

Algunas características de los venenos y secreciones digestivas de *Aphonopelma seemanni* y *Sphaerobothria hoffmanni* (Araneae: Theraphosidae) de Costa Rica

Marco V. Herrero.

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional, y Centro Universitario del Atlántico, Universidad de Costa Rica. Dirección actual: Apdo. 1032-2150, Moravia, San José, Costa Rica

George V. Odell.

Dpt. Biochemistry, Oklahoma State University, Stillwater, Oklahoma, 74078 U.S.A.

(Recibido el 14 de julio de 1987)

Abstract: A comparison of some components of the venoms of two Costa Rican tarantulas, *Aphonopelma seemanni* (Cambridge) and *Sphaerobothria hoffmanni* (Karsch) by polyacrylamide gel electrophoresis shows patterns similar to those of *Dugesiella hentzi* (Girard), a North American tarantula. The digestive secretions have proteins that do not enter the 15% gels; thus no bands are observed. The method used by the tarantulas to consume their prey involves the action of both the venom and the digestive secretions. The percent protein, pH, proteolytic activity and hemolytic activity of venom and digestive secretions of both species were determined, and a high proteolytic activity for digestive secretions was found.

Dos especies de arañas tarafósidas comúnmente encontradas en pastizales son *Aphonopelma seemanni* y *Sphaerobothria hoffmanni*. La primera es común en el Pacífico Seco y la segunda se ha colectado en el Valle Central, el Valle del Guarco y la zona Atlántica (Valerio 1980). Las hembras de estas especies viven en túneles excavados en el suelo y son depredadores nocturnos de otros artrópodos (Herrero y Bolaños 1982, Herrero y Valerio 1986).

Las arañas terafósidas son el grupo de artrópodos depredadores terrestres de mayor talla, juegan un papel ecológico primordial en agroecosistemas de pastizal y son muy abundantes y diversos en la región neotropical, por lo que las consideramos de interés. Durante nuestros estudios toxicológicos determinamos algunas características de las secreciones externas de *S. hoffmanni* y *A. seemanni*, que se describen aquí.

Para la captura y digestión de sus presas las arañas requieren la acción sinérgica del veneno y de las secreciones digestivas externas. El ve-

veno, producido por glándulas localizadas en la parte anterior de los segmentos basales de los quelíceros, es inoculado durante la captura. La secreción digestiva, producida en el intestino medio y las glándulas rostrales y maxilares, es vertida sobre la presa y hay digestión extracorpórea. Posteriormente el resultado —líquido— es ingerido con participación de la bomba faríngea y el proventrículo (Savory 1977).

Los venenos, al igual que las secreciones digestivas son mezclas complejas con algunas actividades biológicas conocidas. Una comparación de cuatro venenos de arañas terafósidas mostró un pH entre 5 y 6, contenido sólido de 20% y contenido de proteínas del 10% en el veneno líquido recién colectado. Los venenos también contienen hialuronidasa, toxinas, poliaminas y nucleótidos. Hay diferencias cualitativas y cuantitativas entre los venenos de diferentes especies (Cabbiness 1979). Las secreciones digestivas de la especie *Tegenaria atrica* (Koch) son una mezcla de proteasas, carbohidrasas, esterases, fosfatasas y nucleasas (Mommensen 1978; a,

b, c); en las secreciones digestivas de algunas terafósidas ha sido informada actividad proteolítica (Perret 1977).

En Costa Rica, los efectos locales sobre ratón blanco y caballo ya han sido estudiados (Herrero 1980, Herrero 1984). Se observó también el efecto mionecrótico histológicamente, en músculo esquelético y mediante la determinación de la enzima creatinafosfoquinasa en suero sanguíneo de ratón blanco (Herrero y Gutiérrez 1984). La familia Theraphosidae ha sido ampliamente estudiada desde un punto de vista taxonómico (Valerio 1979, 1980 a y b, 1982) sin embargo es poco lo que se conoce sobre su fisiología o sobre la bioquímica de sus secreciones.

MATERIAL Y METODOS

Se colectaron 68 ejemplares de *S. hoffmanni* en Tres Ríos (Cartago) y 96 *A. seemanni* en Pozo Azul de Abangares (Guanacaste), mediante disección de los túneles. Todos eran hembras en diferentes estadios de desarrollo y se les mantuvo en recipientes plásticos, con un suministro regular de agua y alimento.

El veneno se colectó en tubos capilares mediante estimulación eléctrica de los segmentos basales de los quelíceros (Grothaus y Howell 1967). Durante la operación las arañas expulsan con frecuencia secreciones digestivas externas, que se colectaron de igual manera. Ambas se liofilizaron y se almacenaron a -70 C. Se tomaron cuidados especiales para evitar la contaminación del veneno con secreciones digestivas externas y viceversa.

El pH se determinó en repetidas oportunidades en mezclas de veneno o secreción digestiva usando papel indicador (BJG 10 1-11 Vivid).

Para determinar el contenido de proteínas se prepararon soluciones en una concentración de 1 mg/ml; se usó como solvente solución salina amortiguada con fosfatos a pH 7.2. Se hizo comparación con una preparación de referencia de albúmina de suero bovino (Dade) (0.15 mg/ml). Las determinaciones se hicieron con base en el método Lowry *et al.* (1951), tanto en el patrón como en las soluciones incógnitas. El porcentaje de proteína en cada muestra se calculó con base en el peso seco.

La electroforesis discontinua se llevó a cabo según el método de Reisfeld *et al.* (1962), en geles de poliacrilamida al 15% a un pH de 4.3 y con polos invertidos. Los geles fueron teñidos

con anilina azul-negra. El rastreo y registro de los geles se llevó a cabo en un densitómetro (Helena Labs Densitometer Gel Scanner). Se seleccionó este método por haber sido utilizado previamente con éxito en el estudio de venenos de arañas terafósidas (Lee *et al.* 1974).

La actividad proteolítica se determinó sobre caseína, por el método de Friedrich y Tu (1971). En cada caso se adicionó 1 ml de una solución de 1 mg/ml del liofilizado de la sustancia a 2 ml de caseína al 1% en amortiguador de fosfatos 0.1 M (pH 7.00), la preparación se incubó a 37 C por 30 minutos y se añadieron 4 ml de ácido tricloroacético al 5% para detener la reacción; se dejó a temperatura ambiente por 30 minutos. Los tubos se centrifugaron a 383 g durante 5 minutos y la absorbancia se leyó a 280 nm en un espectrofotómetro Varian Techtron UV-VIS (modelo 635). Como blanco se utilizó una solución de caseína sin veneno. Las unidades de actividad proteolítica (U.P) se calcularon según la siguiente ecuación:

$$U.P. = \frac{DO \times 100}{\text{mg/proteína}}$$

La actividad hemolítica se determinó como sigue:

i) Indirecta: Se calculó según la actividad de cada una de las sustancias a probar sobre eritrocitos humanos en presencia de yema de huevo como sustrato. Un resumen del método utilizado con cada una de las sustancias es el siguiente: se colocó en un tubo de ensayo 0.5 ml de una suspensión de eritrocitos al 2.5%; 0.05 ml de yema de huevo al 1%, 0.5 ml de la sustancia a probar al 0.1% (P/V) y 1.45 ml de solución salina; la mezcla se agitó, se encubó a 37 C durante 1 hora y se leyó espectrofotométricamente a 550 nm en un espectrofotómetro Varian Techtron UV-VIS (modelo 635). Como blanco se empleó un tubo con 2 ml de solución salina y 0.5 ml de la solución de eritrocitos; el 100% de hemólisis se calculó mediante la lisis de 0.5 ml de la suspensión de eritrocitos en 2 ml de agua destilada.

ii) Directa: mismo método pero sustituyendo la yema de huevo por solución salina.

RESULTADOS

En el cuadro 1 se muestran algunas características generales de la secreción digestiva de *A. seemanni* y *S. hoffmanni*.

CUADRO 1

Algunas características de las secreciones digestivas de Aphonopelma seemanni y Sphaerobothria hoffmanni (Araneae: Theraphosidae) de Costa Rica.

Característica/ Especie	<i>A. seemanni</i>	<i>S. hoffmanni</i>
1. pH	9.00	9.00
2. % proteína	52 ± 0.6	28.7 ± 1.0
3. Actividad Proteolítica (U.P.)	310.0 ± 1.4	506.0 ± 9.9
4. Actividad Hemolítica Indirecta %.	3.4 ± 1.3	1.6 ± 0.4

Nota: Todos los datos, excepto el pH, son presentados con el promedio ± desviación estándar (n=3).

En nuestro laboratorio se observaron diferencias de rendimiento entre ambas especies en la producción de secreción digestiva, produciendo mayor cantidad *S. hoffmanni*: la producción promedio osciló en esta última especie entre 14.96 mg y 57.08 mg—mismos individuos (n = 14) en extracciones diferentes. Ambas sustancias tienen color amarillo al ser extraídas y su liofilizado es pardo amarillento. Cuando se hizo la electroforesis con las secreciones digestivas en geles de poliacrilamida al 15% (pH 4.3) se observó que las bandas proteicas no migraban a través del gel. No hubo actividad hemolítica directa.

En el cuadro 2 se muestran algunas características de los venenos.

CUADRO 2

Algunas características de los venenos de Aphonopelma seemanni y Sphaerobothria hoffmanni (Araneae: Theraphosidae) de Costa Rica.

Característica/ Especie	<i>A. seemanni</i>	<i>S. hoffmanni</i>
1. pH	5.00	5.00
2. % proteína	66.0 ± 0.5	74.0 ± 0.5
3. Actividad Proteolítica (U.P.)	23.0 ± 5.4	3.4 ± 1.3
4. Actividad Hemolítica Indirecta %.	20.0 ± 1.1	2.2 ± 1.2

Nota: Todos los datos, excepto el pH, es presentado con el promedio ± desviación estándar (n=3).

No se cuantificaron las diferencias de rendimiento en producción de veneno entre ambas especies pero se observó que *A. seemanni* produce más en condiciones de laboratorio. Ambos venenos, al ser extraídos, son líquidos transparentes y al ser liofilizados son de color blanco. Cuando se realizó la electroforesis en geles de poliacrilamida al 15% (pH 4.3), ambos presentaron bandas de proteínas que semejaban el patrón de *D. hentzi* (figs. 1 y 2). No se observó actividad hemolítica directa.

DISCUSION

En ambos venenos hay bandas de proteínas o péptidos (Figs. 1 y 2) en las áreas identificadas para *D. hentzi* como hialuronidasa, toxinas y poliaminas (Odell *et al.* 1980).

La banda de mayor concentración (100%) ha sido identificada como poliaminas en este último veneno y espermina es su componente principal (Cabbiness *et al.* 1980), sin embargo su función biológica es desconocida.

La función biológica de las toxinas estudiadas hasta el momento en arañas terafósidas es la de causar necrosis del músculo esquelético de mamíferos (Ownby y Odell 1983) lo que es un efecto demostrado en el veneno de *A. seemanni* (Herrero y Gutiérrez 1984) y de *S. hoffmanni* (Herrero 1984). A juzgar por el patrón electroforético, *A. seemanni* tiene una mayor concentración de toxina que *S. hoffmanni*, por lo que se esperaría mayor actividad mionecrótica. Ello concuerda con lo informado previamente (Herrero 1980).

En los venenos de arañas terafósidas han sido identificados también otros compuestos como nucleótidos (Chan *et al.* 1975); hialuronidasa (Schanbacher *et al.* 1973) y aminoácidos libres (Cabbiness 1979). En los venenos de *A. seemanni* y *S. hoffmanni* hay una gran cantidad de proteína en el área de hialuronidasa.

No se pueden hacer estimados cuantitativos pero el número de bandas da un número mínimo de las proteínas y péptidos presentes. En consecuencia sería esperable encontrar al menos 2 toxinas en los venenos de *A. seemanni* y *S. hoffmanni*. En el caso de *D. hentzi* ha sido posible establecer la estructura primaria de una de estas toxinas (Odell, Comunicación personal).

El pH de 5.00 para estos venenos es igual al de otras terafósidas (Cabbiness 1979) y el pH alcalino (pH 9.00) de las secreciones externas indica que nosotros estamos tratando con secre-

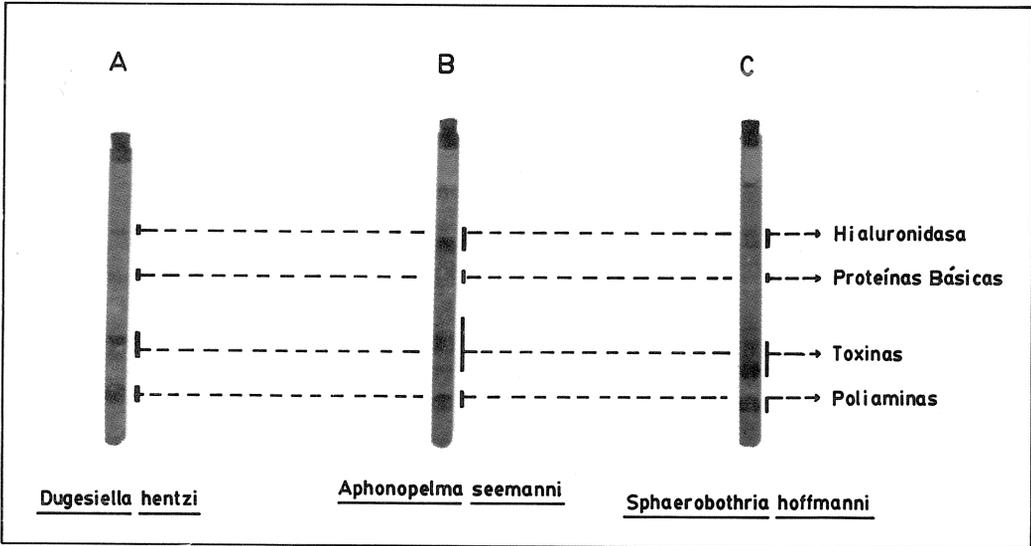


Fig. 1. Patrones electroforéticos del veneno de tres especies de arañas terafósidas: *Dugesia hentzi*, *Aphonopelma seemanni* y *Sphaerobothria hoffmanni*.

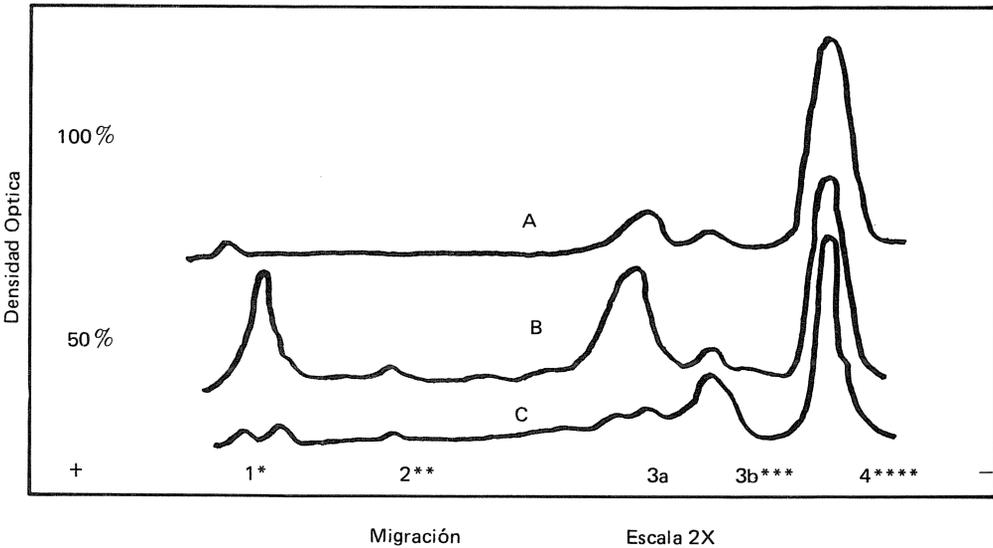


Fig. 2 Rastreo de patrones electroforéticos de los venenos de *Dugesia hentzi* (A) *Aphonopelma seemanni* (B) y *Sphaerobothria hoffmanni* (C).

* 1 Hialuronidasa, ** 2 Proteínas no identificadas, *** 3 a y b toxinas y **** 4 Poliaminas.

ciones básicas. Debemos hacer notar que las secreciones digestivas de *A. seemanni* y *S. hoffmanni* son mezclas de composición desconocida, cuya característica más notoria es su alta actividad proteolítica sobre caseína; sin embargo otras actividades podrían estar presentes dado el tipo de digestión extracorpórea que caracteriza al grupo.

S. hoffmanni tiene una producción de secreciones mayor que *A. seemanni*. También se observaron diferencias en la cantidad de proteínas: la concentración de proteínas es mayor en *A. seemanni*.

No fue posible dilucidar el significado que este hecho pueda tener en la naturaleza, sin embargo podrían existir diferencias entre ambas

especies en el uso de las secreciones durante la digestión.

El hecho de que las proteínas de las secreciones digestivas no migraran en el tipo de electroforesis usado, podría estar relacionado con su naturaleza química (ácidas) y/o con su tamaño molecular. También se deduce de este hecho que no hubo contaminación de las sustancias (veneno y/o secreción digestiva) durante la extracción.

Por mucho tiempo se ha supuesto que el papel de la hialuronidasa en los venenos de arañas es como factor de penetración (Schanbacher *et al.* 1973) para los venenos, sin embargo esta enzima podría jugar un papel hidrolítico en las secreciones digestivas.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al personal del Instituto Clodomiro Picado, a Sue Ann Hudiburg de Oklahoma State University y a Juan Murillo del Programa de Zoonosis de la U. N. A., su valiosa colaboración. También damos las gracias a José María Gutiérrez y a Marielos Castro por su revisión crítica de este manuscrito.

Este trabajo fue financiado por el Instituto Clodomiro Picado, la Oklahoma State University y la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional.

RESUMEN

Una comparación de algunos componentes de los venenos de dos arañas terafósidas de Costa Rica, *Aphonopelma seemanni* (Cambridge) y *Sphaerobothria hoffmanni* (Karsch.) por electroforesis en geles de poliacrilamida, mostró patrones similares al de *Dugesiella hentzi* (Girard), una "pica-caballo" norteamericana. Las secreciones digestivas tienen proteínas que no entran a los geles al 15% por lo tanto no se observaron bandas proteicas al correrla. El método que utiliza la araña para capturar y digerir sus presas involucra la acción conjunta del veneno y las secreciones digestivas. Se determinó el contenido de proteínas, pH, actividad proteolítica y actividad hemolítica del veneno y de las secreciones digestivas de ambas. Hay una alta actividad proteolítica en ambas secreciones digestivas.

REFERENCIAS

- Cabbiness, S. G. T. 1979. Comparison of venom components from four tarantula species, M. Sc. Thesis, Oklahoma State University.
- Cabbiness, S. G. T.; C. W. Gehrke; K. C. Kud; T. K. Chan; J. E. Hall & S. A. Hudiburg. 1980. Polyamines in some tarantula venoms. *Toxicon* 18: 681-683.
- Chan, T. K.; C.R. Geren; D. E. Howell & G. V. Odell. 1975. ATP in tarantula spider venoms and its synergistic effect with the venom toxin. *Toxicon* 13: 61-66.
- Friedrich, C & A. T. Tu. 1971. Role of metals in snake venoms for hemorrhagic esterase and proteolytic activities. *Bioch. Pharm.* 20: 1954.
- Grothaus, P. H. & D. E. Howell. 1967. A new technique for the recovery of spider venoms. *J. Kansas. Ent. Soc.* 40: 37-41.
- Herrero, M.V. 1980. Características generales y efectos locales de las secreciones externas de dos arañas "pica-caballo": *Aphonopelma seemanni* y *Sphaerobothria hoffmanni* (Araneae: Theraphosidae) de Costa Rica. M. Sc. Tesis, Universidad de Costa Rica.
- Herrero, M. V. & R. Bolaños. 1982. Hábitos de vida y túneles de dos arañas "pica-caballo" de Costa Rica (Araneae: Theraphosidae). *Observaciones preliminares*. *Brenesia* 19/20: 19-22.
- Herrero, M. V. & C. E. Valerio. 1986. Análisis de la actividad diaria de *Aphonopelma seemanni* (Araneae: Theraphosidae) en Costa Rica. *J. Arachnol.* 14: 79-82.
- Herrero, M. V. 1984. Efectos locales de las secreciones externas de *Sphaerobothria hoffmanni* (Araneae: Theraphosidae) de Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 32: 209-212.
- Herrero, M. V. & J. M. Gutiérrez. 1984. Efecto mionecrótico del veneno de *Aphonopelma seemanni* (Araneae: Theraphosidae) de Costa Rica en ratón blanco. *Rev. Biol. Trop.* 32: 173-175.
- Lee, C. K.; T. Chan; B. C. Ward; D. E. Howell & G. V. Odell. 1974. The purification and characterization of a necrotoxin from tarantula, *Dugesiella hentzi* (Girard) venom. *Arch. Biochim. Biophys.* 164: 341-350.
- Lowry, O. N.; N. J. Rosenbrough; A. L. Farr; & R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Mommsen, T. P. 1978. Digestive enzymes of a spider (*Tegenaria atrica* Koch). I. Genral remarks, digestion of proteins. *Comp. Biochem. Physiol.* 60A: 365-370.

- Mommsen, T. P. 1978. Digestive enzymes of a spider (*Tegenaria atrica* Koch)-II Carbohydases. Comp. Biochem. Physiol. 60A:371-375.
- Mommsen, T. P. 1978. Digestive enzymes of a spider (*Tegenaria atrica* Koch)-III. Esterases, phosphatases, nucleases. Comp. Biochem. Physiol. 60A: 377-382.
- Odell, G. V.; S. G. T. Cabbiness; C. L. Ownby; M. V. Herrero & R. Bolaños. 1900. Tarantula venom components: A species comparison. Fed. Proc. 39:1646.
- Ownby, C. L. & G. V. Odell. 1983. Pathogenesis of skeletal muscle necrosis induced by tarantula venom. Exp. Molec. Pathol. 38: 283-296.
- Perret, B. A. 1977. Proteolytic activity of tarantula venoms due to contamination with saliva. Toxicon 15: 505-510.
- Reisfeld, R. A., V. G. Lewis & D. E. Williams. 1962. Biochemistry: Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrilamide gels. Nature 4030: 281-283.
- Savory, T. H. 1977. Arachnida (2a. ed.), Academic Press, Londres, Nueva York y San Francisco, p. 31-43.
- Schanbacher, F. L.; C. K. Lee; J. E. Hall; I. B. Wilson; D. E. Howell & G. V. Odell. Composition and properties of tarantula *Dugesia hentzi* venom. Toxicon 11: 21-29.
- Valerio, C. E. 1979. Arañas Terafósidas de Costa Rica (Araneae: Theraphosidae) II. *Psalmopoeus reduncus*, redescipción, distribución y el problema de dispersión en terafósidas. Rev. Biol. Trop. 27: 301-308.
- Valerio, C. E. 1980. Arañas terafósidas de Costa Rica (Araneae: Theraphosidae). III. *Sphaerobothria*, *Aphonopelma*, *Pterinopelma*, *Citharacanthus*, *Crypsidromus* y *tychoplastus*. Rev. Biol. Trop. 28: 271-296.
- Valerio, C. E. 1980. Arañas Terafósidas de Costa Rica (Araneae; Theraphosidae) I. *Sericopelma* y *Brachypelma*. Brenesia 18:259-288.
- Valerio, C. E. 1982. Arañas Terafósidas de Costa Rica (Araneae: Theraphosidae) IV. géneros *Metriopelma* y *Cyclosternum*, incluyendo especies de Panamá. Brenesia 19/20: 407-423.