

Araña *Loxosceles* y Loxoscelismo

1.1. Arañas *Loxosceles*

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

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

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

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

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

Características de *Loxosceles*

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



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

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

Distribución

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

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

1.2. Loxoscelismo

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

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



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

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

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

Diagnóstico

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

Tratamiento

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

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

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

Tratamiento específico:

Existen antivenenos hechos contra distintas especies de *Loxosceles*. En Argentina y Brasil, se producen antivenenos constituidos por fragmentos F(ab')₂ de origen equino utilizando como inmunógeno el veneno de *L. laeta* en Argentina, y *L. gaucho* en Brasil; en Perú existe un antiveneno constituido por Inmunoglobulina G entera de origen equino contra el veneno de *L. laeta* (Cabrerizo *et al.*, 2009).

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

1.3. El veneno de *Loxosceles*

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

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

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

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

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

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

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

1.4. Fisiopatología del loxoscelismo

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

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

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

Por otro lado, ensayos *in vitro* han revelado que el veneno de *L. deserta* induce la producción de IL-8 y la proteína 1 quimioatrayente de monocitos (MCP-1) en células epiteliales y endoteliales, en estas últimas también induce la producción del oncogen alfa relacionado al crecimiento (GRO- α). Posteriormente, se identificó que la expresión

de tales quimiocinas se lleva a cabo a través de una vía dependiente de NF-KB (Desai *et al.*, 1999). Con base en las funciones de IL-8 (potente quimioatrayente neutrófilos), MCP-1, y GRO- α , en inflamación, estos hallazgos pueden tener relevancia en la dermonecrosis observada en el loxoscelismo (Gómez *et al.*, 1999).

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

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

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

Estudios *in vivo* con conejos inyectados con el veneno de *L. intermedia*, muestran que el veneno no afecta a todas las células de la sangre. Los análisis de conteo celular mostraron disminución de células rojas nucleadas y megacariocitos en médula ósea y disminución de plaquetas (trombocitopenia) y neutrófilos (neutropenia) en sangre periférica, lo cual correlacionó con los cambios histopatológicos observados en las biopsias de piel. Por lo que se propuso que la trombocitopenia y neutropenia transitorias en sangre periférica puede ser consecuencia de una extensiva migración de plaquetas y neutrófilos a la lesión necrótica (da Silva *et al.*, 2003).

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

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

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

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

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

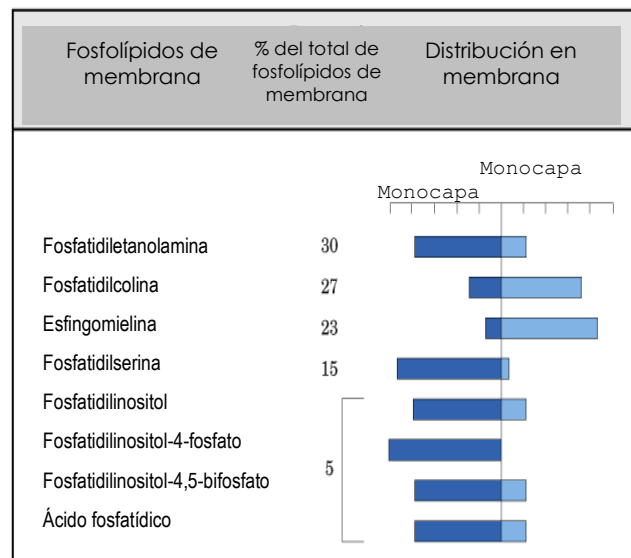


Figura 3. Principales fosfolípidos de membrana plasmática. Se muestra el contenido de fosfolípidos expresado en porcentaje relativo y su distribución en la monocapa interna y externa.

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

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

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

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

1.6. Fosfoceramida

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

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

actividad enzimática en mamíferos (Figura 4).

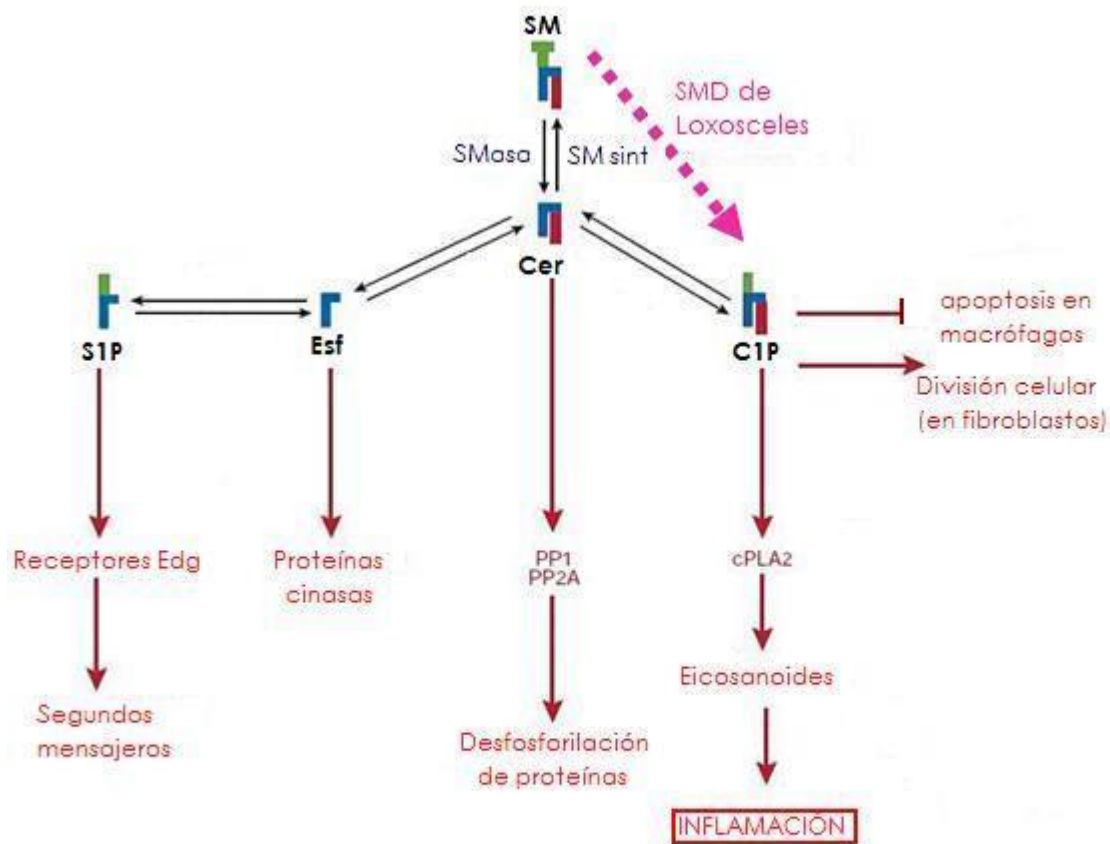


Figura 4. Esquema de producción de fosfoceramida (C1P) en células de mamífero. La flecha rosa señala la generación de fosfoceramida (C1P) a partir de la esfingomielina (SM) llevado a cabo por la esfingomielinasa D (SMD) de *Loxosceles*. Con flechas en rojo, se indican algunas respuestas celulares a C1P,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

1.7. Lisofosfatidilcolina: sustrato de la SMD de *Loxosceles*.

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

1.8. Ácido lisofosfatídico

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

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

A pesar de la ubicuidad y relevancia fisiológica del LPA, se conoce relativamente poco de su fisicoquímica. Teniendo un grupo hidroxilo libre y un grupo fosfato, el LPA (oleoil) es mucho más soluble en agua que otros fosfolípidos de cadena larga. Aún con esta hidrofiliidad, el LPA no permanece necesariamente asociado a la membrana después de su formación, y por lo tanto no siempre se detecta mediante procedimientos convencionales para extracción de lípidos. A diferencia de otros lisolípidos, el LPA no causa lisis en las células bajo condiciones fisiológicas porque su cabeza estructural es relativamente pequeña (Moolenaar, 1995).

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

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

Receptores para LPA

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

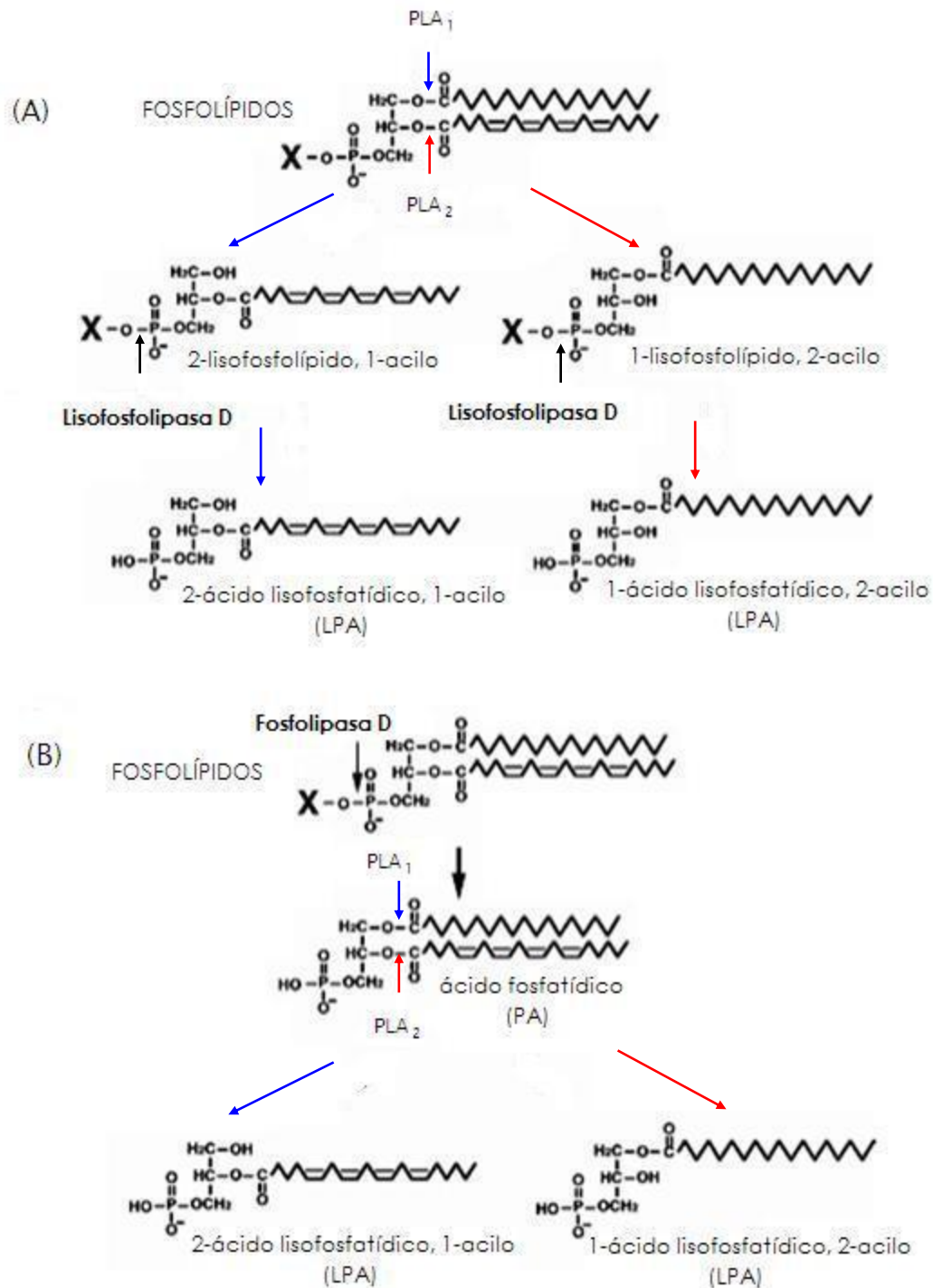


Figura 5. Vías de producción de LPA. (A) Vía fosfolipasa A₁ (PLA₁) y fosfolipasa A₂ (PLA₂) y posteriormente lisofosfolipasa D (lysoPLD) (B) Vía fosfolipasa D (PLD), seguida de PLA₁ y PLA₂. Modificado de Aoki, 2004.