta*. *DIAGNOSTICO* 1986; 17(2):39-45.

Zaragoza M, López R, Domínguez E, Santos J, Gaviro M. Loxoscelismo cutáneo. *EMERGENCIAS* 2008; 20:64-67.

Zavaleta Martínez-Vargas, Alfonso. Contribución al estudio del loxoscelismo experimental en conejo y discusión sobre las formaciones globulares presentes en el veneno; Tesis de bachiller en medicina. Universidad Peruana Cayetano Heredia. Lima – Perú. 1983.

Zavaleta A. Loxoscelismo, un problema de salud en el Perú. Bol. of Sanit. Panam. 1987; 103(4):378-86.

Zavaleta A, Castro de la Mata O, Salas M, Castro de la Mata R, Yarlequé A. Proyecto cooperativo interuniversitario UPCH-UNMSM. Loxoscelismo experimental: aspectos farmacológicos y anatomopatológicos. DIAGNOSTICO 1984; 14(6):163-173.

## **ANEXOS**

### **TABLAS Y FIGURAS**

**Tabla 1. Contenido proteico de las extracciones glandulares de *Loxosceles laeta*. (\*) Caso en el que se tomó machos y hembras**

Número de arañas	Cantidad de proteína (método de Lowry)		Volumen (mL)	Relación ( $\mu\text{g}$ veneno/ araña)
	Concentración	Proteína total		
	$\mu\text{g}/\mu\text{L}$	(mg)		
20	2,1	2,09	1	104,5
20	2,4	2,4	1	120
60	3,98	9,96	2,5	166
80	7,0	6,97	1	87,1
116	6,76 (*)	8,12	1,2	70

**Tabla 2. Actividades enzimáticas detectadas en el veneno crudo de *L. laeta***

Enzima	Sustrato	pH de reacción	Actividad enzimática
Hialuronidasa	Ácido hialurónico comercial	5,0	0,034
Proteasa 1	Caseína	8,5	0,061
Proteasa 2	Dimetilcaseína	8,5	0,341
Pro-coagulante	Plasma humano citratado	7,4	18%

**Tabla 3. Actividades enzimáticas en el veneno crudo**

Enzima	PROTEÍNA TOTAL (mg)	ACTIVIDAD ESPECÍFICA	UNIDADES TOTALES DE ACTIVIDAD
Hialuronidasa	9,2	17,7	162,84
Proteasa 1	9,2	7,2	66,24
Proteasa 2	9,2	0,57	5,24
Pro-coagulante	9,2	18	165,5

**Tabla 4. Relación cromatográfica de los picos proteicos obtenidos en el fraccionamiento del veneno crudo de *Loxosceles laeta*. Teniendo en cuenta  $V_0=11.4$  mL**

Pico proteico	D.O. 280 nm	Cantidad proteína (Lowry)	$V_e$	$V_e/V_0$	$V_e/V_t$
1	0,671	0,300	12	1,05	0,35
2	0,311	0,140	20	1,75	0,58
3	0,600	0,246	33	2,89	0,96

**Tabla 5. Actividades de las fracciones obtenidas sobre Sephadex G-100**

Enzima	PROTEÍNA TOTAL	ACTIVIDAD ESPECÍFICA	UNIDADES TOTALES DE ACTIVIDAD	PURIFICACIÓN	RENDIMIENTO (%)
Hialuronidasa	0,522	116	60,55	6,6	37,2
Proteasa 1	0,189	145	27,4	20,1	41,4
Proteasa 2	0,589	7,6	4,48	13,3	85,5
Pro-coagulante	1,077	133,7	144	7,4	87

**Tabla 6. Relaciones cromatográficas de las enzimas detectadas producto del fraccionamiento**

Enzima	$V_e$	$V_e/V_0$	$V_e/V_t$
Hialuronidasa	18	1,58	0,52
Proteasa 1	26	2,28	0,75
Proteasa 2	30	2,36	0,87
Pro-coagulante	37	3,02	1,07

**Tabla 7. Patrón electroforético del veneno crudo de *L. laeta***

<b>Bandas proteicas</b>	<b>Peso Molecular (kDa)</b>
1	96,98
2	94,2
3	92,8
4	91
5	88
6	86,8
7	84,3
8	80,7
9	79
10	76,9
11	74,3
12	64,6
13	61
14	59,5
15	57,5
16	54
17	51,4
18	45,3
19	39,6
20	34,2
21	28,5
22	25,1
23	19,4
24	16

**Tabla 8. Acción del EDTA sobre la actividad proteolítica y pro-coagulante**

Agente (mM)	Enzima	% Actividad	% Inhibición
-	<b>Proteasa</b>	<b>100</b>	<b>-</b>
1,25		<b>60,6</b>	<b>39,4</b>
2,5		<b>50</b>	<b>50</b>
5		<b>39,6</b>	<b>60,4</b>
10		<b>58,5</b>	<b>41,5</b>
15		<b>89,5</b>	<b>10,5</b>
-	<b>Pro-coagulante</b>	<b>100</b>	<b>-</b>
1,25		<b>98</b>	<b>2</b>

**Tabla 9. Acción del PMSF sobre las actividades proteolítica y pro-coagulante**

Agente (mM)	Enzima	% Actividad	% Inhibición
-	<b>Proteasa</b>	<b>100</b>	<b>-</b>
0,8		<b>95,3</b>	<b>4,7</b>
1,6		<b>119</b>	<b>-</b>
3,2		<b>93</b>	<b>7</b>
-		<b>100</b>	<b>-</b>
1,25	<b>Pro-coagulante</b>	<b>69,3</b>	<b>30,7</b>
2,5		<b>6,7</b>	<b>93,3</b>
5		<b>6,7</b>	<b>93,3</b>

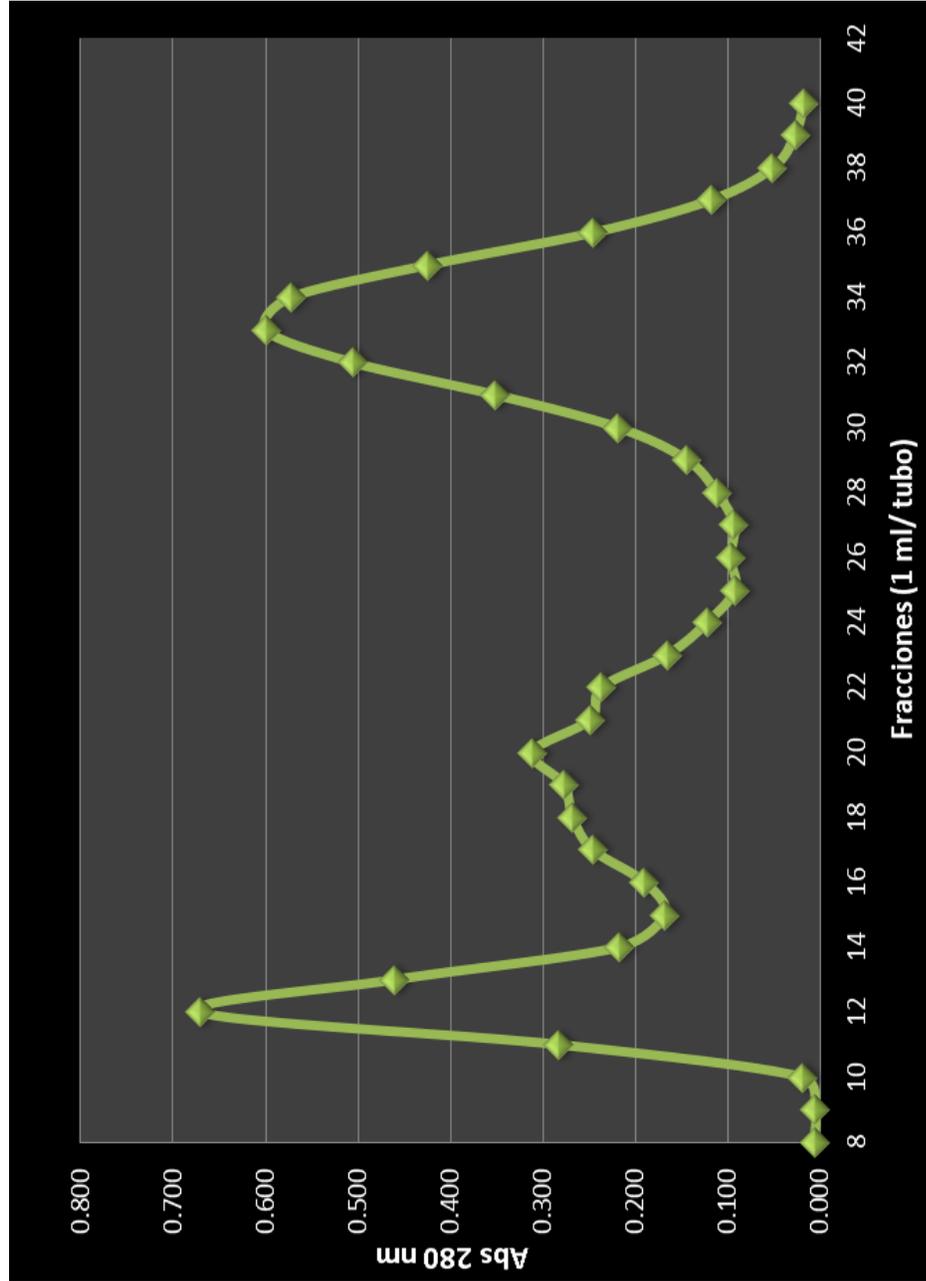


Figura 1. Perfil cromatográfico del veneno de I. laeta sobre SEPHADEX G-100

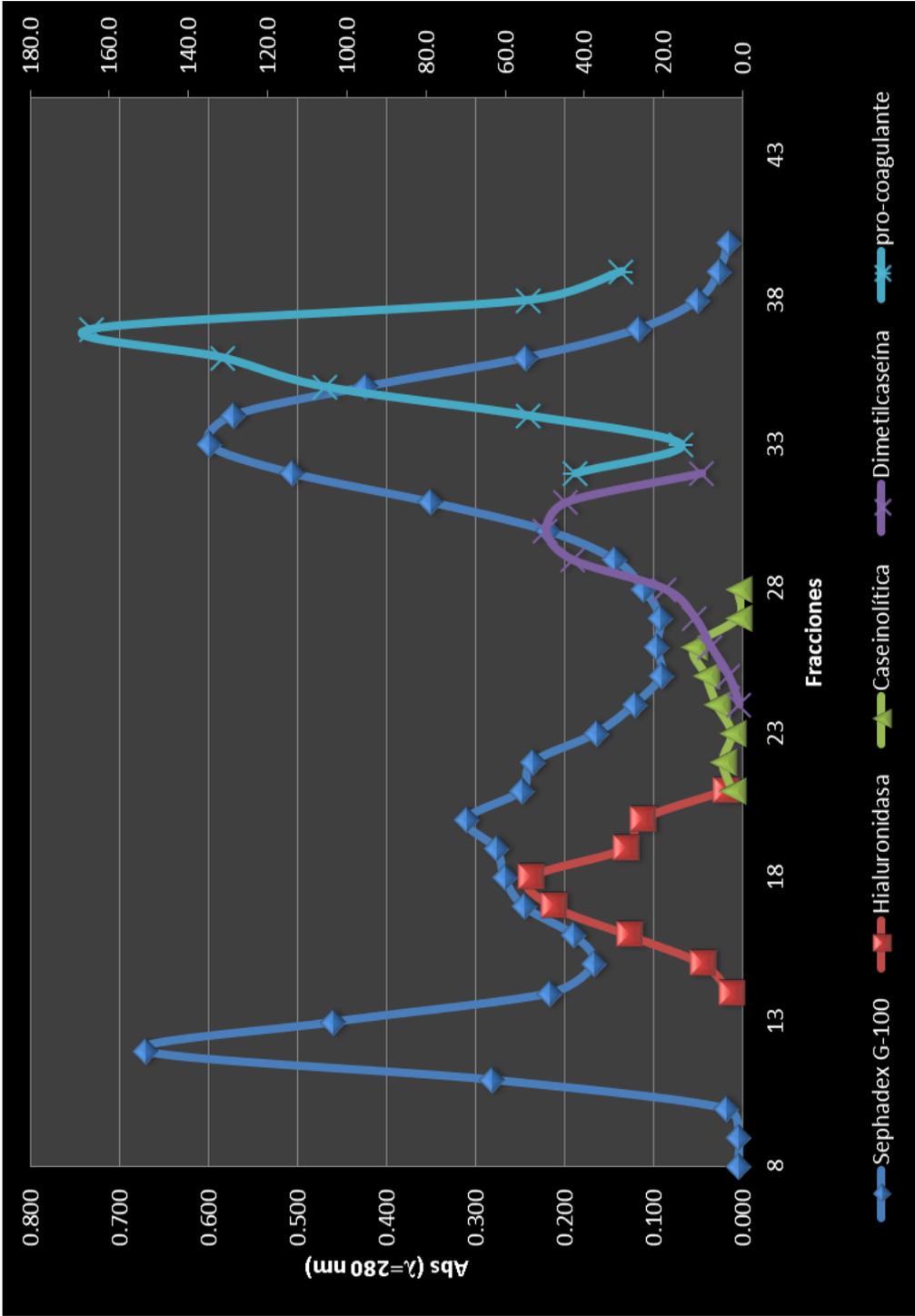


Figura 2. Ubicación de actividades bioquímicas en las fracciones obtenidas de *Loxosceles laeta*

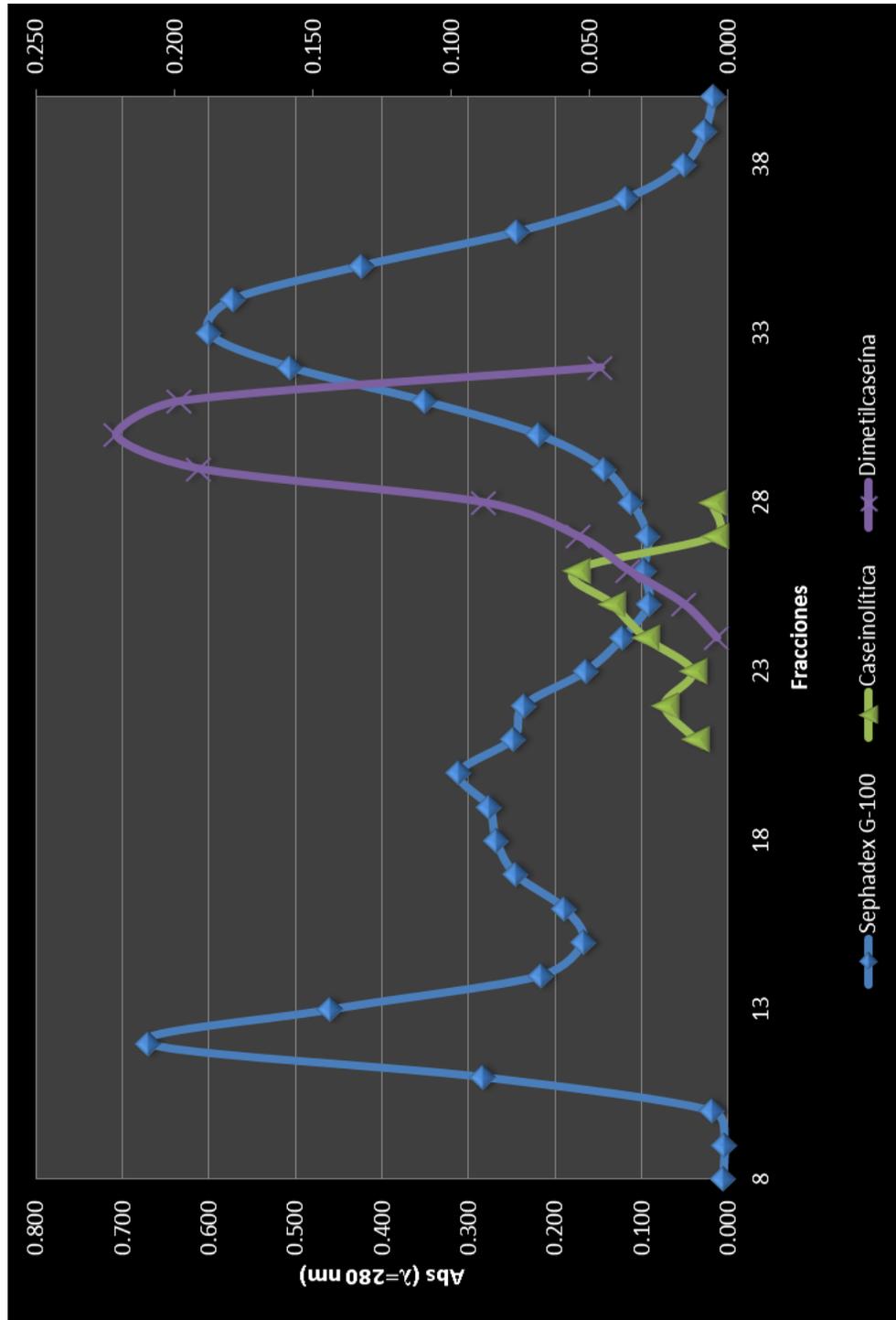
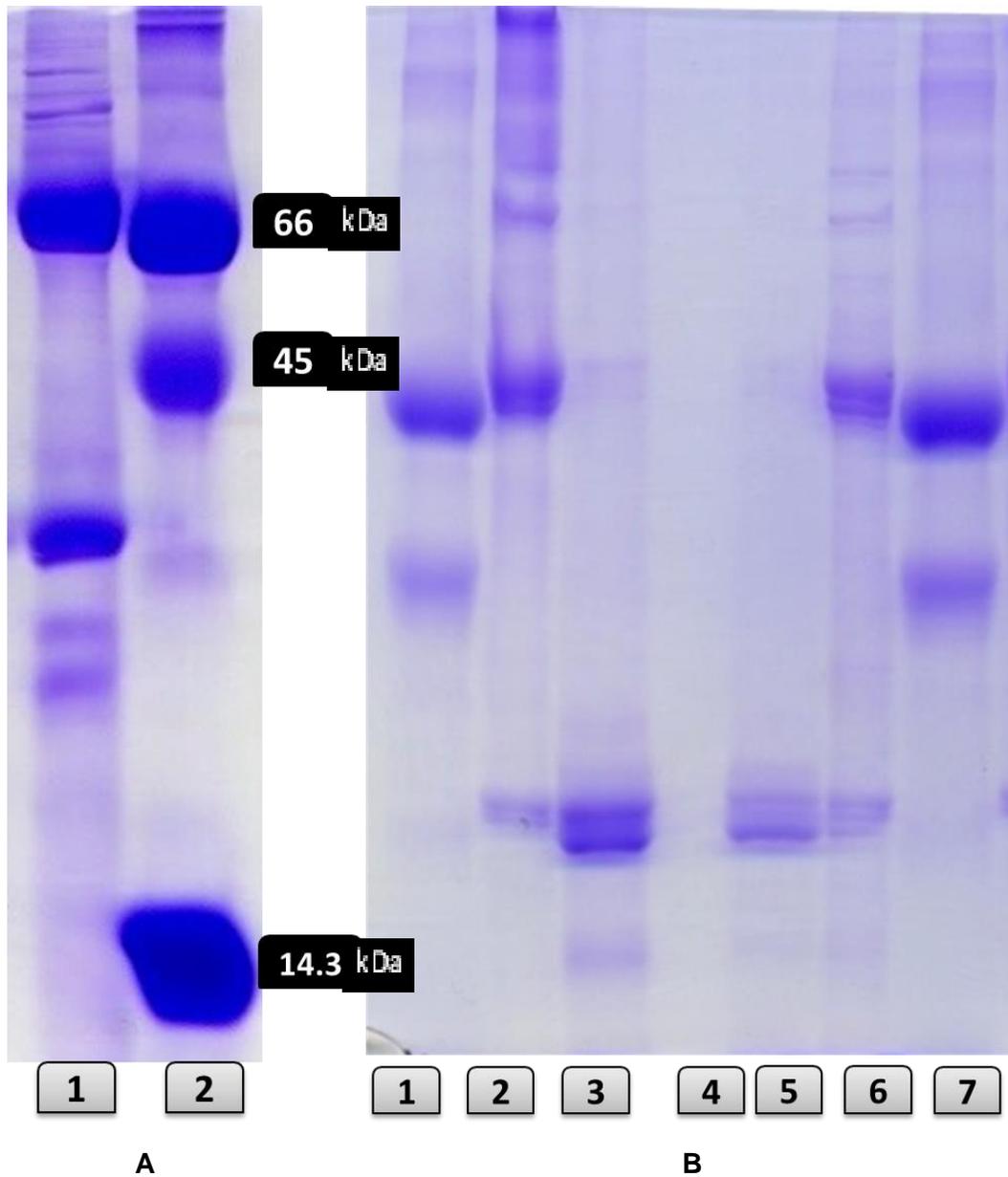
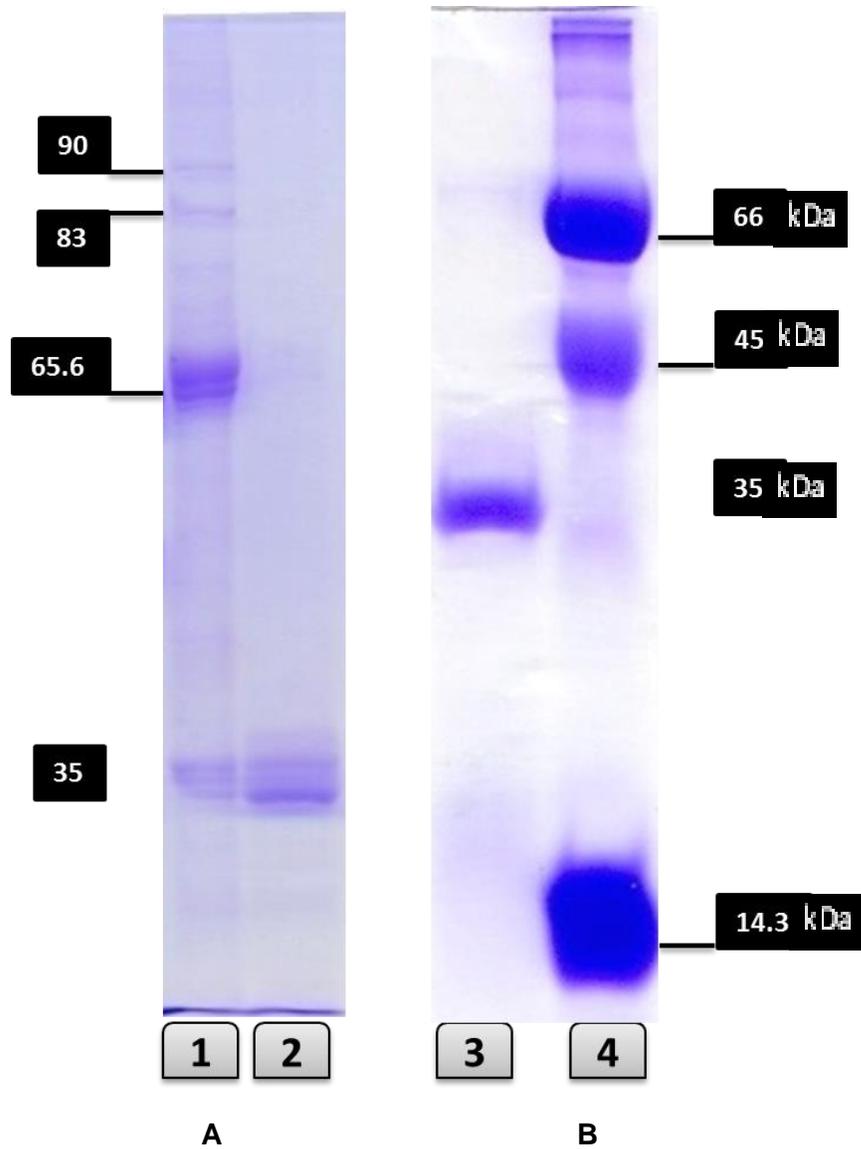


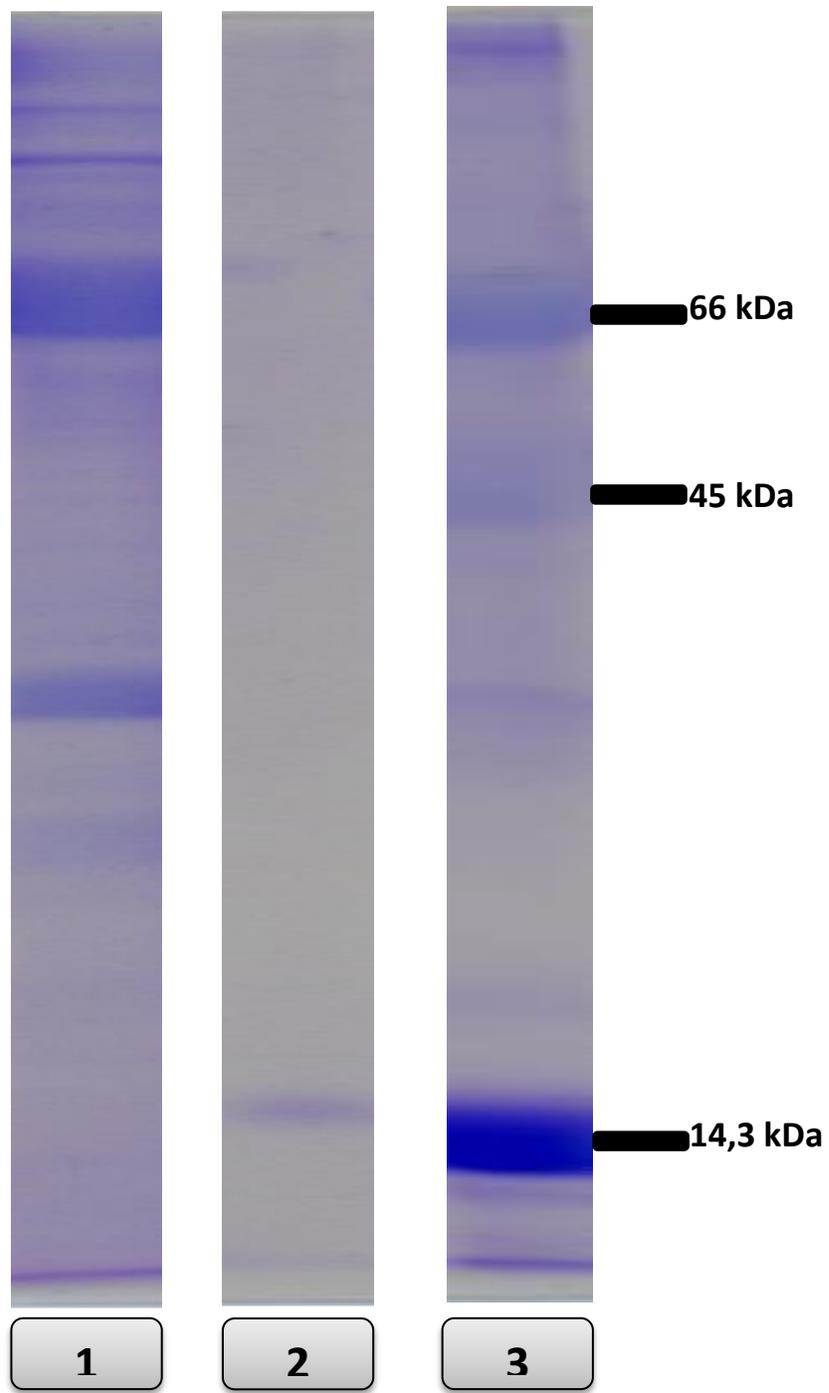
Figura 3. Ubicación de las proteasas en la fracción del veneno de *L. laeta*



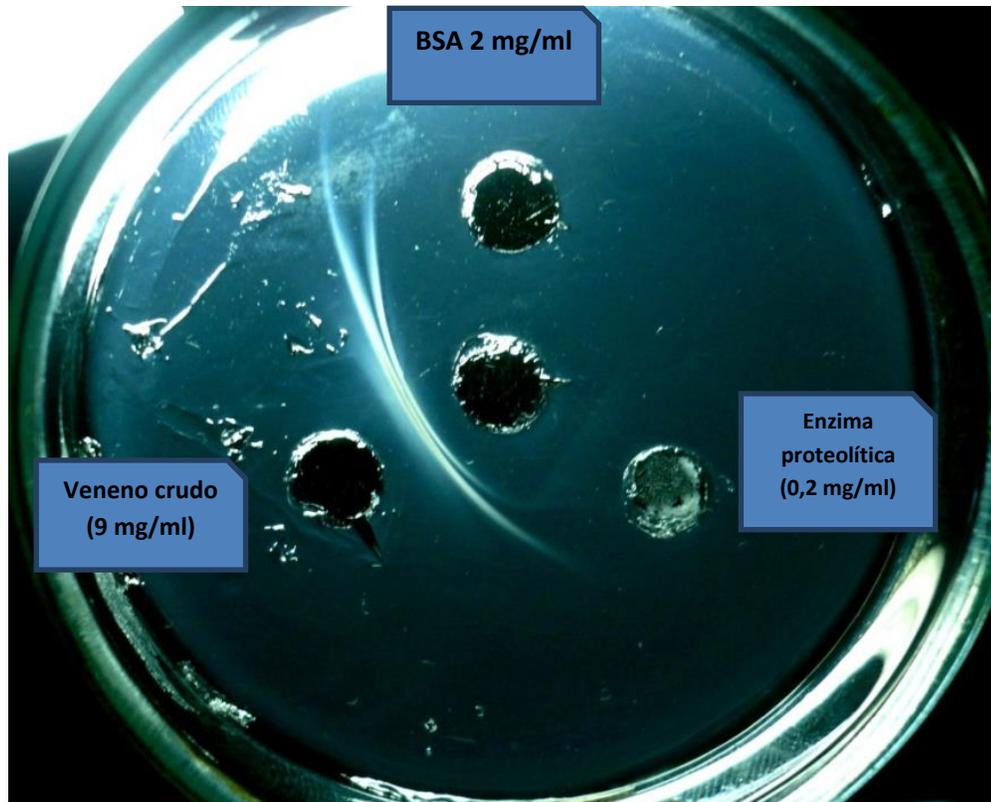
**FIGURA 4.** PAGE-SDS 10% del veneno de *L. laeta*. Patrón electroforético del veneno crudo (40 µg) de *L. laeta* (A), se aprecian las 24 bandas cuyos pesos se detallan en la tabla N° 8. Electroferograma de los picos proteicos obtenidos luego de la cromatografía de filtración, en promedio 30 µg por carril (B), carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: pico I, carril 3: pico II, carril 4: pico III, carril 5: enzima proteasa (condiciones no reductoras), carril 6: veneno crudo de *L. laeta*, carril 7: marcador de peso molecular.



**FIGURA 5.** PAGE-SDS al 10 % de la enzima proteasa en condiciones no reductoras (**A**), donde se puede ver una prominente banda de 34,8 kDa de peso molecular junto con otra de 36,7 (carril 2) y el veneno crudo (1), ambas con 30  $\mu$ g de fracción. PAGE-SDS al 12% de la enzima proteasa (30  $\mu$ g) en condiciones reductoras (**B**), donde se aprecia una banda de 35,2 kDa.



**FIGURA 6.** PAGE-SDS en condiciones no reductoras de la enzima pro-coagulante en condiciones. Carril 1: veneno crudo. Carril 2: enzima pro-coagulante (15,9 kDa). Carril 3: marcadores de peso molecular.



**FIGURA 7.** Inmunodifusión del veneno crudo y la enzima proteolítica, Se aprecia la formación de bandas de precipitina tanto con el veneno crudo (180  $\mu$ g), como con la fracción proteasa inespecífica (4  $\mu$ g) cantidad de BSA 40  $\mu$ g.

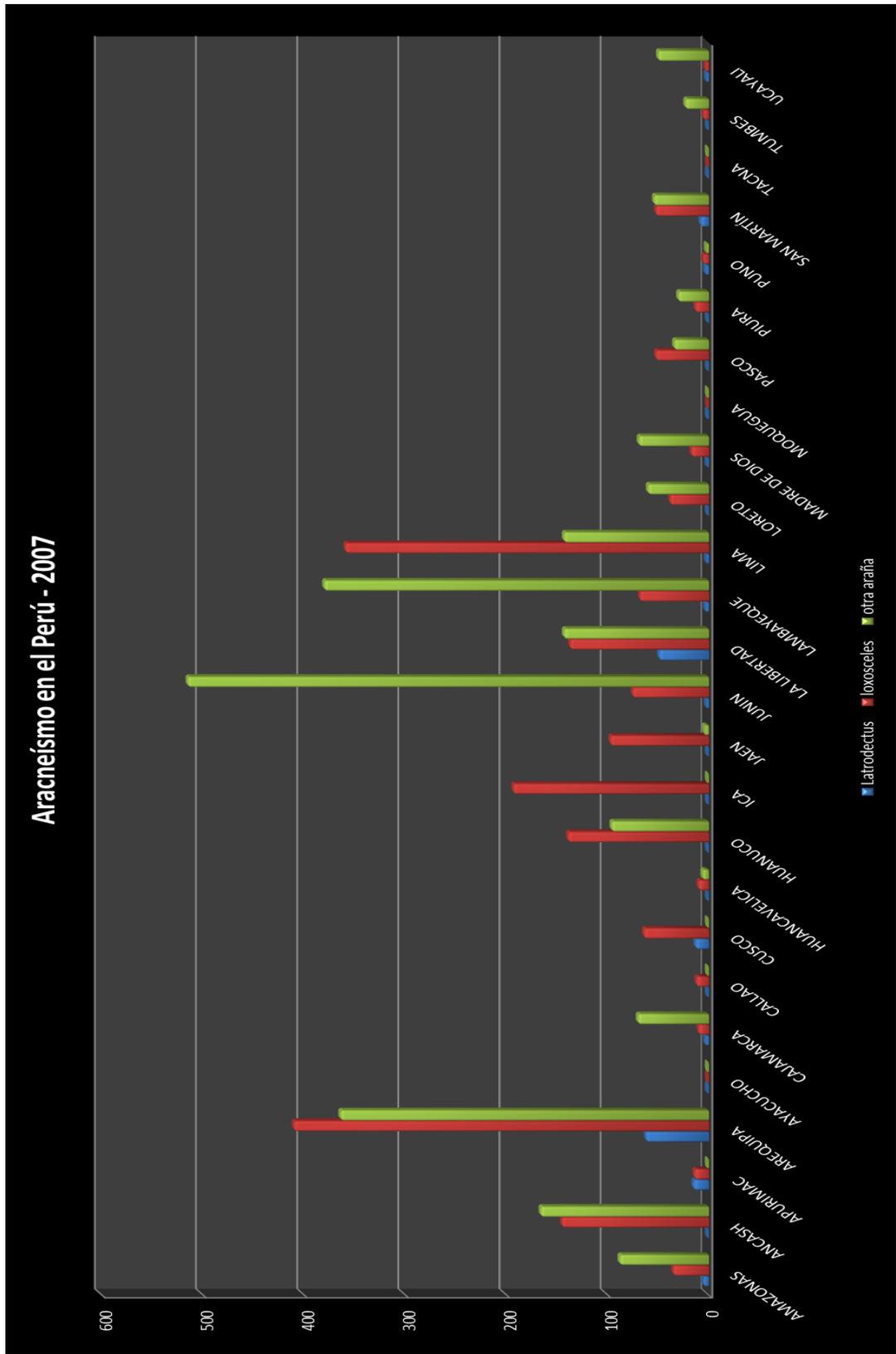


Figura 8. Accidentes arácnidos en el Perú - 2007

Fuente: Dirección general de Epidemiología - INS

## Reporte de loxoscelismo - 2007

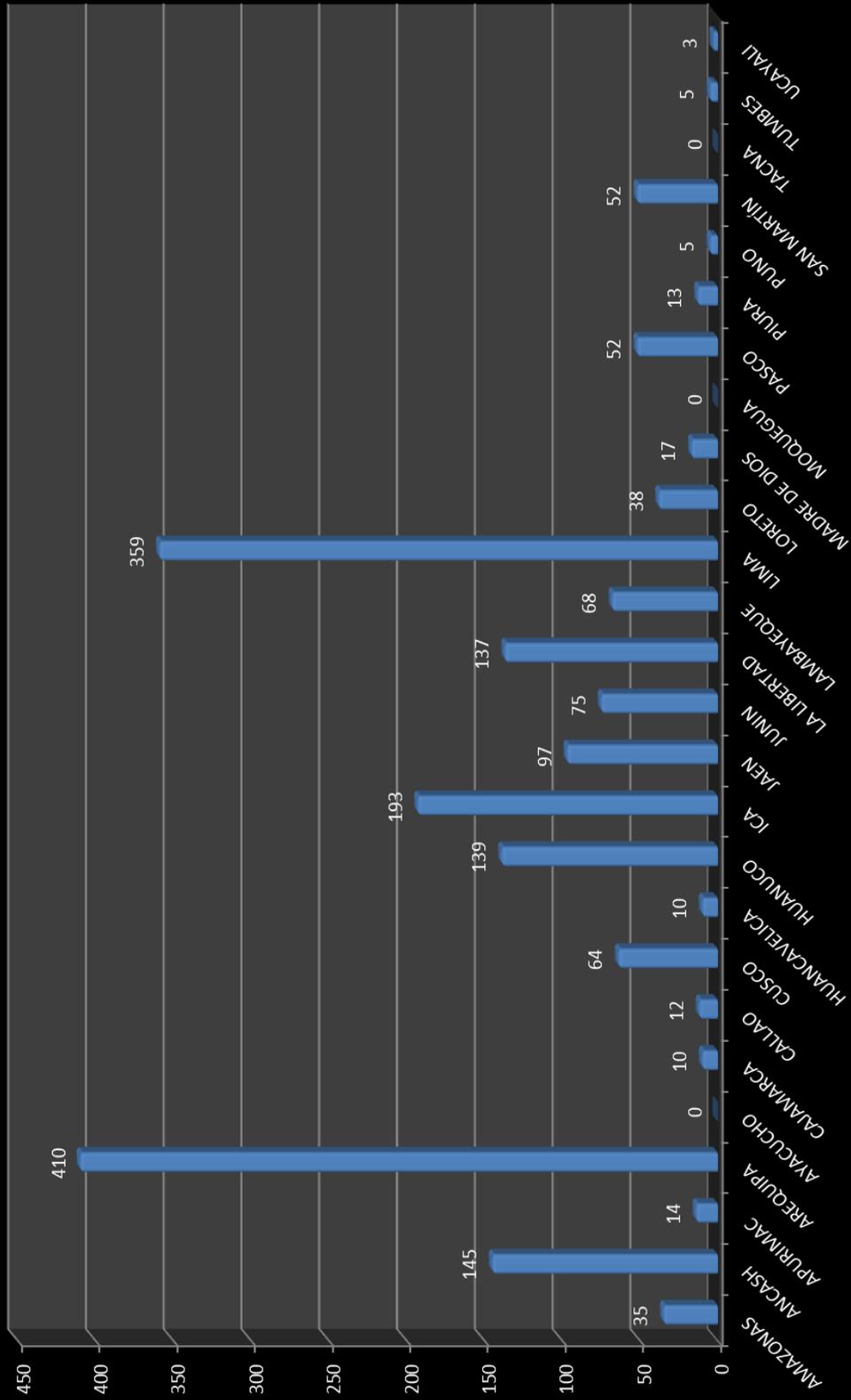


Figura 9. Casos de loxoscelismo en el Perú 2007

Fuente: Dirección general de Epidemiología - INS