

03081  
15 29

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO  
UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES  
Y DE POSGRADO

"AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE UNA  
FOSFOLIPASA A<sub>2</sub> DE ENTAMOEBA HISTOLYTICA  
CON ACTIVIDAD LITICA DIRECTA"

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
DOCTOR EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA  
P R E S E N T A  
MAESTRO EN CIENCIAS  
JAVIER VARGAS VILLARREAL

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

CUERNAVACA, MOR.

1991

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO**

**PRESIDENTE:** DR. LOURIVAL D. POSSANI POSTAY  
**SECRETARIO:** DR. ALEJANDRO ALAGON CANO  
**VOCAL:** DR. SALVADOR SAID FERNANDEZ  
**VOCAL:** DR. ALEJANDRO BAYON CASO  
**VOCAL:** DR. XAVIER SOBERON MAINERO.  
**SUPLENTE:** DR. FEDERICO SANCHEZ RODRIGUEZ.  
**SUPLENTE:** DR. BALTASAR BECERRIL LUJAN

**EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZO EN EL DEPARTAMENTO DE  
BIOQUIMICA DE PARASITOS DEL CENTRO DE INVESTIGACION SOBRE  
INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA DE LA UNIVERSIDAD  
AUTONOMA DE MEXICO,**

**BAJO LA ASESORIA DEL DR. ALEJANDRO ALAGON CANO.**

**DURANTE LA REALIZACION DE ESTE TRABAJO EL SUSTENTANTE FUE  
BECARIO DEL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA Y EL  
PROYECTO CONTO CON EL APOYO ECONOMICO DE LA FUNDACION  
ROCKEFELLER Y DE LA DIRECCION GENERAL DE ASUNTOS DEL  
PERSONAL ACADEMICO DE LA U.N.A.M**

## INDICE

LISTA DE ABREVIATURAS .....	vii
LISTA DE FIGURAS .....	viii
AGRADECIMIENTOS .....	x i
RESUMEN .....	xii
SUMMARY .....	xiv

### I. INTRODUCCION

Fosfolipasas .....	1
Clasificación .....	1
Características generales de las fosfolipasas del tipo A .....	2
Método de ensayo .....	3
Solubilización de proteínas asociadas a membrana .....	4
Purificación de proteínas asociadas a membrana .....	4
Importancia de las fosfolipasas en los mecanismos patogénicos .....	5
Antecedentes de la actividad fosfolipásica de <i>Entamoeba histolytica</i> .....	5
Objetivos .....	6
Secuencia del trabajo experimental .....	6
Contribución y perspectivas del presente trabajo .....	7

### II. MATERIALES Y METODOS

1. ORIGEN DE LOS REACTIVOS .....	8
2. MATERIAL BIOLÓGICO .....	8
2. A. Cepa HK9:NIH de <i>Entamoeba histolytica</i> .....	8
2. B. Línea celular CHO .....	8
3. PREPARACION DE SUEROS .....	8
3. A. Suero bovino y suero fetal bovino estéril .....	8
4. PREPARACION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO .....	8
4. A. Medio basal PEHP .....	8
4. B. Medio completo PEHPS .....	9
4. C. Preparación del medio esencial mínimo de Eagle (MEM) .....	9
4. D. Medio completo MEM .....	9
5. COMPOSICION Y PREPARACION DE LAS SOLUCIONES .....	9
5. A. Tris-HCl 10 X .....	9
5. B. Tris-HCl 1 X .....	9
5. C. Solución amortiguadora de fosfatos (PBS) .....	9
5. D. Solución de Hanks (SSB) 10 X .....	9
5. E. Solución de Hanks (SSB) 1 X .....	10
5. F. Solución de CaCl <sub>2</sub> 10 X .....	10
5. G. Tritón X-100 10 X .....	10
5. H. Solución de cloroformo-metanol .....	10
5. I. Solución de Alsever (10X) .....	10

5. J. Solución de Alsever (1X) -----	10
5. K. Mezcla de ensayo para la actividad fosfolipásica 2 X -----	10
5. L. mezcla para parar la reacción de la actividad fosfolipásica en el radioensayo -----	11
5. M. Marcaje con Iodogén -----	11
5. N. Tripsina al 0.25% -----	11
5. O. Sal tetrasódica de Uridina -----	11
6. TRATAMIENTO DEL MATERIAL PARA CULTIVO -----	11
6. A. Lavado y esterilización -----	11
7. TRATAMIENTO DEL MATERIAL PARA CROMATOGRAFIA -----	12
7. A. Lavado y secado -----	12
8. CULTIVOS AMIBIANOS AXENICOS -----	12
8. A. Resiembra y cosecha -----	12
8. B. Cultivo masivo -----	12
9. CULTIVO DE CELULAS DE LA LINEA CHO -----	13
10. OBTENCION DE LOS EXTRACTOS TOTALES DE TROFOZOITOS Y DE LA FRACCION SUBCELULAR P30 -----	14
10. A. Extractos totales -----	14
10. B. Obtención de P30 -----	14
11. CUANTIFICACION DE PROTEINAS -----	15
12. COLECCION Y ALMACENAMIENTO DE LOS HERITROCITOS HUMANOS -----	15
12. A. Colección de sangre -----	15
13. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD HEMOLITICA -----	15
13. A. Micrométodo -----	15
14. CUANTIFICACION DE LA LIBERACION BASAL DE HEMOGLOBINA POR LA PRESENCIA DEL INHIBIDOR DE ROSENTHAL -----	15
15. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD HEMOLITICA DEL VENENO DE <i>C. BASILISCUS</i> DE LA FRACCION SUBCELULAR P30 Y DE LA FOSFOLIPASA II.2 -----	15
16. ANALISIS DE LA ACTIVIDAD HEMOLITICA DE LA FRACCION P30, <i>C. BASILISCUS</i> Y DE LA FOSFOLIPASA II.2, SOMETIDAS AL IR O A SEROALBUMINA BOVINA -----	16
17. METODO PARA DETERMINAR ACTIVIDAD FOSFOLIPASICA -----	16
18. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LISOFOSFOLIPASA -----	16
19. DESLIPIDIZACION Y SOLUBILIZACION DE LA FRACCION P30 -----	17
19. A. Deslipidización -----	17
19. B. Solubilización de la interfase rica en proteínas -----	17
19. C. Solubilización de la interfase protéica con KCl y detergentes -----	17
20. CROMATOENFOQUE -----	17
21. PREPARACION DE LA COLUMNA DE AFINIDAD -----	18
22. CUANTIFICACION DE LA ACTIVIDAD FOSFOLIPASICA DE P30 Y DE LAS FRACCIONES SEPARADAS MEDIANTE LA CROMATOGRAFIA DE ELECTROENFOQUE -----	18

23. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD FOSFOLIPASICA DE LA FRACCION II.2 EN LA MEZCLA DE ENSAYO CON pH, VARIABLES, CALCIO Y EDTA .....	18
23. A. Determinación del efecto del pH sobre la actividad fosfolipásica en las fracciones cromatográficas .....	18
23. B. Determinación de la dependencia de calcio de la actividad fosfolipásica .....	18
23. C. Determinación del efecto del EDTA sobre las actividades fosfolipásicas .....	18
24. RADIOIODINACION DE LA FRACCION II.2 .....	19
25. DETERMINACION DEL PUNTO ISOELECTRICO DE LA FOSFOLIPASA PRESENTE EN LA FRACCION II.2 .....	19
26. GELES DE AGAROSA CON CASEINA PARA DETERMINAR ACTIVIDAD PROTEOLITICA .....	19

#### IV. RESULTADOS

1. EFECTO DE INHIBIDORES DE ACTIVIDAD DE FOSFOLIPASA EN LA HEMOLISIS PRODUCIDA POR LA FRACCION VESICULAR P30. ....	20
1. A. El IR en concentraciones micromolar produce <i>per se</i> una liberación basal de hemoglobina en los eritrocitos humanos .....	20
2. CARACTERIZACION HEMOLITICA DE LA FRACCION P30 .....	21
2. A. La fracción P30 presenta actividad hemolítica dependiente del tiempo de incubación y la dosis .....	21
2. B. La actividad hemolítica de P30 es inhibida por el IR .....	23
3. EXTRACION Y SOLUBILIZACION DE LAS ACTIVIDADES FOSFOLIPASICAS EN LA FRACCION P30 .....	25
4. PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE UNA FOSFOLIPASA A <sub>2</sub> DEPENDIENTE DE CALCIO, CON ACTIVIDAD HEMOLITICA Y CITOLITICA DIRECTA SOBRE CELULAS DE MAMIFERO .....	28
4. A. Cromatofluoreo de la fracción extraída con KCl 1.0 M .....	28
4. B. Cromatografía de la fracción II en la columna de IR-sefarosa-4B .....	30
4. C. Criterio de pureza de la fracción II.2 .....	31
4. D. Punto isoeléctrico (pI) de la fosfolipasa presente en la fracción II.2 .....	33
<b>CARACTERIZACION ENZIMATICA DE LA ACTIVIDAD FOSFOLIPASICA DE LA FRACCION II.2</b> .....	33
4. E. La fracción II.2 presenta sólo actividad fosfolipásica del tipo A <sub>2</sub> .....	33
4. F. La fosfolipasa II.2 presenta actividad fosfolipásica a pH básico .....	34
4. G. La fosfolipasa II.2 dependiente de CaCl <sub>2</sub> .....	35
<b>PROPIEDADES CITOLITICAS DIRECTAS DE LA FOSFOLIPASA II.2</b> .....	35
5. HEMOLISIS .....	36
5. A. La fosfolipasa II.2 tiene actividad hemolítica que depende del tiempo de incubación y la dosis .....	36

5. B. Las actividades hemolíticas de la fosfolipasa II.2 y de la fosfolipasa de <i>C. basiliscus</i> son inhibidas por el IR .....	38
5. C. La actividad hemolítica de la fosfolipasa II.2 es inhibida sólo por altas concentraciones de seroalbumina bovina .....	38
<b>6. CITOLISIS .....</b>	<b>39</b>
6. A. La fosfolipasa II.2 tiene actividad citolítica que es dependiente tanto del tiempo de incubación como de la dosis. ....	39
6. B. Cambios morfológicos producidos en los cultivos celulares incubados con la fosfolipasa II.2. ....	41
<b>7. FRACCIONAMIENTO Y CARACTERIZACION PARCIAL DE OTRAS FOSFOLIPASAS PRESENTES EN LA INTERFASE PROTEICA OBTENIDA CON KCl Y TRITON X-100 .....</b>	<b>43</b>
7. A. La fracción obtenida con KCl-Tritón X-100 presenta 8 actividades fosfolipásicas separables por cromatoenfoque. ....	43
<b>8. CARACTERIZACION ENZIMATICA DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS POR CROMATOENFOQUE DE LAS PROTEINAS SOLUBILIZADAS CON KCl Y TRITON X-100 .....</b>	<b>44</b>
8. A. La actividad enzimática de algunas fracciones es inhibida por EDTA. ....	44
8. B. Las fracciones presentan actividad fosfolipásica del tipo A <sub>2</sub> y A <sub>1</sub> .....	45
8.C. La actividad fosfolipásica de las fracciones III, IV, V y VI puede aún resolverse en dos componentes a través de la cromatografía de afinidad .....	46
<b>9. LA FRACCION II (KCl) Y LA III (KCl Y TRITON X-100) EQUIVALEN A LA MISMA FORMA DE FOSFOLIPASA A<sub>2</sub> APARENTEMENTE .....</b>	<b>48</b>
<b>V. DISCUSION .....</b>	<b>50</b>
Prespectivas .....	58
<b>VI. REFERENCIAS .....</b>	<b>59</b>
<b>VII. APENDICE 1. ARTICULO PUBLICADO COMO PRIMER AUTOR: A NEW AFFINITY ADSORBENT FOR THE PURIFICATION OF PHOSPHOLIPASE A<sub>1</sub> AND A<sub>2</sub> FROM ANIMAL VENOMS. ....</b>	<b>65</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

ml	Mililitro
$\mu$ l	Microlitro
g	Gramos
$\mu$ g	Microgramos
ng	Nanogramos
M	Concentración molaridad
mM	Concentración milimolar
$\mu$ M	Concentración micromolar
N	Concentración normal
$\Delta$	Concentración con respecto a la solución de trabajo
mm	Milímetros
mU	Miliunidades
min	Minutos
°C	Grados centígrados
hrs	Horas
rpm	Revoluciones por minuto
SSB	Solución salina de Hanks
cm	Centímetros
nm	Nanómetros
AGL	Acidos grasos libres
LFC	Lisofosfatidilcolina
FC	Fosfatidilcolina
mmol	Milimoles
$\mu$ Ci	Microcuries
BSA	Seroalbúmina bovina
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
SDS	Dodecilsulfato de sodio
pH	Potencial de hidrógeno
EDTA	Etilendiaminotetracético
IR	Inhibidor de Rosenthal
$r^2$	Correlación con la recta
P	Probabilidad
[ $^{14}$ C]FC(2)	Fosfatidilcolina, 1-2-dipalmitoil-[1-2-palmitoil $^{14}$ C]
[ $^{14}$ C]FC(1)	Fosfatidilcolina, 2-palmitoil-[2palmitoil $^{14}$ C]
DO	Densidad óptica



## LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

1. Clasificación de las fosfatido-acil hidrolasas, de acuerdo con la posición en la molécula del éster que hidrolizan -----	1
2. Crecimiento de <i>Entamoeba histolytica</i> cepa HK9 -----	13
3. Fraccionamiento subcelular de trofozoitos de <i>E. histolytica</i> -----	14
4. Liberación de hemoglobina de eritrocitos humanos por efecto del IR -----	21
5. La fracción P30 presenta actividad hemolítica dependiente del tiempo de incubación -----	22
6. La fracción P30 presenta actividad hemolítica dependiente de la dosis -----	23
7. La actividad hemolítica de P30 es inhibida fuertemente por el IR. -----	24
8. Deslipidización de la fracción P30 con diferentes disolventes orgánicos -----	25
9. Solubilización de la actividad de fosfolipasa A del precipitado en la interfase éter etílico/amortiguador acuoso con detergentes o alta fuerza iónica -----	26
10. Solubilización de la actividad de fosfolipasa A del precipitado en la interfase éter etílico/amortiguador acuoso con detergentes en presencia de alta concentración de KCl -----	27
11. Cromatofoco de la fracción solubilizada con KCl 1 M -----	29
12. Cromatografía de afinidad-IR de la fracción II.2 -----	31
13. Electroforesis en gel en placa de poliacrilamida (12.5%) en presencia de SDS, de la fracción II.2 iodada -----	32
14. Electroforesis en geles en condiciones de SDS al (20%) (A) y en condiciones nativas Tris-HCl, homogéneos (8-25%) (B) de la fracción II.2. -----	32
15. Isoelectroenfoco de la fracción II.2 -----	33
16. La fracción II.2 presenta sólo actividad fosfolipásica del tipo A2 -----	34
17. La fracción II.2 presenta actividad fosfolipásica del tipo A a pH básico -----	35
18. Liberación de hemoglobina en función del tiempo de incubación con la fosfolipasa II.2 -----	36
19. Curva dosis respuesta en la hemólisis por la fosfolipasa II.2 -----	37
20. Efecto del inhibidor de Rosenthal en la liberación de hemoglobina producida por la fracción II.2 y de la fosfolipasa de <i>C. basiliscus</i> -----	38
21. Efecto de la seroalbumin bovina en la liberación de hemoglobina producida por la fosfolipasa II.2 y la fosfolipasa de <i>C. basiliscus</i> -----	39
22. Relación temporal de la citólisis producida por la fosfolipasa II.2 -----	40
23. Relación entre la cantidad de proteína de la fosfolipasa II.2 y el porcentaje de citólisis -----	41
24. Secuencia de fotomicrografías de una monocapa de células CHO en presencia de la fosfolipasa II.2 durante 6 hrs -----	42
25. Cromatofoco de la fracción obtenida con KCl 1.0 M y Tritón X-100 al 0.5 % -----	43

26. Sensibilidad de la actividad fosfolipásica de las fracciones del cromatoenfoco a la presencia de calcio y EDTA -----	44
27. Identificación del tipo de fosfolipasa presente en las fracciones II-VII -----	45
28. Cromatografía de afinidad-IR de las fracciones II-VII. -----	47
TABLA I -----	33
TABLA II -----	49

DEDICATORIA

A QUIEN DEBO MI SER, MI FORMACION

Y MI CARRERA:

HECTOR VARGAS GARCIA

Y

ELVIA VILLARREAL DE VARGAS

A LA MEMORIA DE MIS ABUELOS:

ALEJANDRO VARGAS GUERRA

Y

JOSEFINA GARCIA DE VARGAS

A MIS HERMANOS:

HECTOR

ELVIA

LETICIA

ESPECIALMENTE A QUIEN COMPARTIO SU TIEMPO Y CARIÑO CONMIGO  
HILDA LAURA ANZURES ZENDEJAS.

A MIS MAESTROS

A MIS COMPAÑEROS DEL LABORATORIO

A TODOS MIS FAMILIARES Y AMIGOS

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco:

Al Centro Sobre Ingeniería Genética y Biotecnología por otorgarme las facilidades para la realización de ésta tesis.

Al Dr. Francisco Bolivar Zapata quien fungió como Director del Centro de Investigación Sobre Ingeniería Genética y Biotecnología, durante la elaboración del presente trabajo, por las amplias facilidades que me otorgó.

Al Dr. Alejandro Alagón Cano por la enseñanza, dirección, asesoría y amistad que me brindó en el presente trabajo.

Al Dr. Salvador Saíd Fernández por asesoría, confianza, estímulo y amistad desde que nos conocemos.

A los Drs. Lourival D. Possani P., Alejandro Alagón C., Salvador Saíd F., Xavier Soberón M., Fedrico Sanchez R., Alejandro Bayon C. y Baltasar Becerril L., por sus consejos y revisión de ésta tesis.

A el Dr. Jesús Martín Polo, por su asesoría, consejos, estímulos y amistad, durante este trabajo.

Al Técnico académico asociado "A" Sr. Alejandro Olvera Rodríguez, por su apoyo técnico en el cultivo de amibas, y en algunos experimentos que fueron necesarios para la elaboración de esta tesis.

A los técnico Biol. René Hernández Vargas, Georgina Estrada y Sonia Rojas por sus consejos y apoyo.

A Hilda Laura Ansurez Zendejas, por su inapreciable compañía y estímulo.

Al Sr. Sergio Trujillo Jiménez, por el excelente trabajo gráfico que ilustra ésta tesis.

A los integrantes del Laboratorio de Bioquímica de Proteínas: Tec. Alejandro Olvera, Dr. Miguel Angel Torti, Biol. Carlos Antonio González J, M en C. María Luisa Esteves P. Dr. Jesus Martín P, M. en C. Eleuterio Astorga A, M en C. Angelina Ramírez, Dr. Miguel Angel C., M en C. Mario Zurita, Lic. IBB. Bertha Michel, Lic. en IBB Isabel Tussié, QFB. Enrique Macario H., M en C. Estefan Miranda, Dra. Hilda María Lomelí, QFB. Georgina Estrada, Biol. René Hernández, M en C. Elena Porta, Dra. Nancy Asenrod y al Dr. Francisco Marquez. por la amistad y apoyo que me brindaron durante el desarrollo de este trabajo.

A todos mis compañeros y amigos que me ayudaron de una forma u otra.

## RESUMEN

Las fosfolipasas son enzimas ubicuas, que pertenecen al grupo de las acil hidrolasas y son conocidas con el nombre genérico de esterases. Se dividen en A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B, C, D, de acuerdo al enlace que rompen dentro de la estructura de un fosfolípido.

Hace algunos años se encontró que los extractos totales del género *Entamoeba* tienen actividad hemolítica y citolítica -sobre eritrocitos de varias especies de mamífero y las células CHO respectivamente-. La mayor parte de ambos efectos residen en una fracción vesicular llamada P30, que consiste por observaciones en base a microscopía electrónica de vesículas selladas, posiblemente de las membranas plasmáticas y digestivas propias de las amibas. Se ha propuesto que una o varias fosfolipasas del tipo A están relacionadas con estas actividades patogénicas de *Entamoeba histolytica* y que esta(s) podría(n) ser un posible factor de virulencia del parásito.

En este trabajo nos propusimos explorar con mayor profundidad el efecto de dos inhibidores específicos de fosfolipasas sobre la acción lítica de la fracción subcelular P30 y sus fosfolipasas sobre eritrocitos humanos y células de la línea CHO, así como la caracterización y purificación parcial de las fosfolipasas presentes en la fracción P30.

Cuando analizamos la importancia relativa de la actividad fosfolipásica en el efecto hemolítico de la fracción subcelular P30 encontramos, con el inhibidor de Rosenthal, una disminución fuerte de la liberación de hemoglobina cuando usamos eritrocitos humanos. Por estos resultados, desarrollamos una nueva columna de afinidad, usando el IR como ligando; encontramos que es muy útil para la purificación a homogeneidad de las fosfolipasas A de venenos de animales y de *E. histolytica*. Estos resultados están formalizados en el artículo "A NEW AFFINITY ADSORBENT FOR THE PURIFICATION OF PHOSPHOLIPASES A<sub>1</sub> AND A<sub>2</sub> FROM ANIMAL VENOMS, por VARGAS-VILLARREAL, J.; MARTIN-POLO, J.J.; REYNAUD, E. Y ALAGON-CANO, A; TOXICON (1991) Vol. 29: pp 119-124. Este artículo forma parte de la presente tesis y se adiciona una copia del mismo.

Por otro lado implementamos una técnica que permite deslipidizar a la fracción P30, donde encontramos que con éter etílico pudimos recuperar un 90 % de la actividad fosfolipásica inicial. Una vez deslipidizada la fracción P30, solubilizamos las fosfolipasas amibianas, usando dos estrategias: a) alta fuerza iónica KCl 1 M y b) con la combinación de KCl 1 M y Tritón X-100 0.5 %; observamos que la actividad fosfolipásica con 1M KCl y Tritón X-100 se recupera en forma soluble el 26 y 27 % respectivamente, y un 85 % con la combinación de ambos tratamientos.

Más tarde, previo a la afinidad, desarrollamos un método para separar las distintas fosfolipasas solubilizadas de la fracción P30; este fué el cromatoenfoco en columna, que separa a las proteínas de acuerdo a su punto isoeléctrico. Decidimos comenzar con la preparación obtenida mediante el uso de KCl 1 M, ya que ésta tiene actividad fosfolipásica y no presenta los problemas inherentes a las muestras con detergentes. Esta preparación mostró la actividad de tres fosfolipasas diferentes, la fracción II, recuperada de la columna del cromatoenfoco fué la única que se eluyó dentro del gradiente de pH (entre 8.0 y 7.3) y representó el 38 % de la actividad fosfolipásica total.

Cuando pasamos la fracción II por una columna de afinidad con IR-sefarosa 4B, la actividad fosfolipásica se separó en tres componentes. La fracción II.2 se retuvo en la columna y se eluyó con EDTA 50 mM. Esta fracción presentó las siguientes características: a) actividad fosfolipásica del tipo A<sub>2</sub>, b) está compuesta por sólo un componente protéico, con un peso molecular de 15,000 Daltons, c) presenta un pH óptimo de 8.0, d) presenta un punto isoeléctrico de 7.0, e) es dependiente de calcio, f) presenta acción lítica directa muy importante sobre eritrocitos humanos y células nucleadas de la línea CHO y g) la acción lítica es inhibible con el inhibidor de Rosenthal (IR) y sólo con altas concentraciones de seroalbumina bovina.

Con la intención de fraccionar y caracterizar al mayor número posible de fosfolipasas amibianas, aparte de la fosfolipasa A<sub>2</sub> ya descrita, decidimos emplear la fracción más rica en actividad fosfolipásica solubilizada en presencia tanto de KCl 1 M y 0.5 % de Tritón X-100. Esta fracción fué cromatografiada en la columna de cromatoenfoque; encontramos cuando menos 8 picos con actividad fosfolipásica del tipo A (A<sub>1</sub> y/o A<sub>2</sub>), pero sólo 6 de ellas se separaron en forma aceptable dentro del gradiente de pH. Estas fracciones presentan las siguientes características: a) Tanto la fracción que no se pega al cromatoenfoque (I), como la que se eluye con alta fuerza iónica (VIII) (NaCl), dada su complejidad se guardaron a -70 °C, para su posterior caracterización; b) la fracción II se eluye entre un pH de 8.2 y 8.1, presenta actividad fosfolipásica del tipo A (A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub>), y depende de calcio; c) la III eluye a pH de 8.0 y 7.3 (que se asemeja a la fracción II obtenida con KCl 1M), presenta sólo actividad del tipo A<sub>2</sub>, es dependiente de calcio y se puede resolver en dos actividades fosfolipásicas por la columna de IR sefarosa 4B; d) la cuarta, quinta, sexta y séptima se eluyen en un pH entre 7.2-6.4, 6.4-5.5, 5.5-4.8 y de 4.8-4.0, respectivamente. Las fracciones V, VI y VII presentan actividad de tipo A (A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub>) y la fracción IV sólo del tipo A<sub>2</sub>. Sólo las fracciones V y VII son inhibidas sus actividades con la presencia de EDTA y sólo las fracciones IV, V y VI pueden aún resolverse en dos componentes con actividad fosfolipásica en la columna de afinidad (IR).

También nos interesó conocer si algunas de las fosfolipasas solubilizadas de la fracción P30 son resistentes a la proteólisis endógena amibiana. Por ello, en otra serie de experimentos solubilizamos a la fracción P30 en la ausencia del inhibidor reversible de tiol-proteasas el p-cloromercuribenzoato de sodio, y observamos que la fracción obtenida con KCl 1 M y 0.5 % de Tritón X-100 y pasada por la columna de cromatoenfoque presenta 4 picos separadas en el gradiente de pH y con actividad fosfolipásica; las fracciones corresponden a las III, IV, V y VI, obtenidas en presencia del inhibidor. Estos resultados indican que algunas de las fosfolipasas de los trofozoítos de *E. histolytica* son resistentes a la degradación por las proteasas que normalmente contienen estas células; la fosfolipasa II.2 fué una de ellas.

Como objetivo siguiente nos proponemos obtener información de la secuencia peptídica de la fosfolipasa II.2 a fin de poder aislar su gen y caracterizarlo, así como conocer la distribución subcelular de la enzima y definir su contribución, si es que la tiene, en los mecanismos moleculares citotóxicos de los trofozoítos de *E. histolytica*.

## SUMMARY

Phospholipases are hydrolytic enzymes and based on their positional specificity they are classified in four groups (A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B, C and D). Phospholipases occur ubiquitously in nature.

It has been shown that whole homogenates from *Entamoeba histolytica* trophozoites have strong hemolytic and cytolytic activities. Most of the lytic activity resides in the subcellular fraction denominated P30. In the other hand, it has been proposed that at least one phospholipase A may be involved in the pathogenic mechanisms of this protozoa.

In the present thesis we analyzed the effect of two specific inhibitors of phospholipases A on the lytic activity of the subcellular fraction P30 and its phospholipases upon red blood cells and CHO cells. Also we purified and characterized some phospholipases from the fraction P30.

We found that the hemolytic effect of the P30 fraction was strongly inhibited by Rosenthal's inhibitor. Therefore, we prepared a new affinity adsorbent with coupled RI as the ligand. The resin was suitable for the purification of a number of phospholipases A from animal venoms and from *E. histolytica*, see "A NEW AFFINITY ADSORBENT FOR THE PURIFICATION OF PHOSPHOLIPASES A<sub>1</sub> AND A<sub>2</sub> FROM ANIMAL VENOMS (1991) VARGAS-VILLARREAL, J.; MARTIN-POLO, J.J.; REYNAUD, E. and ALAGON-CANO, A; TOXICON, Vol. 29: pp 119-124.

Phospholipases were solubilized from deslipidized P30 fraction by two procedures: high salt concentration (1 M KCl) and a combination high salt and 0.5% Triton X-100. The recovery, in terms of enzyme activity, was 26 and 85 %, respectively.

A pure phospholipase A (II.2) was isolated from the sample obtained with high KCl through chromatofocusing and affinity chromatography (38% yield). The phospholipase II.2 has the following properties: a) it is an A<sub>2</sub>-type enzyme, b) it is a single protein with an apparent M.W. of 15,000 daltons, c) its highest enzymatic activity is at pH 8.0, d) it has an isoelectric point of 7.0, e) its activity is Ca<sup>++</sup>-dependent, f) it displays a very strong direct lytic activity upon red blood cells and nucleated cells of the CHO line, and g) its lytic activity is inhibited by RI at micromolar concentrations and by BSA, but only at very high concentrations.

The fraction obtained with the combination of high KCL and detergent was also subjected to chromatofocusing. Six phospholipase A activities were separated within the pH gradient and characterized in terms of their specificity, their sensitivity to RI, EDTA and endogenous proteolytic activity, and their behavior in the affinity column.

## I. INTRODUCCION

Las fosfolipasas son enzimas ubicuas (1), que pertenecen al grupo de las hidrolasas y son conocidas con el nombre genérico de esterases (2,3), ya que actúan sobre los enlaces éster de los fosfolípidos (2,3).

### Clasificación

Las fosfolipasas más comunes se dividen en: A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B, C y D, de acuerdo con la posición del éster que hidrolizan preferentemente (Figura 1) (1,2,3). Esta forma de clasificar a estas enzimas es la aceptada por la Comisión de Enzimología de la Unión Internacional de Bioquímica (cf. ref. 4):

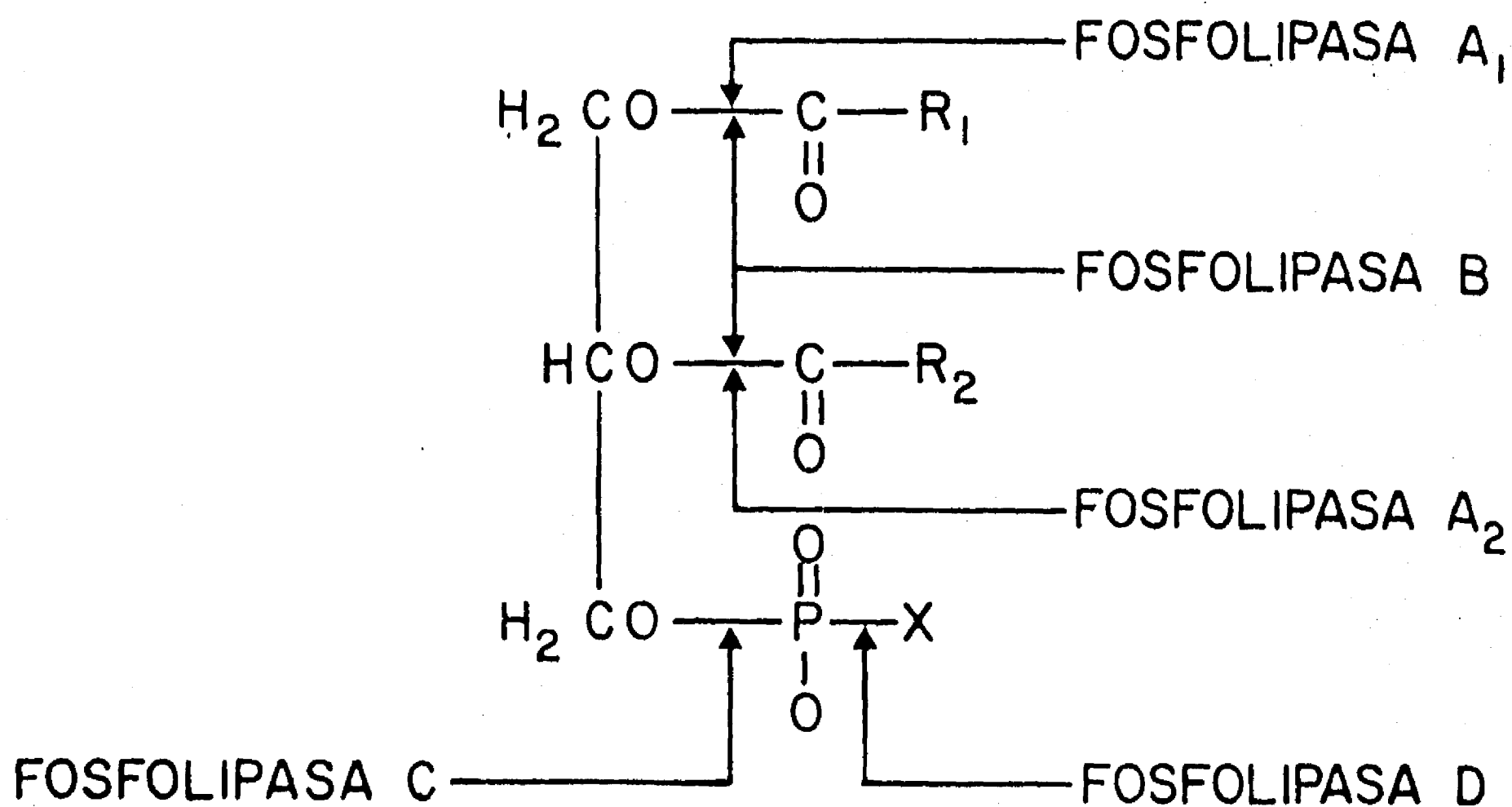


Figura 1. Clasificación de las fosfatidil-acil-hidrolasas, de acuerdo con la posición en la molécula del éster que hidrolizan.

i) Las de tipo A<sub>1</sub> definidas como EC 3.1.1.32; son aquellas enzimas que hidrolizan la posición sn-1-fosfoglicerido, liberando, el ácido graso de la posición 1 y un monoacil-2-glicerofosfátido, en forma equimolar (1,2,3,4). Estas enzimas se han encontrado en células procarióticas y eucarióticas. En general, son independientes de calcio y requieren un pH ácido ó ligeramente neutro para su funcionamiento (1,3,4).

ii) Las de tipo A<sub>2</sub> definidas como EC 3.1.1.4; son enzimas lipolíticas que hidrolizan el acilo de la posición 2 de un fosfoglicerido, produciendo un ácido graso y un monoacil-1-glicero-fosfátido, en forma



equimolar (1,2,3,4). Se han aislado aproximadamente 50 de estas fosfolipasas. Principalmente de páncreas de mamíferos, veneno de serpientes, veneno de abeja y diversos microorganismos (1,3,4,5). En general, estas fosfolipasas se caracterizan por ser termoestables y por su capacidad para actuar en disolventes orgánicos (6,7). Se les ha localizado extracelularmente en forma soluble, asociadas a membranas plasmáticas o lisosomales, o solubles en lisosomas y citosol (1,3,4,5,8).

iii) Las de tipo B. Se conocen a este tipo de enzimas como sinónimo de lisofosfolipasas, aunque algunos autores las han descrito como aquellas enzimas que, por sí solas, pueden catalizar la completa desacilación de varios diacilglicero-fosfolípidos (1,2,3,4). Las enzimas de esta variedad equivalen a una combinación de dos actividades de fosfolipasas. Por ejemplo, una fosfolipasa A<sub>1</sub>, ó una fosfolipasa A<sub>2</sub> con la combinación de una lisofosfolipasa. Se les ha encontrado en levaduras (9), bacterias y hongos (10,11,12). Su pH óptimo es generalmente alcalino.

iv) Las de tipo C, definidas como EC 3.1.4.3; catalizan la desacilación de diacilglicero-fosfolípidos en 1,2-diacilglicero y fosforilcolina (2,3,4). Son producidas por ciertas bacterias, que las excretan, o están asociadas a membrana en células vegetales, algas y levaduras (1,3,4,5,13).

v) Las de tipo D, definidas como EC 3.1.4.4; catalizan la hidrólisis del enlace éster arriba del fosfato, produciendo una molécula de colina y un 1,2-diacilgliceril-fosfátido (1,2,3,4). Este tipo de enzimas se han encontrado principalmente en plantas, levaduras y bacterias.

vi) Las lisofosfolipasa definidas como EC 3.1.1.5; catalizan la hidrólisis del aciléster de los fosfolisoderivados completando la desacilación de los fosfoglicéridos (1,2,3,4). En general, estas enzimas son utilizadas para realizar el catabolismo de los fosfolípidos en las células. Se les ha descrito en insectos, plantas y bacterias (1,4,5,14). En general no requieren cofactores metálicos y generalmente son inhibidas por detergentes (1).

Algunas de las fosfolipasas antes descritas actúan con mayor eficiencia sobre un tipo específico de acilfosfátidos (cf.ref. 8,15), p.e., las fosfolipasa A<sub>2</sub> de *Crotalus adamanteus* y de mitocondria de hígado de rata hidrolizan preferentemente fosfatidilcolina (16) y fosfatidiletanolamina (17), respectivamente. En tanto que la de cerebro bovino actúa exclusivamente sobre fosfatidilinositol (18).

#### **Características generales de las fosfolipasas del tipo A**

A las fosfolipasas A se les conoce desde hace 100 años (cf. ref. 19), pero fué hasta hace 20 que se inició su investigación por la importancia que tienen en ciertos procesos biológicos. Se les ha encontrado tanto dentro como fuera de las células. Forman parte esencial de diversos procesos fisiológicos como: i) recambio de fosfolípidos en las biomembranas (3,20), ii) digestión en los fagosomas (1), iii) neurotoxicidad y citotoxicidad en venenos muy activos de hongos, celenterados, insectos, arácnidos y reptiles (19), iv) en procesos inflamatorios (21) y v) producción de ácidos grasos libres, a partir de los cuales las ciclooxigenasas sintetizan prostaglandinas y estas últimas intervienen en muy diversos mecanismos de regulación celular (1,3,4).

Existen entre las fosfolipasas, principalmente las del tipo A<sub>2</sub>, numerosas diferencias fisicoquímicas, tales como punto isoeléctrico, que varía ampliamente (pH 4.0 a 11.0); en estados de agregación, estas

pueden existir en forma monomérica o dimérica y especificidad por el substrato. En contraste las fosfolipasas presentan algunas otras características comunes o conservadas como: bajo peso molecular (12,000 a 18,000 en forma monomérica, aunque se han encontrado con mayor peso molecular (3,4)), contenido de numerosos puentes disulfuro (4,6,22), alto grado de homología en su secuencia primaria y en general, dependen de cofactores metálicos divalentes, principalmente  $\text{Ca}^{++}$  (1,3,4,6).

Se ha observado que las fosfolipasas del tipo A se localizan principalmente en la membrana plasmática y en los lisosomas de todas las células estudiadas hasta ahora. Las fosfolipasas membranales se hallan fuertemente asociadas a la bicapa lipídica y se inactivan cuando se les separa de éstas matrices con disolventes orgánicos, pero se mantienen estables e incluso se activan en presencia de detergentes no iónicos (15,16,17), las cuales mimetizan el ambiente hidrofóbico original de estas enzimas. Un gran número de fosfolipasas del tipo  $A_1$ ,  $A_2$ , B y C requieren la presencia de agentes tensoactivos naturales, como: i) ácidos grasos libres, ii) fosfolisoderivados ó iii) factores líticos directos (los cuales son péptidos anfipáticos, lineales de 20 a 30 residuos). Estos últimos frecuentemente forman parte activa de mecanismos multifactoriales, junto con fosfolipasas  $A_2$  solubles, principalmente en venenos de reptiles e insectos (1,3,4,5). Algunas otras fosfolipasas lisosomales se activan por efecto del colesterol, mediante un mecanismo aún no determinado (23). El pH, la temperatura de incubación, el  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$  son los factores que más influyen en la actividad de la mayoría de estas enzimas (1,5,8,24).

### **Métodos de ensayo**

Los métodos de ensayo para las fosfolipasas A se fundamentan en la cuantificación de los ácidos grasos libres y de los fosfolisoderivados producidos por la hidrólisis de los fosfolípidos correspondientes. Los métodos que se usan con mayor frecuencia para la cuantificación de la actividad fosfolipásica son: a) el titulométrico, que consiste en la cuantificación de la cantidad de hidróxido de sodio necesario para mantener estable el pH de la mezcla de ensayo, la cual es proporcional al número de moléculas de ácidos grasos liberados y por lo tanto, a la actividad de la enzima (cf.ref. 25); b) el radioensayo, que se basa en la separación por cromatografía en placa fina de los productos de hidrólisis y del substrato no hidrolizado, marcado con radioisótopos en sitios específicos. Después se cuantifica la radioactividad en las manchas lipídicas correspondientes de los productos de hidrólisis y estos son proporcionales a la actividad fosfolipásica expresada como nanomoles de fosfolípido hidrolizado por minuto (26). El radioensayo permite también clasificar con precisión el tipo de fosfolipasa en estudio, dependiendo de la localización de la marca radiactiva en los fosfolípidos y en los productos de hidrólisis (26); c) geles de agarosa, con este método se cuantifica la actividad fosfolipásica midiendo el diámetro de los halos claros producidos por la difusión de la fosfolipasa e hidrólisis de la ovolécitina en un gel de agarosa con yema de huevo. El área de hidrólisis es directamente proporcional al logaritmo de la concentración de la enzima (27). Recientemente en nuestro laboratorio hemos desarrollado una modificación ha este último método el cual consiste en la gelificación en geles de agarosa con rodamina 6G proporcionando al método una sensibilidad 10 veces mayor que al obtenida por el método original de Shirt (28). Las zonas en el gel donde ocurrió la hidrólisis de fosfatidilcolina de huevo pierden la característica de fluorescencia de la rodamina 6G.

## **Solubilización de proteínas asociadas a membrana**

En general las proteínas de la membrana plasmática se pueden clasificar en dos categorías de acuerdo con la firmeza de su unión con la bicapa lipídica: 1) proteínas periféricas o de tipo I, las cuales se hallan débilmente unidas por una región pequeña pero muy hidrofóbica a la superficie de la membrana y pueden separarse fácilmente de ella en forma soluble mediante procedimientos de extracción suaves (2,29) y 2) proteínas integrales o del tipo II, en donde una gran porción de la proteína está insertada en la bicapa lipídica. Las proteínas del tipo II constituyen el 70% o más de las proteínas totales de la membrana (2,29) y sólo pueden separarse mediante tratamientos severos (29).

Los procedimientos más usados para la solubilización de las proteínas asociadas a membrana incluyen el uso de: i) disolventes orgánicos (29,30), ii) agentes caotrópicos (29), iii) alta fuerza iónica (1,4,29) y iv) detergentes (8,10,15,29,30,31,32,33,34). Estos dos últimos son los más frecuentemente utilizados ya que el primero permite desprender de las membranas a las proteínas del tipo I, en tanto que el uso de detergentes es más para las proteínas integrales ó del tipo II. Uno de los aspectos más importantes en la solubilización de las proteínas del tipo II asociadas a membranas es el escoger un detergente adecuado, la elección se basa en la habilidad del detergente para mantener una propiedad específica - p.e. actividad enzimática (1,29,34), estructura (29,31,32,34), etc. -, en general se han utilizado los detergentes del tipo no iónico ya que estos no desnaturalizan a las proteínas de membrana, así como la factibilidad de remover el detergente usando diferentes técnicas convencionales como son: diálisis, filtración en gel, gradiente de densidad o intercambio iónico (8,9,15,31,34).

## **Purificación de proteínas asociadas a membrana**

La purificación de fosfolipasas A del tipo I (periféricas) pueden extraerse de la bicapa lipídica utilizando condiciones suaves; alta fuerza iónica o acidificando el medio (1,3,4,29); para después usar métodos convencionales de purificación, tratando a las fosfolipasas como enzimas solubles. (8,14,24,34).

La purificación de las fosfolipasas del tipo II (integrales) es más complicada, ya que la mayor parte de la proteína se encuentra en el interior de la bicapa lipídica y durante su separación, estas presentan una fuerte tendencia a formar agregados (32,34); para la solubilización de estos agregados se utilizan preferentemente detergentes (1,3,4,8,15,31,32,33,34). La purificación puede llevarse a cabo utilizando filtración en gel, intercambio iónico, cromatografía de alta presión, cromatofoco (14,35), y con mayor frecuencia, cromatografía de afinidad (24,36,37), ya que esta última representa una herramienta muy útil como el método más rápido, eficiente y específico de purificación. Las columnas de ésta clase de cromatografía se construyen empleando un análogo de fosfatidilcolina como ligando acoplado covalentemente a sefarosa-4B (37). Esta clase de cromatografía se puede emplear con la condición de que durante la separación de las fosfolipasas del tipo II se mantenga la presencia del detergente adecuado para la solubilización y evitar la agregación de las proteínas entre sí (1,3,4,14,15,24,29,31,32).

## Importancia de las fosfolipasas en los mecanismos patogénicos

Desde hace algunos años se ha estudiado intensamente a las fosfolipasas del tipo A de los más diversos orígenes. Su importancia radica en que sus propiedades hemolíticas y citolíticas permiten causar daños tisulares masivos en los organismos atacados. El efecto hemolítico y citolítico de estas enzimas se debe a su capacidad para desacilar fosfolípidos de la membrana plasmática y producir ácidos grasos libres y fosfolisoderivados. Ambos productos son léticos y se acumulan como consecuencia de una misma reacción y potencian la actividad hidrolítica de las fosfolipasas. Sin embargo los efectos biológicos de los ácidos grasos libres y fosfolisoderivados son muy variados, dependiendo del origen, localización y mecanismos de regulación de las células blanco y de las fosfolipasas. Las más estudiadas hasta ahora son las fosfolipasas de venenos de diversas especies de reptiles, la gran mayoría de estas fosfolipasas son del tipo A<sub>2</sub>. A pesar de su reconocida toxicidad, muy pocas de estas enzimas actúan por sí solas, ya que requieren la presencia de factores anfífilicos, que generalmente las acompañan. La mayoría de ellas se potencian fuertemente con los ácidos grasos libres y los fosfolisoderivados que se acumulan por efecto de su propia actividad (1,3,4,5). Las fosfolipasas A<sub>2</sub> de venenos de reptiles e insectos, las de una gran número de microorganismos patógenos y las de linfocitos de mamífero son potentes citolisinas (5,15,24,26,37). A muchos de los parásitos que se caracterizan por destruir tejidos, como las especies patógenas de *Trypanosomas* (38), *Acantamoeba* (38) y *Naegleria* (39), se les ha detectado *in vitro* actividad de fosfolipasa A<sub>2</sub>, la que está fuertemente implicadas en la lisis celular y por consiguiente se le ha propuesto en el mecanismo patogénico respectivo.

### Antecedentes de la actividad fosfolipásica de *E. histolytica*

Hace algunos años se propuso que las fosfolipasas del tipo A son posibles factores patogénicos de *E. histolytica*. En modelos *in vitro* de interacción, tanto con trofozoitos enteros como en extractos amibianos con células susceptibles de mamífero, la actividad citolítica amibiana parece deberse a una fosfolipasa A (40,41,42,43), y a otros factores como el amibaporo (44,45), proteasas (46,47) y un factor de efecto inmediato dependiente del potencial de oxidación-reducción (48). Con respecto a las fosfolipasas, McCaul y col. (43) observaron con trofozoitos enteros de *E. histolytica* y células Chang premarcadas con [<sup>51</sup>Cr], que la radioactividad liberada fué disminuida en un 50 % de inhibición por el efecto de un inhibidor específico para fosfolipasas del tipo A, el inhibidor de Rosenthal (IR) (49), a concentraciones que fueron desde 0 hasta 174  $\mu$ M.

Saíd-Fernández y López-Revilla describieron y caracterizaron una actividad hemolítica en extractos libres de trofozoitos de *E. histolytica* (50). Después Prasad y col. confirmaron y ampliaron estas observaciones (51). Más tarde se observó que este efecto hemolítico se localiza mayoritariamente en una fracción vesicular llamada P30 ya que es una fracción obtenida a 30,000 X g, donde se ha observado por microscopía electrónica que esta fracción consiste de membranas selladas, posiblemente de la membrana plasmática y de las vesículas amibianas (50). Es máxima en presencia de calcio 1 mM a pH 8.0 y su potencia se incrementa hasta 100 veces después de 36 hrs de incubación a 37 °C (50). Este efecto se debe a dos componentes uno termoestable y otro termolábil (52). El primero está constituido por ácidos grasos libres y se propuso que el segundo es una proteína con actividad fosfolipásica del tipo A. De hecho, los ácidos grasos pueden ser el producto de la fosfolipasas

A durante la preincubación.

Durante mi trabajo de tesis de Maestría encontré que la fracción P30 proveniente de extractos de trofozoítos cultivados axénicamente de *E. histolytica* (HK9:NIH), tienen dos tipos de actividad fosfolipásica, una A<sub>1</sub> y una A<sub>2</sub>, además de una lisofosfolipasa. La actividad se debe al efecto de dos tipos de fosfolipasas: una cuya actividad máxima se detecta a pH 3.5 y no requiere Ca<sup>++</sup> y la otra que sí lo requiere y cuya actividad máxima es a pH 8.0 (53).

Varios de nuestros hallazgos fueron confirmados y publicados por Ravdin y col. (41), utilizando extractos sonicados de cultivos axénicos de *E. histolytica* (HM1:IMSS), donde encontraron dos actividades de fosfolipasas tipo A<sub>2</sub>: una independiente de Ca<sup>++</sup> a pH ácido y asociada a la fracción soluble de dichos extractos y otra altamente asociada a la superficie de la membrana plasmática de las amibas, que es dependiente de Ca<sup>++</sup> y cuyo pH óptimo es alcalino. Dicho grupo propuso a la fosfolipasa A<sub>2</sub> dependiente de Ca<sup>++</sup> como uno de los factores citolíticos implicados en el mecanismo patogénico de la amibiasis, basándose en los hallazgos de nuestro grupo de trabajo (53) y en los suyos.

## OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo consistió en separar las fosfolipasas de la fracción P30 de *E. histolytica*, y purificar la fosfolipasa A<sub>2</sub> dependiente de calcio y resistente a proteólisis endógena y determinar su participación en el efecto hemolítico y citolítico de P30.

## Secuencia del trabajo experimental

El presente trabajo se dividió en las siguientes diez fases: 1) determinación de la importancia relativa de la actividad fosfolipásica en el efecto hemolítico de la fracción subcelular P30 (50). Lo cual implicó, a su vez: a) la determinación de la liberación basal de hemoglobina por la presencia del inhibidor de Rosenthal; b) la determinación de la actividad hemolítica de la fracción P30, en cuanto al tiempo de incubación y su dosis y c) la inhibición del efecto hemolítico de la fracción P30, por la presencia del inhibidor de Rosenthal. 2) construcción de una nueva columna de afinidad para aislar fosfolipasas del tipo A, con el inhibidor de Rosenthal como ligando. 3) la implementación de una técnica que permite deslipidizar a la fracción P30, con la mínima pérdida de actividad fosfolipásica. 4) el ensayo y selección de diversos detergentes para solubilizar a las fosfolipasas de P30. 5) la extracción de una fosfolipasa con la presencia de KCl 1.0 M. 6) diseño e implementación de la estrategia de purificación de las fosfolipasas amibianas, lo cual implicó: a) el uso de una columna de cromatoenfoco como precolumna de separación y b) el uso de la columna de afinidad IR. 7) caracterización fisicoquímica de la fosfolipasa extraída con KCl 1.0 M y purificada en la columna de afinidad, lo cual implicó: a) la determinación del peso molecular y pureza por radioyodación, b) la obtención del punto isoeléctrico de la fosfolipasa, c) el tipo de fosfolipasa presente, d) dependencia de calcio y pH óptimo y e) la determinación de la actividad hemolítica y citolítica de esta enzima *per se*. 8) determinación de la inhibición del IR y la seroalbumina bovina sobre el efecto hemolítico de la

fosfolipásica II.2 obtenida con la columna de afinidad. 9) extracción de las fosfolipasas amibianas solubles en KCl-Tritón X-100 y sus análisis con respecto a: a) la purificación y clasificación de estas fosfolipasas eluidas en la precolumna de cromatoenfoco, b) la determinación del tipo de fosfolipasa y el efecto de calcio y EDTA sobre las fosfolipasas separadas y c) la purificación de éstas en la columna de afinidad-IR y 10) determinación de las fosfolipasas A resistentes a proteólisis endógena.

### **Contribución y perspectivas del presente trabajo**

Consideramos que las principales contribuciones de este trabajo a los campos de la amibiasis experimental y a la de bioquímica de proteínas son las siguientes: i) la confirmación de la participación de las fosfolipasas de P30 como agentes hemolíticos; ii) el desarrollo de una columna de afinidad para la purificación de las fosfolipasas del tipo A utilizando como ligando el IR inmobilizado en sefarosa 4-B; iii) la purificación y caracterización de una fosfolipasa del tipo A<sub>2</sub> que es extraída con alta fuerza iónica de la fracción P30 deslipidizada. Esta actividad fosfolipásica de tipo A<sub>2</sub> presenta un pH básico, depende de Ca<sup>++</sup>, tiene un peso molecular de 15,000 Daltons y su actividad fosfolipásica fué resistente a las proteasas amibianas, así como su actividad hemolítica y citolítica; y iv) el aislamiento de la actividad fosfolipásica parcial de seis fosfolipasas de *Entamoeba histolytica*.

Las perspectivas de este trabajo consisten en determinar la topografía de las fosfolipasas en la amiba y analizar la contribución relativa de la fosfolipasa del tipo A<sub>2</sub>, en la virulencia de *E. histolytica*. Posteriormente se podría intentar el aislamiento de las otras cinco fosfolipasas que logramos purificar parcialmente en este trabajo, tanto para caracterizarlas como para analizar su importancia en la biología del agente casual de la amibiasis.

## II. MATERIALES Y METODOS

### 1. Origen de los reactivos.

Todos los compuestos usados en este trabajo fueron grado reactivo y sus orígenes fueron los siguientes: de Pierce and Warriner Chem. Co. octilglucósido y 1,3,4,6-tetracloro-3, 6 -difenilglicoluril (Iodogén); de Biochemicals, ICN., Clv, Ohio., ácido p-cloro-mercuribenzoato sal sódica; de Calbiochem, S.A., inhibidor de Rosenthal (IR) (dimetil-di-2,3-distearoilpropil-2'-hidroxietil acetato de amonio); de Sigma Chemical Company., L-2-3-Dihexadecil-glicero-1-fosforilcolina; de Amersham Inc, Co., L-1-lisopalmitoil-L-1-[palmitoil-1-<sup>14</sup>C]-fosfatidilcolina ([<sup>14</sup>C]LFC), L-1-dipalmitoil-[2-palmitoil-1-<sup>14</sup>C] fosfatidilcolina [<sup>14</sup>C]FC(1); de New England Nuclear., L-1-dipalmitoil-[2-palmitoil-1-<sup>14</sup>C]-fosfatidilcolina [<sup>14</sup>C]FC(2), [5-<sup>3</sup>H]-UTP; de ICN Radiochemicals. Na <sup>125</sup>I en NaOH (5.2 mCi/ml); de Pharmacia Fine Chemicals, Seladex G 100, resina PBE 94, poliamortiguador 9-6, poliamortiguador 6-4, sefarosa-4B activada con CNBr.

### 2. Material biológico.

#### 2.A. Cepa HK9:NIH de *Entamoeba histolytica* (Diamond, 1968).

Proviene del cepario del Dr. Salvador Saíd Fernández, de la División de Biología Celular de la Unidad de Investigaciones Biomédicas del Noreste, I.M.S.S. En nuestro laboratorio se ha cultivado por 5 años en medio PEHPS (54).

#### 2.B. Línea celular CHO.

La línea celular de ovario de hamster chino CHO-K1 (auxótrofas de prolina), nos fué donada del laboratorio del Dr. Salvador Saíd Fernández de la División de Biología Celular de la Unidad de Investigaciones Biomédicas del Noreste, I.M.S.S. Esta cepa proviene de la clona (BC1), obtenida por Herminia Martínez Rodríguez, a partir de la cepa CCL61 de la American Type Culture Collection, (Maryland EUA). La cepa original fué aislada por Puck y col, en 1958 (55). Es muy sensible a la actividad citolítica de extractos amibianos (42,43,48,56).

### 3. Preparación de sueros.

#### 3.A. Suero bovino y suero fetal bovino estéril.

Descongelamos los suero en baño de agua a 37 °C y los descomplementamos a 56 °C por 30 minutos, agitándolos suavemente cada 5 minutos. Transferimos asépticamente 10 ml de cada uno de los sueros a tubos estériles de borosilicato con tapón de rosca y los incubamos a 37°C por 5 días para comprobar su esterilidad y los almacenamos a -20 °C.

### 4. Preparación de los medios de cultivo.

#### 4.A. Medio basal (PEHP) (54).

Peptona de caseína 5 g; D-glucosa 3 g; L-cisteína 0.5 g; ácido ascórbico 0.1 g; NaCl 0.2 g; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.3 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5 g; extracto de hígado y páncreas 125 ml.

Mazclamos y disolvimos los componentes en 500 ml de agua bidestilada estéril. Ajustamos el pH a 7.0 con NaOH 10 N y

colocamos 10 ml de medio en tubos para cultivo con tapón de rosca, ó bien 750 ml en botellas de borosilicato con tapón de rosca. Esterilizamos el medio en autoclave por 15 minutos, con los tapones flojos, los que apretamos después estando los recipientes todavía calientes. Almacenamos el medio a temperatura ambiente.

#### 4.B. Medio completo (PEHPS) (54).

Añadimos asépticamente 9 % de suero bovino al medio basal PEHPS, inmediatamente antes de sembrar los trofozoítos.

#### 4.C. Preparación del medio esencial mínimo de Eagle (MEM).

La composición del MEM corresponde a la descrita originalmente por Eagle (1959) a excepción de: a) cloruro de calcio que fué reducido a la mitad, b) de la D-glucosa, cuya concentración fué equivalente al doble de la original y c) cloruro de fierro, que se eliminó del medio.

#### 4.D. Medio completo (MEM).

Añadimos asépticamente 7 % de suero fetal bovino al medio basal MEM inmediatamente antes de sembrar las células .

### 5. Composición y preparación de las soluciones.

Por comodidad preparamos soluciones concentradas, indicadas con un número seguido de una X, que representan su concentración respecto a la solución de trabajo (ó solución 1 X).

#### 5.A. Tris-HCl 10 X.

Tris-HCl 3.9 g.

Disolvimos el componente en 15 ml de agua bidestilada estéril, ajustamos el pH a 8.0 con NaOH 10 N. Aforamos a 25 ml con agua bidestilada y almacenamos a -70 °C, dividida en porciones de 1 ml.

#### 5.B. Tris-HCl 1 X.

Preparamos la solución (1 X) diluyendo 1 ml de la solución 10 X con 9.0 ml de agua bidestilada estéril y la almacenamos en alícuotas de 1 ml a -70 °C.

#### 5.C. Solución amortiguadora de fosfatos (PBS).

NaCl 6.5 g; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.8 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5 g.

Disolvimos los componentes en 100 ml de agua bidestilada estéril ajustamos el pH a 7.5 con NaOH 1N, esterilizamos la solución en autoclave y la almacenamos a 4 °C, dividida en porciones de 10 ml.

#### 5.D. Solución de Hanks (SSB) 10 X.

CaCl<sub>2</sub> 0.175 g; Glucosa 1.0 g; NaCl 7.2 g; KCl 0.4 g; MgSO<sub>4</sub> 0.2 g; Trizma base 0.12 g.



Mezclamos y disolvimos todos los componentes con agua bidestilada estéril ajustamos el pH a 7.0 con NaOH 10 N. Aforamos la solución a 100 ml y la distribuimos en volúmenes de 10 ml en tubos o botellas de borosilicato con tapón de rosca, esterilizamos por filtración y la almacenamos a -20 °C.

5.E. Solución SSB 1 X.

Preparamos la solución de trabajo diluyendo 10 ml de la solución 10 X con 90 ml de agua bidestilada estéril. Nos cercioramos con un osmómetro que la osmolaridad final fuera de 290 mOsm/Kg. La esterilizamos por filtración y la usamos inmediatamente o la almacenamos a -20 °C, en alícuotas de 10 ml.

5.F. Solución de CaCl<sub>2</sub> 10 X.

CaCl<sub>2</sub> 36.8 mg.

Disolvimos el componente en 25 ml de agua bidestilada y la almacenamos en alícuotas de 1 ml a -70 °C.

5.G. Tritón X-100 10 X.

Tritón X-100 1 ml.

Disolvimos el componente en 25 ml de agua bidestilada y la almacenamos en alícuotas de 1 ml a -70 °C.

5.H. Solución de cloroformo-metanol (2:1).

Cloroformo 300 ml, metanol 150 ml. Mezclamos los componentes y los almacenamos a temperatura ambiente, en frascos de tapón de rosca.

5.I. Solución de Alsever (10 X).

Citrato trisódico 5.37 g; ácido cítrico-H<sub>2</sub>O 1.87 g; glucosa 5.36 g; NaCl 5.27 g.

Mezclamos y disolvimos los componentes con agua bidestilada, aforamos la solución a 100 ml y la esterilizamos por filtración, a través de un filtro de 25 mm de diámetro, con poros de 0.22 μm (Millipore), y llenamos los tubos para cultivo con 10 ml de esta solución. Tapamos bien los tubos y los almacenamos a -20 °C.

5.J. Solución de Alsever (1 X).

Preparamos la solución de trabajo descongelando el contenido de un tubo de solución 10 X y lo diluimos con 90 ml de agua bidestilada estéril. Usamos inmediatamente esta solución isotónica (290 mOsm/kg).

5.K. Mezcla de ensayo para la actividad fosfolipásica 2 X (26, 53).

Mezclamos los siguientes componentes: 200 μl de Tris-HCl (10 X); 200 μl de CaCl<sub>2</sub> (10 X); 200 μl de Tritón X-100 (10 X); 2 μl de fosfatidilcolina de yema de huevo (1 mg/10 ml); 200 μl de fosfatidilcolina marcada con radiactividad en diferentes partes de la molécula. Después se aforó a 1 ml con agua bidestilada y se sonicó (sonicador Soniprep 150 MSE) a 40 Watts por 60 seg.

Usamos inmediatamente la mezcla de ensayo ó la almacenamos a -70 °C.

**5.L. Mezcla para parar la reacción de actividad fosfolipásica en el radioensayo (26, 53).**

Mezclamos 18 mg de un digerido de fosfolípidos (3 mg de ovolecitina + 300 mU de fosfolipasa A<sub>2</sub> de veneno de abeja incubadas por 30 min a 37 °C; ajustamos la concentración de los productos de hidrólisis y del sustrato no hidrolizado a 10 mg/ml (por peso seco) con 1 mg de fosfatidilcolina de yema de huevo y 1 mg de lisofosfatidilcolina (Sigma). Evaporamos a sequedad con una corriente de nitrógeno y redisolvimos el material seco en 1 ml de TCA en butanol al 5 %, lo almacenamos en alícuotas de 1 ml a -20 °C.

**5.M. Marcaje con Iodogén.**

Disolvimos 1 mg de iodogén en 25 ml de cloroformo, tomamos 25 µl de esta solución y los evaporamos con N<sub>2</sub> a temperatura ambiente en tubos de polipropileno de 12 X 75 mm y los usamos inmediatamente o los guardamos a 4 °C por no más de 6 meses.

**5.N. Tripsina al 0.25 %.**

Disolvimos 10 ml de tripsina al 2.5 %, en un vaso de precipitado con 0.6 ml de rojo de fenol al 1 % y 85 ml de SSB. Le ajustamos el pH a 7.4-7.5 y la aforamos a 100 ml con SSB. Enseguida esterilizamos la solución por filtración y la almacenamos a -20 °C en porciones de 5 ml. Incubamos un tubo de cada lote por tres días a 37 °C para cerciorarnos de su esterilidad.

**5.O. Sal tetrasódica de uridina (5'-3-PO<sub>4</sub> uridina; [<sup>3</sup>H]-UTP).**

[<sup>3</sup>H]-UTP (1 µCi/ml).

Tomamos en condiciones asépticas 10 µl de [<sup>3</sup>H]-UTP (2.61 Ci/mole) con una jeringa de tuberculina. Depositamos la solución en tubos estériles para cultivo, de polipropileno (Falcon). Mezclamos ésta con 9.90 ml de MEM y almacenamos la solución a -20 °C.

**6. Tratamiento del material para cultivo.**

El tratamiento del material y los métodos de cultivo, de resiembra y de cosecha en tubos de 16 X 125 mm fueron los descritos por López Revilla y Rodríguez Báez (57).

El medio PEHPS y las técnicas de cultivo amibiano en suspensión fueron los desarrollados por el grupo del Dr. Salvador Saíd Fernández, en la División de Biología Celular, UNIBIN-I.M.S.S (54).

**6.A. Lavado y esterilización.**

El lavado de tubos, botellas y frascos para cultivo en suspensión comprendió los siguientes pasos: 1) enjuague por lo menos 12 hrs en hipoclorito de sodio diluído al 1 % en agua de la llave; 2) tallado con escobillón; 3) cuatro enjuagues con agua de la llave; 4) enjuague por 12 hrs en ácido clorhídrico al 1 %; 5) siete enjuagues con agua de la llave; 6) tres enjuagues con agua destilada y 7) secado a temperatura ambiente con el material colocado boca abajo en canastillas metálicas y horneadas a

200 °C por 3 hrs.

Las pipetas serológicas (Bellco Glass Inc. N.Y. USA) y las pipetas Pasteur se lavaron mediante: 1) remojo en Extran al 1 % en pipeteros de polipropileno (Nalgene Labware Division, N.Y. USA) por 12 hrs; 2) enjuague en un sifón (Nalgene) para lavar pipetas por lo menos 2 hrs; 3) remojo en mezcla crómica por lo menos 12 hrs; 4) enjuague en sifón por 1 hr y 5) dos enjuagues por inmersión en pipeteros con agua destilada. Las pipetas se esterilizaron envueltas en papel aluminio en una autoclave por 15 min a 15 lb de presión y secadas a 100 °C.

Los tapones de tubos y botellas se remojaron en Extran al 1 % por 12 hrs, y después se lavaron como los tubos y botellas. Los bulbos para pipetas serológicas cortas y para pipetas Pasteur se esterilizaron en autoclave y se guardaron en frascos de vidrio de boca ancha y tapón de rosca.

## 7. Tratamiento del material para cromatografía.

### 7.A. Lavado y secado.

El lavado del material de vidrio para cromatografía comprendió los siguientes pasos: 1) enjuague con jabón comercial en polvo; 2) tallado con escobillón; 3) cuatro enjuagues con agua de la llave; 4) tres enjuagues con agua destilada; 5) secado a temperatura ambiente, 6) enjuague por 12 hrs con mezcla crómica; 7) siete enjuagues con agua de la llave; 8) tres enjuagues con agua destilada; 9) tres enjuagues con cloroformo-metanol (2:1); 10) secado a un horno a 80 °C por 3 hrs; y 11) los bulbos y tapones se dejaron secar a temperatura ambiente y se almacenaron en recipientes libres de lípidos y herméticamente cerrados.

## 8. Cultivos amibianos axénicos.

### 8.A. Resiembra y cosecha.

Incubamos la cepa HK9:NIH de *Entamoeba histolytica* a 37 °C en una incubadora (National Weinicke Co. modelo 6200 USA). Antes de cada resiembra observamos los cultivos al microscopio invertido (Americal Optical, modelo 1820) para comprobar el buen aspecto morfológico y la movilidad de las amibas. Colocamos el mejor tubo de cultivo de cada cepa en agua-hielo por 10 min, determinamos la concentración amibiana, con un hemocitómetro e inoculamos  $1 \times 10^3$  trofozoítos por ml a cada uno de otros tres tubos con medio PEHPS fresco. Conservamos los cultivos de la penúltima resiembra hasta comprobar el crecimiento de las amibas y la ausencia de contaminación en los cultivos recién sembrados.

### 8.B. Cultivos masivos.

Obtuvimos los cultivos masivos de *E. histolytica* utilizando frascos para cultivo en suspensión ("spinners") de 500 ml y 1.5 litros de capacidad. Inoculamos  $3 \times 10^3$  amibas por ml de medio PEPHS y 35 ml ó 70 ml de suero bovino descomplementado, adicionado con la mezcla vitamínica 107. Los incubamos por 2 días a 36 °C, manteniendo los cultivos estáticos para después pasar a incubarlos en agitación con un agitador magnético, para mantener en suspensión los trofozoítos durante 3-4 días.

Cosechamos las amibas tanto de los tubos o frascos en suspensión mediante enfriamiento de los cultivos en agua-hielo por 10 min, lo centrifugamos a 600 X g en una centrífuga Beckman, modelo TJ-6, por 15 min, a 4 °C y las lavamos dos veces con dos volúmenes de SSB ó Tris-HCl.

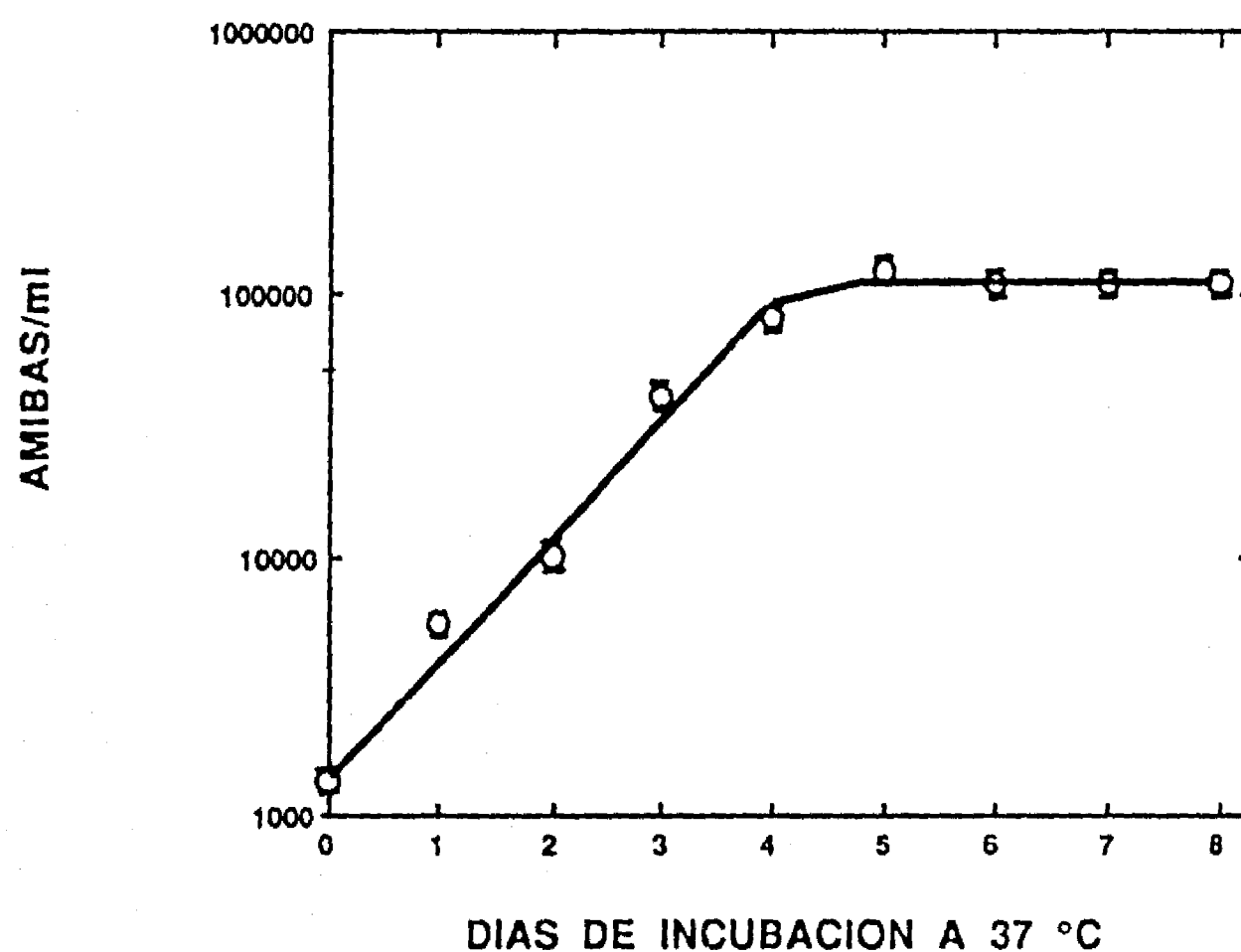
La Figura 2 corresponde a una curva típica de crecimiento de la cepa HK9:NIH de *E. histolytica*.

La función que encontramos en la fase exponencial de crecimiento de la cepa HK9 correspondió a la siguiente ecuación:

$$\text{Número de amibas / ml} = e^{0.03739 (\text{días de incubación})} + 7.2838$$

Correlación con la recta  $r^2 = 0.9937$ ;  $P < 0.001$

A partir de ésta ecuación determinamos un tiempo de duplicación de 18.5 hrs y definimos tanto el inóculo como los días de cultivo necesarios para obtener cultivos creciendo en la fase exponencial y en buenas condiciones fisiológicas.



**Figura 2.** Relación temporal del crecimiento de la cepa HK9. Inoculamos por triplicado 1,000 amibas por mililitro en tubos con 5 ml de PEHPS-1. Después de diferentes tiempos de incubación a 37 °C determinamos la densidad de los cultivos con un hemacitómetro. Cada punto corresponde a tres determinaciones independientes. El coeficiente de correlación con la rescta ( $r^2$ )=0.9927;  $P < 0.001$

#### 9. Cultivo de células de la línea CHO.

La resiembra, mantenimiento y manejo radioactivo de estas células fué el descrito por Javier Vargas y col. (56). El cálculo de la citólisis porcentual causada por un agente citolítico dado presupone la aplicación de la siguiente ecuación:

$$\%C = \frac{LEx - LE}{LM - LE} \times 100$$

Donde el % C corresponde al porcentaje de citólisis; LE a la liberación basal, detectada en cultivos testigos no tratados; LM a la liberación máxima, equivalente a la captación total de [ $^3\text{H}$ ]-UTP, determinada después de lisar los cultivos celulares con Tritón X-100 al 0.5 % en SSB; y finalmente LEx a la liberación experimental producida por el efecto de las citolisinas sobre las células premarcadas. En cada experimento de citólisis nos cercioramos que la liberación basal no excediera del 30 % de la radiactividad incorporada para que la ecuación fuera aplicada.

#### 10. Obtención de los extractos totales de trofozoítos y de la fracción subcelular P30.

En la Figura 3, esquematizamos el método de sedimentación fraccionada que utilizamos para obtener los extractos amibianos, de acuerdo con el método descrito por Saiz-Fernández y López-Revilla (50), con la adición de un inhibidor de tiol-proteasas de efecto reversible como es el p-cloromercuribenzoato sódico excepto cuando se indique lo contrario.

##### 10.A. Extractos totales.

Resuspendimos los trofozoítos lavados con dos volúmenes de SSB adicionado con 0.1 mM del inhibidor de proteasas, agitándolos suavemente con una pipeta Pasteur y los homogenizamos con 100 golpes de un homogenizador tipo Elvehjem-Potter de borosilicato, con émbolo de teflón (Bellco, Glass Inc. N.Y. USA), con un clearance de 0.1 a 0.15 mm y activado con un motor eléctrico a 1,000 rpm. Después de este tratamiento no observamos trofozoítos enteros bajo el microscopio.

##### 10.B. Obtención de P30.

Centrifugamos el extracto total a 135 X g por 15 min y obtuvimos un sedimento, la fracción nuclear (N) y el sobrenadante correspondiente, que centrifugamos a 30,000 X g por 30 min y el sedimento corresponde a la fracción P30 (50), la cual resuspendimos con un volumen de SSB para ensayos de hemólisis y Tris-HCl para radioensayos, adicionados con 0.1 mM del inhibidor de proteasas, o sin él (sólo cuando así se indique). Durante éste proceso, manipulamos todas las muestras a 4 °C.

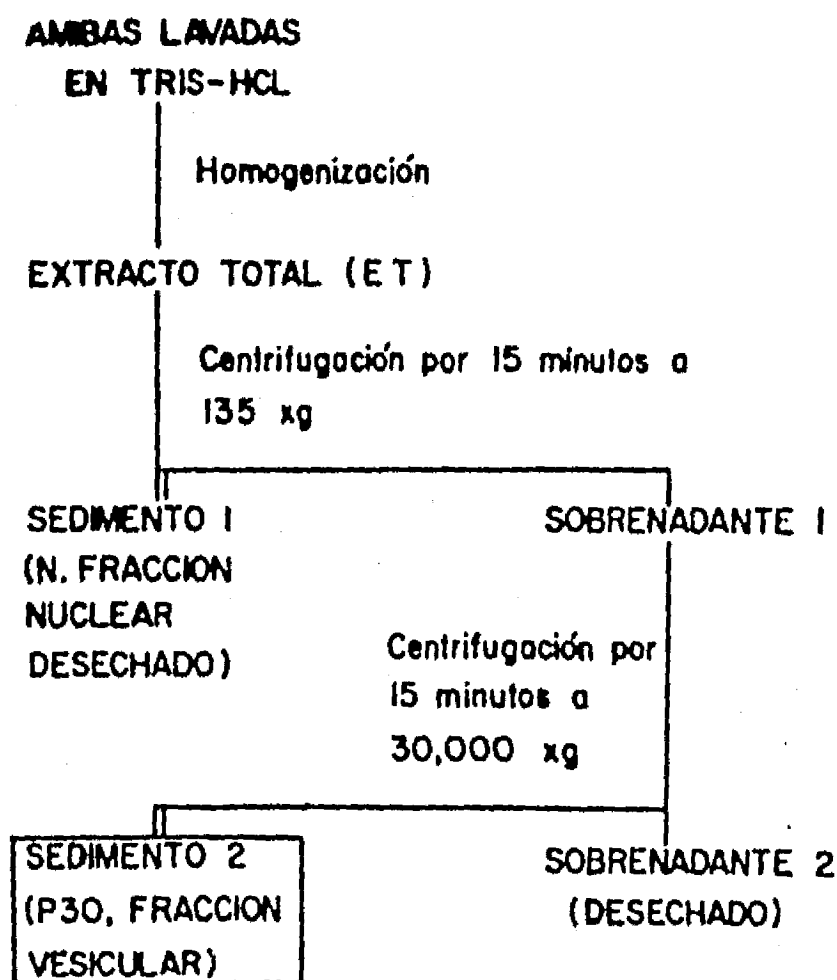


FIGURA 3. Obtención de las fracciones subcelulares amibianas

## 11. Cuantificación de proteínas.

Determinamos la concentración de proteínas en muestras biológicas particuladas mediante el método de Lowry y col (58), y las concentraciones de las fracciones cromatográficas fueron determinadas espectrofotométricamente, suponiendo que  $A_{280} = 1 \text{ mg/ml}$  en celdas de cuarzo de 1 cm de trayectoria óptica.

## 12. Colección y almacenamiento de eritrocitos humanos.

### 12.A. Colección de sangre.

Colectamos la sangre humana por punción intravenosa (con agujas calibre 20) y la diluímos con un volumen igual de solución de Alsever. Inmediatamente después del sangrado, obtuvimos los eritrocitos con tres lavados de la sangre por centrifugación (15 min a 3,000 rpm y 4 °C); los dos primeros lavados se hicieron con PBS y el tercero con SSB. Después de cada centrifugación eliminamos por aspiración el sobrenadante y el sedimento blanco (leucocitos), depositados sobre la pastilla de eritrocitos. Dividimos los paquetes celulares en alícuotas de 1 ml y los almacenamos a 4 °C hasta una semana (50).

## 13. Determinación de la actividad hemolítica.

Determinamos la actividad hemolítica mediante la liberación porcentual de hemoglobina. En tubos de polipropileno (Eppendorf de 1.5 ml) con 25  $\mu\text{l}$  de eritrocitos humanos al 1 %, ajustamos los volúmenes de las mezclas de ensayo a 50  $\mu\text{l}$  con SSB (control negativo), veneno de *C. basiliscus* o la fracción P30 y las incubamos a 37 °C en un baño de agua por tiempos variables. Al cabo de los cuales añadimos 1 ml de PBS, centrifugamos los tubos por 9 min, a 600 X g, en una centrífuga Beckman, modelo TJ-6 y medimos la absorbancia de los sobrenadantes a 415 nm (50).

### 13.A Micrométodo.

Determinamos la actividad hemolítica de la fosfolipasa II.2 ó la fosfolipasa purificada de *C. basiliscus* mediante la liberación porcentual de hemoglobina. En tubos eppendorf de 0.5 ml con 5  $\mu\text{l}$  de eritrocitos humanos al 5 %, ajustamos los volúmenes de las mezclas de ensayo a 10  $\mu\text{l}$  con la fosfolipasa II.2, fosfolipasa de *C. basiliscus* ó con SSB y las incubamos a 37 °C en un baño de agua por tiempos variables, añadimos 0.5 ml de PBS y procedimos a tratar las muestras como se indica arriba.

## 14. Cuantificación de la liberación basal de hemoglobina por la presencia del Inhibidor de Rosenthal.

Determinamos la liberación basal de hemoglobina a tiempos variables entre 0 y 16 hrs de incubación ó a 7 hrs de incubación con SSB o con concentraciones crecientes del IR a 37 °C. Terminado el tiempo de incubación procedimos de la misma manera antes descrita para su cuantificación (ver sección 8 y 8.A).

## 15. Determinación de la actividad hemolítica del veneno de *C. basiliscus* de la fracción subcelular P30 y de la fosfolipasa II.2 de la fracción II.2.

Determinamos la actividad hemolítica tanto del veneno de *C. basiliscus* así como de la fracción subcelular P30 (fracción con mayor actividad hemolítica (84 %) y de la fosfolipasa II.2 (con actividad fosfolipásica del tipo  $A_2$  ambiana), mediante la liberación porcentual de hemoglobina.

La absorbancia de los lisados de eritrocitos humanos es máxima a 415 nm. Calculamos la liberación porcentual de hemoglobina del veneno total de *C. basiliscus* (preincubado con 50 µg de fosfatidilcolina por 10 min), de la fracción P30, o de la fosfolipasa II.2 (micrométodo), dividiendo el promedio de las absorbancias a 415 nm, contra la liberación máxima de hemoglobina (obtenida por choque hipotónico de los eritrocitos con agua destilada) utilizada en las muestras multiplicado por 100.

Graficamos el porcentaje de hemoglobina liberada contra la concentración del veneno o de los extractos y obtuvimos curvas sigmoides en cuyas regiones lineales determinamos por interpolación la dosis hemolítica media (DH<sub>50</sub>).

#### 16. Análisis de la actividad hemolítica de la fracción P30, *C. basiliscus* y de la fosfolipasa II.2, sometidas al IR ó a seroalbumina bovina.

Cuantificamos la actividad hemolítica de la fracción P30, y la fosfolipasa pura de *C. basiliscus* y de la fosfolipasa II.2, (con actividad fosfolipásica del tipo A<sub>2</sub>) mediante la preincubación de estas fracciones con diferentes concentraciones del IR ó de seroalbumina bovina deslipidizada con cloroformo. La cuantificación de las actividades hemolíticas se realizaron como se describe anteriormente.

#### 17. Método para determinar la actividad fosfolipásica.

Determinamos la actividad fosfolipásica de tipo A, A<sub>1</sub> y/o A<sub>2</sub>, basándonos en el método descrito por Opperdoes y col. (26), con las siguientes modificaciones: determinamos los productos de hidrólisis (ácidos grasos liberados (AGL) y/o lisofosfatidilcolina (LFC)) de los siguientes substratos; L-1,2-dipalmitoil-[2-palmitoil-<sup>14</sup>C]fosfatidilcolina ([<sup>14</sup>C]FC(2)) para determinar fosfolipasas del tipo A, y L-1-dipalmitoil-[palmitoil-1-<sup>14</sup>C]-fosfatidilcolina ([<sup>14</sup>C]FC(1)) para fosfolipasas del tipo A<sub>1</sub> y/o A<sub>2</sub>. Este último substrato está marcado en el carbono 1 de ácido palmítico esterificado en la posición 2 del glicerol, considerando que si la radioactividad se localizaba en las manchas cromatográfica correspondiente a [<sup>14</sup>C]LFC, pero no en la de [<sup>14</sup>C]AGL, la enzima sería del tipo A<sub>1</sub>. En el caso contrario estas correspondería a una fosfolipasa del tipo A<sub>2</sub>. Los lípidos marcados fueron diluidos con fosfatidilcolina (FC) de yema de huevo a una concentración específica de 1800 µCi/mole y solubilizadas en presencia de 0.4 % de Tritón X-100. Estas mezclas fueron diluidas 1:1 con las muestras de ensayo (veneno total de *Crotalus basiliscus*, P30 ó fracciones cromatográficas). El ensayo final (0.02 ml) contiene: 100 mM de Tris-HCl, pH 8.0, 0.138 mM de FC, 0.2 % de Tritón X-100 y la muestra. Después de tiempos variables de incubación ó concentraciones diferentes de proteínas (según el ensayo), la reacción fué parada con 25 µl de una mezcla de FC (0.75 mg/ml), AGL (1 mg/ml) y LFC (1 mg/ml) en TCA-butanol (5 %), agitamos los tubos en un vórtex. Determinamos la radioactividad presente en las manchas correspondientes a FC, LFC y AGL, separadas mediante cromatografía en placa fina (59). Aplicamos 25 µl de cada muestra en placas cromatográficas de sílica gel (Whatman de borosilicato, 10X10X1 cm), con una mezcla de disolventes para lípidos polares (cloroformo-metanol-ácido acético-agua, 170:40:16:8). Después colocamos las placas en una cámara saturada con vapor de yodo, con lo cual las manchas lipídicas se revelaron como puntos amarillos o cálidos sobre el fondo blanco (59). Finalmente mezclamos cada mancha lipídica con 5 ml de mezcla para centelleo líquido (2-5 difeniloxazole PPO, 6 % en tolueno) en viales de borosilicato de 20 ml de capacidad. Hicimos la cuantificación en un espectrofotómetro de centelleo líquido (Beckman Instrument Inc. modelo LS 9,800 Irvine, California. EUA) a una eficiencia del 88 %.

#### 18. Determinación de actividad de lisofosfolipasa.

Determinamos la actividad de lisofosfolipasa de las fracciones cromatográficas en mezclas de ensayo que contenían [<sup>14</sup>C]LFC como substrato. Las condiciones de incubación y análisis fueron las mismas que las que utilizamos para determinar la

actividad fosfolipásica (ver inciso 12).

## 19. Deslipidización y solubilización de la fracción P30.

### 19.A. Deslipidización.

En tubos Eppendorf de 1.5 ml colocamos 120  $\mu$ l de P30 (525  $\mu$ g de proteína total) en cada tubo, y 1 ml de cada uno de los siguientes disolventes: a) acetona, b) cloroformo, c) etanol, d) tolueno, e) dioxano, f) tetracloruro de carbono y g) éter etílico. Agitamos cada una de las muestras en un vórtex, por 5 min y las centrifugamos a 30,000 X g por 5 min a 4 °C, en una microcentrífuga (Beckman, modelo 5414). Con ello las mezclas se separaron en una fase acuosa y una fase orgánica; sólo en las muestras con éter apareció una interfase rica en proteínas. Los sobrenadantes de cada muestra los secamos con N<sub>2</sub> y tanto estos como los sedimentos y la interfase proteica los ajustamos a un volumen de 35  $\mu$ l con SSB adicionado con 0.1 mM del inhibidor de tiol-proteasas, excepto cuando se indique lo contrario. Después determinamos su actividad fosfolipásica, utilizando como sustrato [<sup>14</sup>C]FC(2), como se describe en el inciso 12.

### 19.B. Solubilización de la interfase, rica en proteínas (fracción con mayor actividad fosfolipásica una vez deslipidizado la fracción P30).

Utilizamos la interfase proteica de las muestras de P30 tratadas con éter, añadimos a cada tubo 100  $\mu$ l de cada uno de los siguientes detergentes a una concentración de 0.5 %: a) deoxicolato, b) dodecil-sulfato de sodio, c) lisofosfatidilcolina, d) NP-40, e) CHAPS, f) Tritón X-100, o g) KCl 1 M. Cada tubo lo agitamos en un vórtex por 5 min y los dejamos reposar por 30 min a 4 °C. Centrifugamos los tubos a 30,000 X g por 5 min y obtuvimos un sobrenadante y un precipitado. A los cuales se les determinó su actividad fosfolipásica, utilizando como sustrato [<sup>14</sup>C]FC(2), como se describe en el inciso 12.

### 19.C. Solubilización de la interfase proteica con KCl y detergentes.

Para extraer la mayor actividad fosfolipásica posible de los extractos deslipidizados de P30. Elegimos el éter etílico para obtenerlos, después añadimos 100  $\mu$ l de una mezcla de KCl 1 M con deoxicolato 0.5 %, NP-40 0.5 % y Tritón X-100 al 0.5%. Las muestras se homogenizaron con 50 golpes de un homogenizador del tipo Elvehjem-Potter, activado con la mano, se agitaron con un vórtex por 5 min y se dejaron reposar por 30 min, a 4 °C. Al término de este tiempo se centrifugaron a 30,000 X g por 5 min. Se obtuvo una fracción soluble y una insoluble. Durante todo el proceso de extracción manipulamos las muestras a 4 °C. Cuantificamos la actividad fosfolipásica utilizando [<sup>14</sup>C]FC(2) como sustrato, como se describe en el inciso 12.

## 20. Cromatofoco.

Para separar las diferentes proteínas contenidas en los extracto solubles de KCl ó KCl-detergentes (entre 14 y 18 mg de proteínas totales), utilizamos una columna de borosilicato de 7.0 X 0.9 cm, donde colocamos 5.4 ml de resina PBE 94, la cual se preparó siguiendo las instrucciones del fabricante (Pharmacia Fine Chemicals). Lavamos la columna y la equilibramos con 25 mM de Tris-HCl pH 9.4, Tritón X-100 al 0.05 % y 0.1 mM del inhibidor de tiol-proteasas, excepto cuando se indique lo contrario. Las soluciones amortiguadoras de pH, utilizadas para la elución de las proteínas se prepararon de la siguiente manera: a) amortiguador A, mezclamos y disolvimos 7 ml del poliamortiguador 9-6 con 60 ml de agua bidestilada, 35  $\mu$ l de Tritón X-100 y 0.1 mM del inhibidor p-cloromercuribenzoato sal sódica (estos dos últimos estuvieron presentes ó ausentes, según el caso); ajustamos el pH a 7.0 y aforamos la solución a 70 ml; b) amortiguador B, mezclamos y disolvimos 10 ml de poliamortiguador 7-4 con 60 ml de agua bidestilada, 40  $\mu$ l de Tritón X-100 y 0.1 mM del inhibidor de tiol-proteasas (estos dos últimos estuvieron presentes ó ausentes, según el caso); ajustamos el pH a 4.0 y aforamos la solución a 80 ml con agua



bidestilada y c) amortiguador C, disolvimos 1.46 g de NaCl en 50 ml de agua bidestilada y 25  $\mu$ l de Tritón X-100 (ó sin el según el caso).

#### 21. Preparación de la columna de afinidad (60).

Lavamos 2.5 g de sefarosa 4B, activada con bromuro de cianógeno, con 200 ml de  $\text{NaHCO}_3$  0.1 M, pH 9.0. Mezclamos la resina con 15 ml del mismo amortiguador y ácido 6-aminohexanóico 1 mM y se agitó suavemente por 24 hrs a temperatura ambiente. Después, lavamos la resina con 100 ml de  $\text{NaHCO}_3$  pH 9.0, 100 ml de agua bidestilada y 200 ml de dioxano. Enseguida mezclamos la carboxihexil-sefarosa 4-B con 10 ml de una mezcla de dioxano/cloroformo (1:1 v/v), la cual contenía 1,3 dicitohexil-carbodiimida (1 mmol), inhibidor de Rosenthal (0.4 mmol) y 4-dimetilaminopiridina (1 mmol), agitamos suavemente por 24 hrs a temperatura ambiente. Lavamos la resina antes de empacarla en la columna eluyendo sucesivamente con: a) 100 ml de dioxano/cloroformo (1:1 v/v), b) 100 ml de cloroformo, c) 100 ml de 2-propanol, d) 100 ml de dioxano, y e) 200 ml de agua bidestilada. Almacenamos la resina en agua-metanol al 30 % hasta su uso.

#### 22. Cuantificación de la actividad fosfolipásica de P30 y de las fracciones separadas mediante cromatográfica de electroenfoque

A tiempos variables de incubación a 37 °C, determinamos la radiactividad en el material eluido del polvo raspado de las cromatoplasmas. Dichas manchas correspondían a los productos de hidrólisis ( $[^{14}\text{C}]\text{LFC}$ ,  $[^{14}\text{C}]\text{AGL}$  y RI) y del sustrato no hidrolizado  $[^{14}\text{C}]\text{FC}(1),(2)$  ó  $[^{14}\text{C}]\text{LFC}$ , después de parar la reacción. Los demás detalles se dan en el inciso 12.

#### 23. Determinación de la actividad fosfolipásica de la fracción II.2 en mezclas de ensayo con pH variables, Calcio o EDTA.

##### 23.A. Determinación del efecto del pH sobre las actividades de fosfolipasa en las fracciones cromatográficas.

Para la actividad enzimática de las distintas fracciones a varios pHs, se emplearon 10  $\mu$ l de cada una de ellas y  $[^{14}\text{C}]\text{FC}(2)$  como sustrato. Los pHs 2,4 y 6 se ajustaron con ácido acético y 8-10 con Tris-HCl 2 M. La concentración de NaCl de todas las mezclas de reacción se ajustó a 200 mM.

##### 23.B. Determinación de la dependencia de $\text{Ca}^{++}$ de las actividades fosfolipásicas.

Incubamos por 2.5 hrs las mezclas de ensayo adicionadas con  $[^{14}\text{C}]\text{FC}(2)$  y 10  $\mu$ l de las fracciones cromatográficas obtenidas durante isoelectroenfoque y 2 mM de  $\text{CaCl}_2$ .

##### 23.C. Determinación del efecto de EDTA sobre las actividades fosfolipásicas.

Añadimos a las mezclas de ensayo  $[^{14}\text{C}]\text{FC}(2)$  y 10  $\mu$ l de las fracciones cromatográficas obtenidas durante el isoelectroenfoque y EDTA 2 mM y las incubamos bajo las mismas condiciones que las usadas para analizar el efecto de calcio.

En todos los análisis paramos la reacción, separamos los lípidos y analizamos los productos de hidólisis como explicamos en el inciso 12.

#### 24. Radioyodación de la fosfolipasa II.2.

A tubos con iodogén les agregamos 10  $\mu$ l de SSB (con 0.1% de SDS) y 200  $\mu$ Ci de [ $^{125}$ I] NaI (2  $\mu$ l, 100  $\mu$ Ci/ $\mu$ l) y 10  $\mu$ l (10  $\mu$ g) de fosfolipasa II.2 solubilizada con KCl 1 M y purificada por la columna de afinidad-IR. Utilizamos también BSA como control. La reacción la incubamos por 10 min a temperatura ambiente. Después de este tiempo paramos la reacción con 100  $\mu$ l de SSB (con 0.1% de SDS) y 40  $\mu$ l de seroalbumina bovina (BSA) (1 mg/ml). Los 162  $\mu$ l fueron pasados por una columna de 1 ml de filtración en gel G-25 para eliminar el yodo libre; utilizamos SSB con 0.1% de SDS como eluyente. Determinamos la radioactividad de las muestras con un contador de radiación gamma, Modelo 5500 (Beckman). Tomamos de cada preparación una alícuota de las fosfolipasas o de BSA con 130,000 cpm. Las proteínas yodadas se sometieron a un análisis de electroforesis en geles de poliacrilamida y SDS ó SDS- $\beta$ -mercaptoetanol, después lavamos los geles, con las siguientes soluciones: a) metanol:ácido acético:agua 50:12:38 (v/v) y b) etanol:ácido acético:agua 10:5:85 (v/v) por un tiempo de 20 y 10 min respectivamente. Después de los lavados, colocamos en un cartucho de revelado los geles y una película sensible y la dejamos toda la noche a -70 °C. Al término de este tiempo revelamos las placas de rayos X con revelador Kodak RP X-Omat, por 2 min, agua por 1 min y fijador Kodak RP X-Omat por 2 min. Lavamos las placas de rayos X con agua bidestilada y las dejamos secar a temperatura ambiente.

#### 25. Determinación del punto Isoeléctrico de la fosfolipasa II.2.

Tomamos 130,000 cpm de cada muestra yodada (una de BSA y las muestras de la fosfolipasa II.2 purificadas en experimentos diferentes) y las colocamos en un gel de poliacrilamida para isoelectroenfoque, con un gradiente de 3 a 9 de pH, las proteínas se sometieron a electroforesis en un Phast system (Pharmacia Lab. Separation. Division. S-75182 Uppsala, Suecia) con un voltaje de 500 Vh, por 30 min. Visualizamos las proteínas radiactivas con una placa sensible a los rayos X como ya describimos en el inciso 19.

#### 26. Geles de agarosa con caseína para detectar actividad proteolítica.

Se siguió el procedimiento de Granelli-Piperno, y col. (61) con algunas modificaciones. Los geles se prepararon con las siguientes soluciones: a) agarosa 1.5 % en amortiguador de Tris-HCl 25 mM, pH 7.2; la agarosa se fundió en baño de agua, manteniéndose a 42 °C; b) solución de caseína, preparada a partir de una mezcla de leche evaporada al 8% (p/p), disuelta en agua destilada; la mezcla se calentó durante 30 min en baño de agua y fué centrifugada a 8,000 rpm durante 10 min. Al sobrenadante se le añadió azida de sodio 0.02% y se mantuvo a 4 °C hasta el momento de su uso. Antes de mezclarlo con la agarosa, se calentó y mantuvo a 42 °C. Para preparar los geles, se mezclaron 3 ml de la solución de agarosa y 1.9 ml de la solución de caseína. La actividad proteolítica se detectó siguiendo la difusión radial de la actividad (lisis de la caseína), después de aplicar, las muestras de enzima en pocillos (3 mm de diámetro) hechos en los geles de agarosa; éstas se incubaron por 18 hrs a 37 °C. Para la cuantificación de la actividad, se compararon las áreas de lisis producidas en el gel, con las generadas por un estándar bajo las mismas condiciones.

#### IV. RESULTADOS

##### 1. Efecto de inhibidores de actividad de fosfolipasa en la hemólisis producida por la fracción vesicular P30.

Hace algunos años se propuso que una o varias fosfolipasas del tipo A están relacionadas con la actividad patogénica de *E. histolytica* y que éstas podrían ser un posible factor de virulencia del parásito. Esta hipótesis se basa en que distintos inhibidores de fosfolipasas A disminuyen la acción citolítica de trofozoitos y extractos de *E. histolytica* (40,41,42,43,52,53) sobre células CHO.

Sin embargo, sólo uno de los inhibidores que se emplearon, el de Rosenthal, puede considerarse como específico para fosfolipasas. Los otros (quinacrina, fosfatidilcolina e hidrocortisona) pueden tener además otros mecanismos de acción. Por ejemplo alcalinizar lisosomas o estabilizar membranas. En uno de estos trabajos (42), el inhibidor de Rosenthal (IR) fué utilizado a una concentración única de 10 mM, la cual es demasiado alta para considerar su efecto como específico.

Por lo anterior, decidimos explorar con mayor profundidad el efecto de dos inhibidores específicos de fosfolipasas sobre la acción lítica de la fracción vesicular P30 sobre eritrocitos. Anteriormente, habíamos ya encontrado que la mayor parte de la actividad fosfolipásica (53) y de la actividad hemolítica se localizaban en dicha fracción (50).

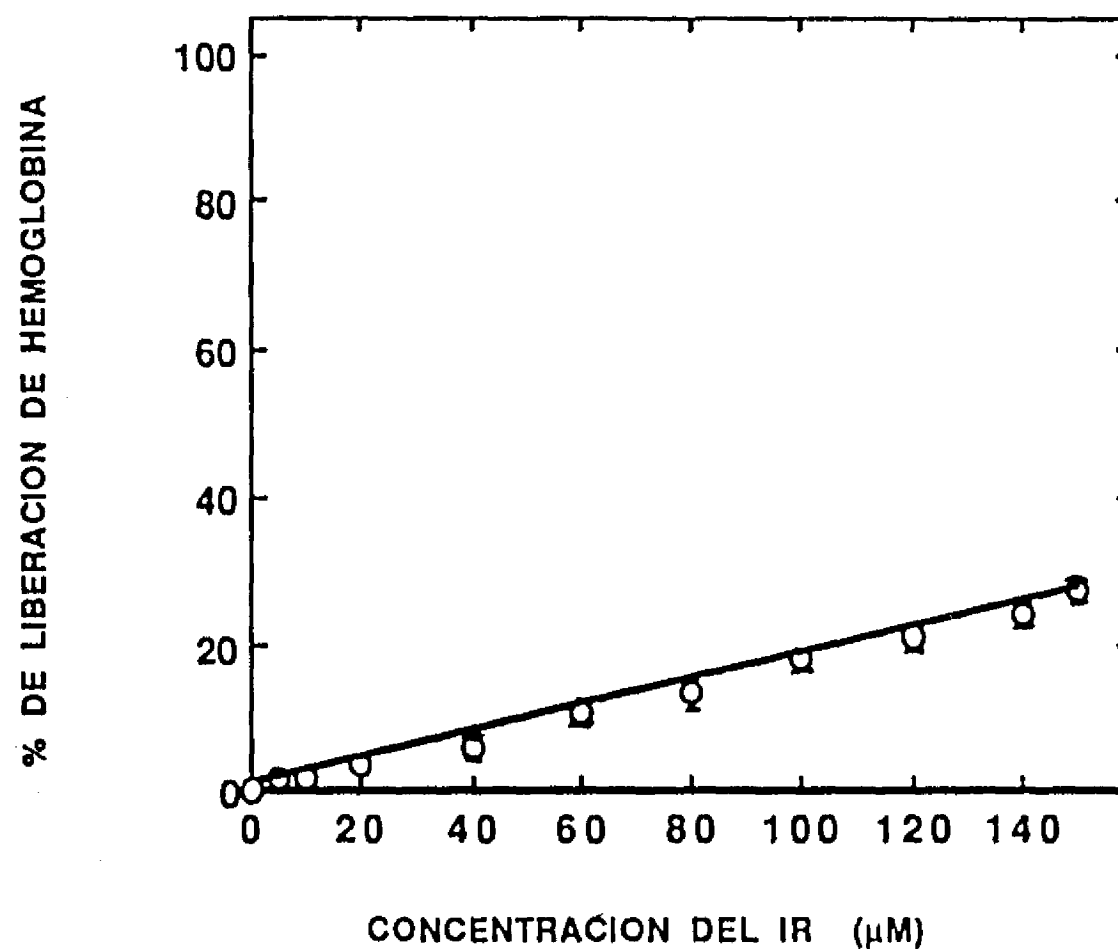
Los inhibidores que empleamos fueron dos análogos no hidrolizables de fosfatidilcolina: el IR (dimetil-di-2,3-distearoilpropil-2'-hidroxietil acetato de amonio) (49) y el PC\* (1-11-carboxiundecil-2-hexadecil-L-1-glicero-3-fosfatidilcolina) (37).

En el caso del PC\*, encontramos que la liberación basal de hemoglobina fué demasiado alta (79%) a una concentración de 56  $\mu$ M, lo que hacía muy difícil determinar cuantitativamente el efecto inhibitorio de este análogo. Intentamos disminuir este efecto acoplado etanolamina en el carboxilo 11 del 1-acilo del inhibidor. Aún cuando pudimos disminuir la liberación basal de hemoglobina con el PC\* alquilado, observamos que la inhibición de la hemólisis de P30 fué del 25 % a una concentración de 200  $\mu$ M, condición en que el inhibidor producía una liberación inespecífica de 11%. Con el IR tuvimos mejores resultados, los cuales se detallan a continuación.

##### 1.A. El IR en concentraciones micromolar produce *per se* una liberación basal de la hemoglobina en los eritrocitos humanos lo suficientemente baja para permitir ensayar su acción como inhibidor para los bioensayos.

Como paso inicial, determinamos la liberación de hemoglobina en eritrocitos humanos, incubados por tiempos variables con SSB, el cual usaríamos más adelante como diluyente de los agentes hemolíticos; la máxima liberación de hemoglobina correspondió aún después de 16 hrs de incubación, al 6 %. Determinamos después la liberación de hemoglobina inducida por el IR. Con este inhibidor encontramos que el porcentaje de hemoglobina liberada fué lineal con respecto a la concentración del inhibidor (Figura 4). Con 150  $\mu$ M la hemoglobina liberada fué del 26 % después de 7 hrs de incubación. Lapso de tiempo suficiente para observar el efecto hemolítico de las fracciones amibianas

(ver abajo).



**Figura 4.** Liberación de hemoglobina de eritrocitos humanos por efecto del IR. En tubos Eppendorf colocamos 25 µl de eritrocitos humanos al 1 % y 25 µl de SSB con cantidades variables del IR y los incubamos a 37 °C en baño de agua. Después de 7 hrs añadimos a cada mezcla 1 ml de PBS, centrifugamos los tubos a 600 X g por 9 min y 4 °C y medimos la absorbancia de los sobrenadantes para determinar el porcentaje de hemoglobina liberada con respecto a la de un número equivalente de eritrocitos lisados por choque hipotónico. Para cada punto se da el promedio y desviación estándar para tres experimentos por triplicado.

## 2. Caracterización hemolítica de la fracción P30.

### 2.A. La fracción P30 presenta actividad hemolítica dependiente del tiempo de incubación y la dosis.

La actividad hemolítica de la fracción P30 fué dependiente tanto del tiempo de incubación como la dosis. Esta fracción con respecto al tiempo, presenta la existencia de un periodo lag de aproximadamente 5 hrs en que no existe liberación de hemoglobina. La hemólisis comienza después de este tiempo y alcanza el máximo a las 7 hrs (Figura 5). En un principio la liberación es lenta y está seguida de otra fase en que es rápida. A las 6.45 hrs se logra el 50 % de liberación de hemoglobina. Para todas las determinaciones usamos 200 µg de P30, que es un valor muy cercano al máximo que permitieron las condiciones experimentales. En la curva dosis-respuesta encontramos que la liberación de hemoglobina se incrementa proporcionalmente con concentraciones crecientes de la fracción P30 (Figura 6). La  $DH_{50}$  correspondió a 110 µg.

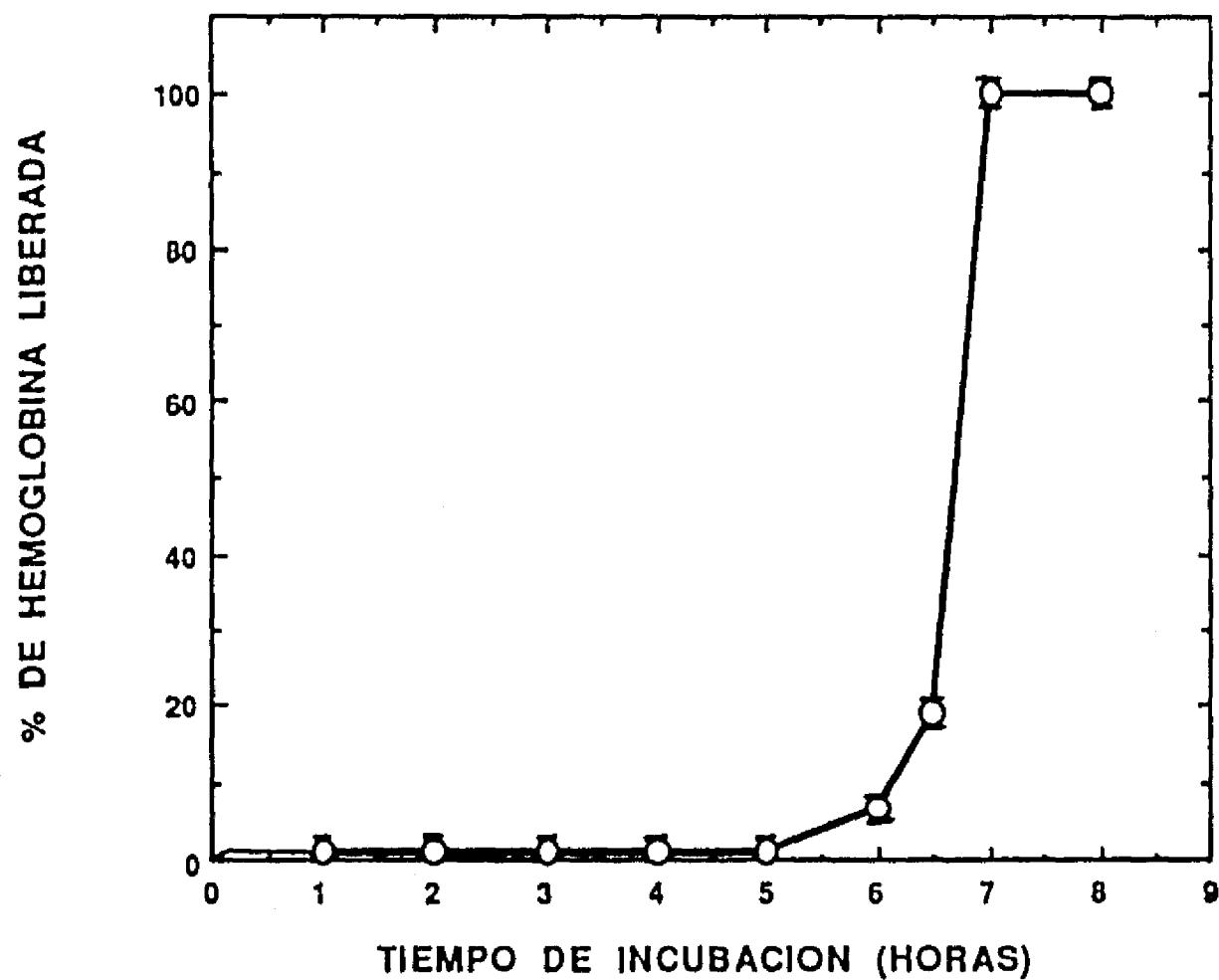


Figura 5. La fracción P30 presenta actividad hemolítica dependiente del tiempo de incubación. A tiempos variables de incubación determinamos el porcentaje de hemoglobina liberada en mezclas de ensayo con 25  $\mu$ l de eritrocitos humanos al 1 % y con 200  $\mu$ g de proteínas de la fracción P30. Todas las determinaciones se hicieron en las mismas condiciones y se incubaron durante el tiempo de hasta 7 hrs indicado en la gráfica. Los símbolos corresponden al promedio y desviación estándar de doce determinaciones en cuatro experimentos independientes.

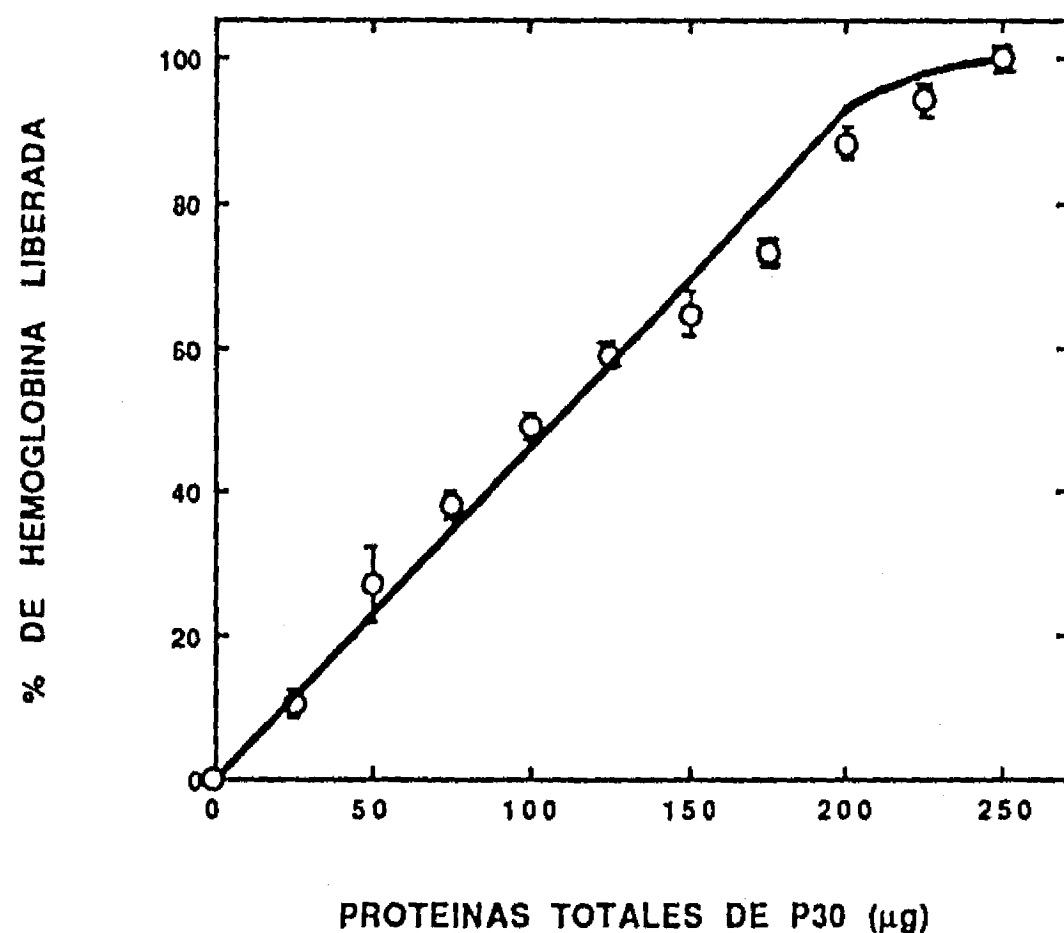


Figura 6. La fracción P30 presenta actividad hemolítica dependiente de la dosis. Después de 7 hrs de incubación a 37 °C determinamos el porcentaje de hemólisis en mezclas de ensayo con 1 % de eritrocitos y cantidades variables de P30 suspendidos en 50 µl de SSB. Cada símbolo corresponde al promedio y desviación estándar de nueve determinaciones en tres experimentos independientes.

#### 2.B. La actividad hemolítica de P30 es inhibida por el IR.

Determinamos el efecto del IR sobre la actividad hemolítica de P30. Realizamos este estudio escogiendo la condición en que se obtenía el 75 % de liberación de hemoglobina, es decir, 167 µg de P30 a 7 hrs de incubación (Figura 6). La muestra amibiana fué preincubada durante 30 min a 37 °C con varias concentraciones del IR. La máxima concentración fué de 150 µM, ya que la liberación basal directa de hemoglobina por el inhibidor en dicha concentración es del 26 % (ver Figura 4). En la Figura 7, puede observarse que el IR disminuye fuertemente la liberación de hemoglobina por la fracción P30, a una concentración de 20 µM donde se alcanza una inhibición de aproximadamente 90 % y no aumenta aún con mayores concentraciones del inhibidor. La dosis inhibitoria media fué de 10 µM.

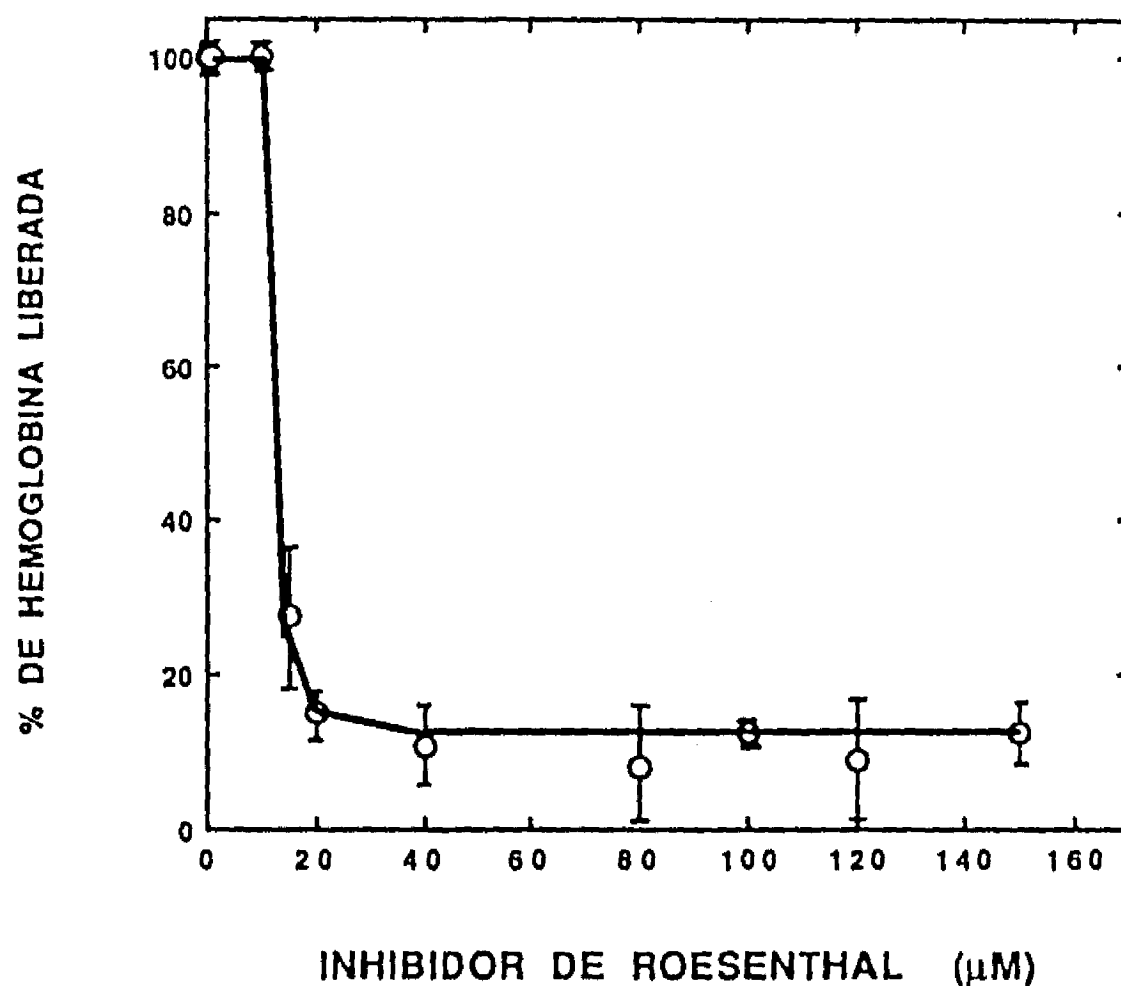


Figura 7. La actividad hemolítica de P30 es inhibida fuertemente por el IR. Determinamos el porcentaje de hemoglobina liberada por 167 µg (DH<sub>75</sub>) de proteína de P30 (50), preincubada con diferentes concentraciones de IR durante 7 hrs. Cada símbolo corresponde al promedio y desviación estándar de nueve determinaciones en tres experimentos independientes.

Los datos presentados anteriormente, indicaban que la actividad del IR como inhibidor de las fosfolipasas A amibianas era buena. Esta situación nos llevó a pensar que podríamos utilizar al IR como un ligando de afinidad para la purificación de las mismas. De hecho, este fué el caso, como se describe a continuación.

La síntesis de un adsorbente nuevo para fosfolipasas A requirió de un esfuerzo importante, ya que son varios los parámetros y condiciones que tienen que determinarse a fin de que funcione adecuadamente. Ya que la fuente de material biológico amibiano es más bien restringido y a que las fosfolipasas forman parte importante dentro de la composición de los venenos de animales, decidimos emplear éstos últimos para la optimización de la síntesis del adsorbente y de las condiciones para su empleo. Estos resultados están formalizados en el artículo "A NEW AFFINITY ADSORBENT FOR THE PURIFICATION OF PHOSPHOLIPASES A<sub>1</sub> AND A<sub>2</sub> FROM ANIMAL VENOMS, por VARGAS-VILLARREAL, J.; MARTIN-POLO, J. J.; REYNAUD, E. Y ALAGON-CANO, A. 1991 Toxicon 29: 119-124. Este artículo forma parte de la presente tesis y se adiciona una copia del mismo.

La fracción amibiana que utilizamos para la purificación y caracterización de las fosfolipasas fué la fracción subcelular P30 (50), ya que en ella reside más del 90 % de las actividades hemolítica, citolítica

y fosfolipásica (50,53,56). Esta fracción (P30) es vesicular, es decir, está compuesta por vesículas selladas de membrana, así como de las vesículas digestivas y lisosomales propias del trofozoíto (50). Por estas razones, es que decidimos emplear la fracción P30 como punto de partida para la caracterización y purificación de las actividades fosfolipásicas.

### 3. Extracción y solubilización de las actividades fosfolipásicas en la fracción P30.

Como primer paso deslipidizamos la fracción P30 mediante la extracción con disolventes orgánicos y posteriormente, solubilizamos la fracción protéica precipitada y deslipidizada que contiene la actividad enzimática, mediante el uso de alta concentración de sal y/o detergentes con distintas propiedades.

Probamos varios disolventes como se describe en la Figura 8. Las mezclas de P30 tratadas con acetona, metanol, etanol y dioxano, solubles y que forman una sola fase con el agua, presentaron precipitados en el fondo de los tubos y las de cloroformo y de tetracloruro de carbono, con mayor densidad que el agua, forman un precipitado en su superficie. Con otros dos disolventes, el tolueno y el éter etílico, con menor densidad que el agua, se formaron dos precipitados, el primero se localizaba en toda la fase acuosa y en el segundo en la interfase con el amortiguador acuoso. Como puede verse en la Figura 8, la extracción con éter etílico fué la que dió mejores resultados.

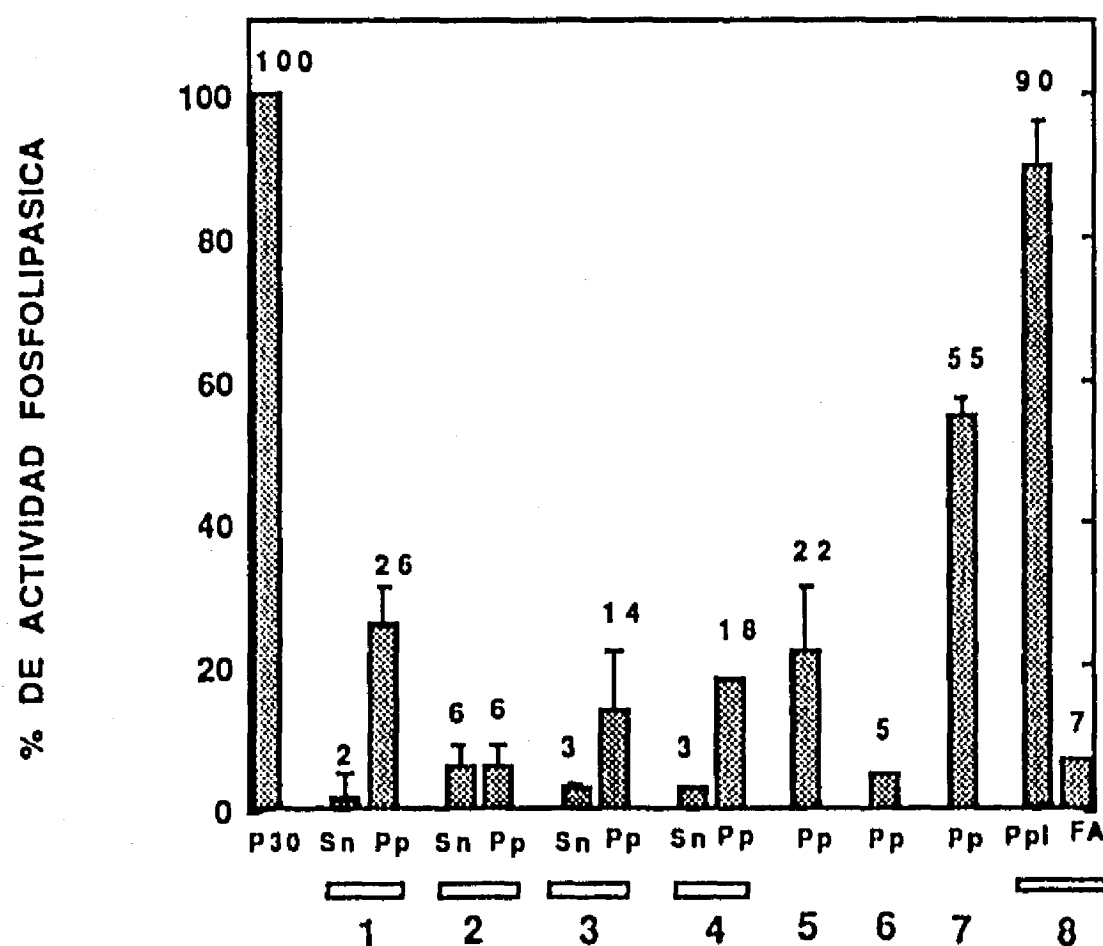


Figura 8. Deslipidización de la fracción P30 con diferentes disolventes orgánicos. En tubos eppendorf de 1.5 ml se colocaron 1.9 mg de P30 en 100  $\mu$ l de SSB y se les adicionó 1 ml de los siguientes disolventes orgánicos: 1) acetona, 2) metanol, 3) etanol, 4) dioxano, 5) cloroformo, 6) tetracloruro de carbono, 7) tolueno y 8) éter etílico, indicados en la



Figura Después cada muestra fué agitada por 5 min en un vórtex a máxima velocidad y se centrifugaron a 30,000 X g por 5 min. Los precipitados fueron resuspendidos en 100  $\mu$ l de SSB. Se les midió actividad de fosfolipasa A a los sobrenadantes (Sn), a los precipitados (Pp), e insolubles (PpI) y a la fase acuosa obtenida con éter etílico (FA). El 100 % de actividad enzimática está referida a la que está presente en una cantidad equivalente de P30. La actividad de fosfolipasa fué determinada por el método de radioensayo como se explica en métodos. Las barras corresponden al promedio y desviación estándar de nueve determinaciones en tres experimentos independientes.

A continuación probamos varias condiciones para solubilizar la actividad de fosfolipasa. En la Figura 9, se ven los resultados obtenidos empleando varios detergentes a 0.5 % (p/v) ó 1 M de KCl. Como puede observarse en presencia del amortiguador sólo (SSB) no existe solubilización de la actividad fosfolipásica: con los detergentes la solubilización va desde 0 (SDS) hasta 27 % (Tritón X-100). Con KCl, en ausencia de detergentes, se logra un 26 % de solubilización de la actividad fosfolipásica.

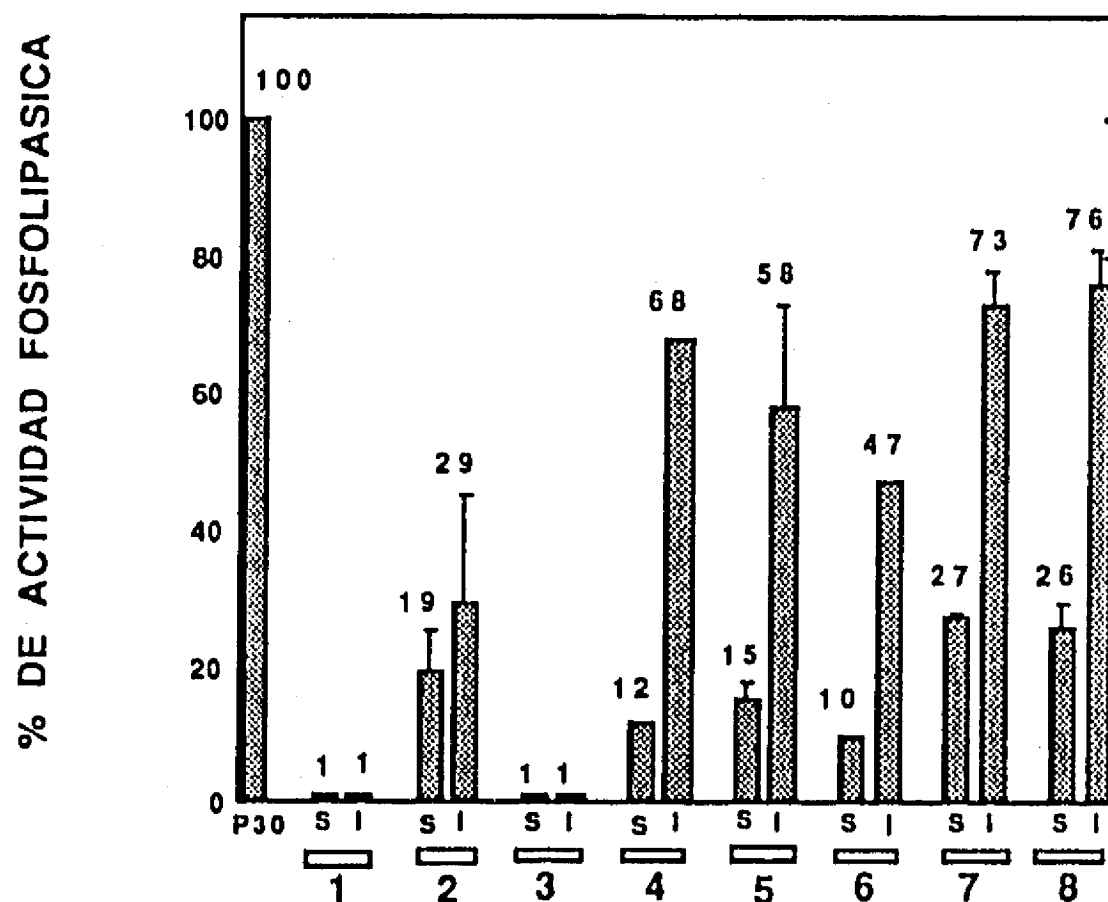


Figura 9. Solubilización de la actividad de fosfolipasa A del precipitado en la interfase éter etílico/amortiguador acuoso con detergentes o alta fuerza iónica. El precipitado obtenido extrayendo 100  $\mu$ l de P30 con éter etílico fué tratado, en tubos eppendorf, con 100  $\mu$ l de 0.5%: 1) solución salina de Hancks, 2) deoxicolato de sodio, 3) dodecilsulfato de sodio, 4) lisofosfatidilcolina, 5) nonidet P-40, 6) CHAPS, 7) Tritón X-100 y 8) KCl 1 M. Las muestras fueron resuspendidas con 50 golpes de un homogenizador

del tipo Elvejem-Potter, activado con la mano. Posteriormente se agitaron suavemente durante 5 min en un vórtex y se dejaron reposar por 30 min a 4 °C. Después de este tiempo se centrifugaron en la microfuga por 5 min y obtuvimos las fracciones solubles (S) e insolubles (I) a estas últimas se les ajustó el volumen a 100 µl con SSB. La actividad de fosfolipasa del tipo A se determinó con el método de radioensayo como se explica en métodos. El 100 % de la actividad enzimática está referida a la presente en una cantidad equivalente de P30. Las barras corresponden al promedio y desviación estándar de nueve determinaciones en tres experimentos independientes.

El hecho de que no hayamos encontrado actividad fosfolipásica con SDS pudiera explicarse por sus propiedades desnaturizantes. Dado el efecto positivo del KCl, en una segunda ronda de experimentos extrajimos con algunos detergentes pero en presencia de 1 M de KCl; estos resultados se muestran en la Figura 10. La solubilización más exitosa, en términos de actividad, la logramos con la combinación de 0.5 % Tritón X-100/1 M KCl, donde notamos en esta fracción una activación de las fosfolipasas presentes, como se puede ver en esta figura.

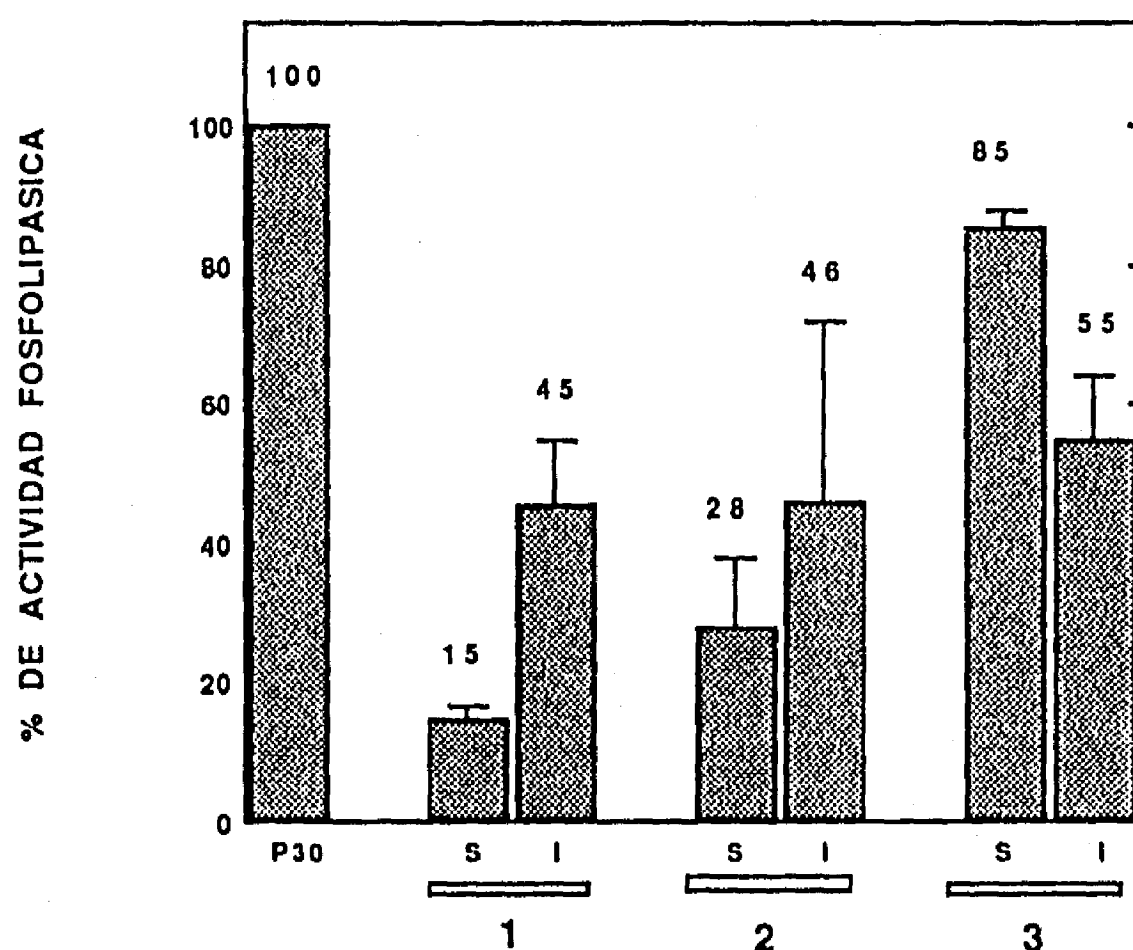


Figura 10. Solubilización de la actividad de fosfolipasa A del precipitado en la interfase éter etílico/amortiguador acuso con detergentes en presencia de alta concentración de KCl. Se procedió en forma similar a lo descrito en la Figura 9. En todos los casos, la concentración del KCl fué 1 M y 0.5 % del los siguientes detergentes: 1) deoxicolato de sodio, 2) nonidet P-40 y 3) Tritón X-100.

#### 4. Purificación y caracterización de una fosfolipasa A<sub>2</sub>, dependiente de Ca<sup>++</sup>, con actividades hemolítica y citotóxica directa sobre células de mamífero.

A continuación describiremos la purificación y caracterización de una fosfolipasa A<sub>2</sub> a partir del material solubilizado con 1 M KCl. Decidimos comenzar con esta preparación ya que de entrada estábamos trabajando con una(s) enzima(s) cuya(s) solubilidad(es) no dependía de la presencia de detergentes en el medio. Los detergentes interfieren con los ensayos de hemólisis y citotoxicidad; la interferencia puede ser de dos maneras: produciendo *per se* lesiones en las membranas de las células blanco y/o potenciando dichas actividades.

Las amibas presentan una fuerte actividad proteolítica, casi el 90 % de ella depende de sulfhidrilo proteasas (46,47). Por ello, durante los experimentos de purificación se incluyó un inhibidor el p-cloromercuribenzoato de sodio. El inhibidor se empleó en todos los pasos a una concentración de 0.1 mM, desde que las amibas fueron lavadas y homogeneizadas para la obtención de la fracción subcelular P30, como también durante los procesos de solubilización, cromatoenfoco, clasificación de las fosfolipasas y cromatografía de afinidad. Se probó previamente que la concentración escogida de inhibidor fuera inócua para la actividad fosfolipásica total, medida en la fracción P30.

El primer intento de purificación de la(s) fosfolipasa(s) solubilizada con KCl fué hecho pasando la fracción directamente por una columna sefarosa-IR. En estas condiciones, la mayor parte de la actividad se une a la resina y es eluída con EDTA. El análisis electroforético de la fracción con la actividad de fosfolipasa mostró varias bandas. En vista de lo anterior, decidimos incluir un paso previo de fraccionamiento, cromatoenfoco en columna, que separa proteínas de acuerdo a su punto isoeléctrico (74).

##### 4 A. Cromatoenfoco de la fracción extraída con KCl 1.0 M

La fracción solubilizada con KCl 1 M (Figura 9) fué diluida 10 veces con amortiguador de Tris-HCl 100 mM, pH 9.4 y se aplicó a la columna de cromatoenfoco. Las proteínas fueron eluídas con un gradiente lineal de pH de 9.4 a 4.0; a las fracciones se les midió su A<sub>280</sub>, así como sus actividades fosfolipásica y proteolítica (Figura 11). Como puede observarse, toda la actividad proteolítica se localizó en el rango de pH entre 9.0 a 8.5, en tanto que la actividad de fosfolipasa fué fraccionada en 3: la primera sale en el cargado de la columna, la segunda eluye entre pH 8.3-7.3 y la última con el tratamiento de alta fuerza iónica. Se recuperó el 129 % de la actividad de fosfolipasa, distribuida así: 76.31, 38.46 y 14.35 % en las fracciones I, II y III, respectivamente, estos datos nos sugieren que la actividad fosfolipásica se activó, posiblemente por estar más accesible al substrato. Los resultados de recuperación de proteína y de actividad de fosfolipasa durante el fraccionamiento en esta columna se muestran en la Tabla I. Las fracciones I y III no fueron consideradas para posteriores separaciones dado que sus actividades específicas eran mucho menores a la de la fracción II.

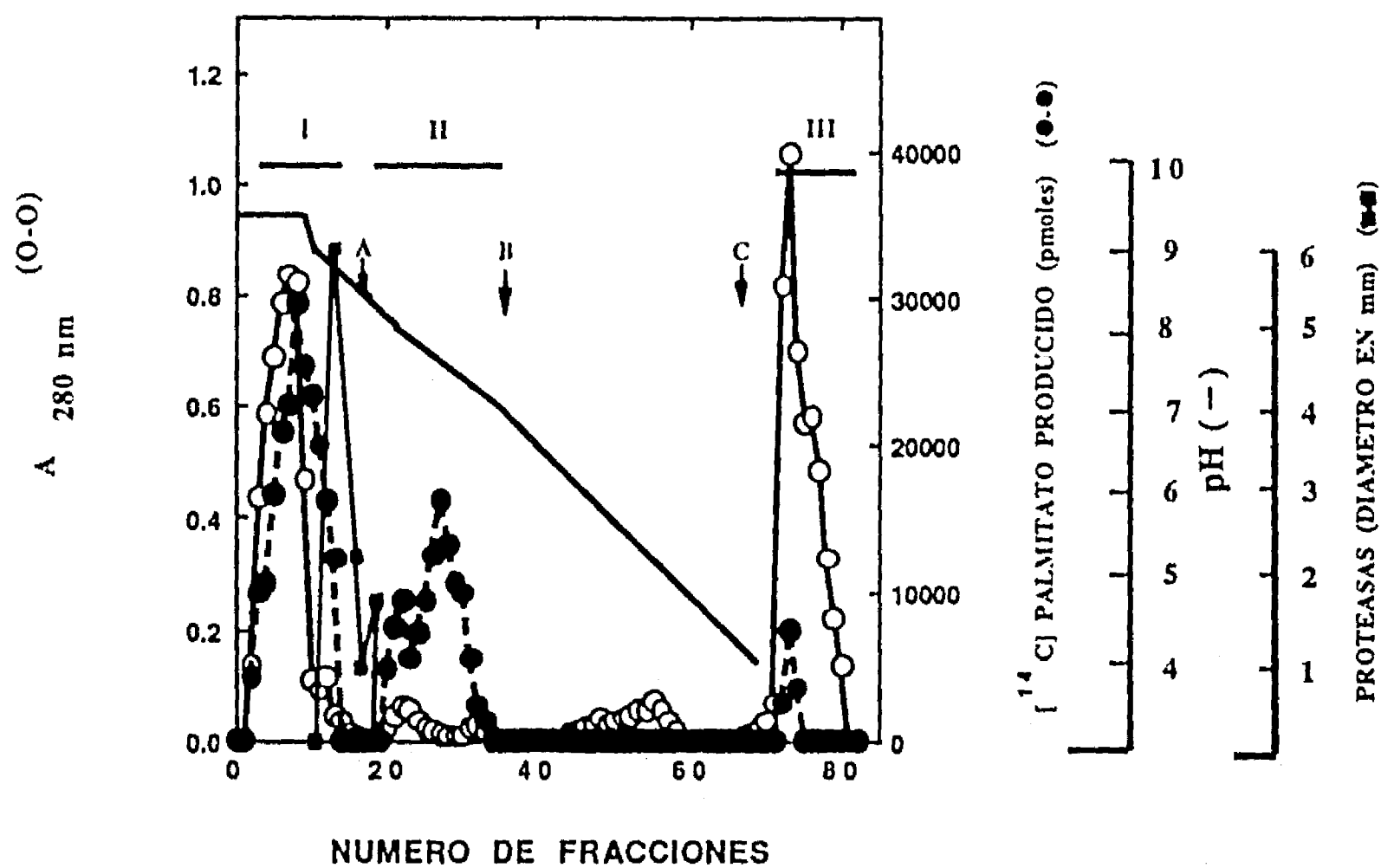


Figura 11. Cromatofoco de la fracción solubilizada con KCl 1 M. Diluimos 10 veces el sobrenadante obtenido con KCl 1 M de la Figura 9, con Tris-HCl 25 mM, pH 9.4 y 0.1 mM del inhibidor de tiolproteasas. Aplicamos la muestra en una columna de cromatofoco de 10 ml (7 X 0.9 cm) con 8.0 ml de resina y eluimos la muestra con: A) poliamortiguador de pH de 9.4 a 6.0, B) poliamortiguador de 6.0 a 4.0 y C) 20 ml de NaCl 0.5 M. Colectamos muestras de 2 ml por tubo a una velocidad de flujo de 45 ml/h. Las barras horizontales indican los cortes que se hicieron. La actividad fosfolipásica y proteolítica se midieron como se describe en métodos.

TABLA I

**RECUPERACION DE PROTEINAS Y DE ACTIVIDAD FOSFOLIPASICA DE LA COLUMNA DE CROMATOENFOQUE**

Fracciones	A <sub>280</sub> <sup>a</sup>	ml	A <sub>280</sub> Total	U/ml X 10 <sup>3</sup>	U/mg X 10 <sup>3</sup>	Actividad total X 10 <sup>3</sup>	% de Recuperación	Veces de Recuperación
E-KCl <sup>b</sup>	1.45	15.5	22.48	224.6	154.9	3482.15	100	1
I	0.34	30.0	10.35	88.58	260.53	2657.40	76.31	1.68
II	0.02	32.0	0.83	41.86	2093.0	1339.52	38.46	13.51
III	0.50	20.0	10.00	25.0	50.0	500.00	14.35	0.32

<sup>a</sup>A<sub>280</sub>= 1.0 equivale aproximadamente a 1 mg de proteínas.

<sup>b</sup>E-KCl= Extracto obtenido con KCl.

**4.B. Cromatografía de la fracción II en la columna de IR-sefarosa 4B.**

A la fracción II se le añadió Tris-HCl y CaCl<sub>2</sub> a fin de ajustar las concentraciones a 100 y 2.5 mM, respectivamente, y el pH a 8.0. En estas condiciones fué cargada en una columna de IR-sefarosa 4B y eluída en las condiciones indicadas en la Figura 12. La actividad de fosfolipasa se separó en tres componentes. En electroforesis, y por tinción de plata, las fracciones II.1 y II.3 presentaron varios componentes, en tanto que la II.2 no pudimos observar alguna banda protéica, por lo tanto para determinar su peso molecular y su pureza fué necesario iodinar las muestras como se describe más adelante. La fracción II.1 se recromatografió en las misma condiciones y, una vez más, la actividad fosfolipásica no fué retenida por la columna. Sabemos que esta fracción presenta actividad fosfolipásica dependiente de Ca<sup>++</sup> y del tipo A<sub>2</sub> pero no tiene afinidad por el IR.

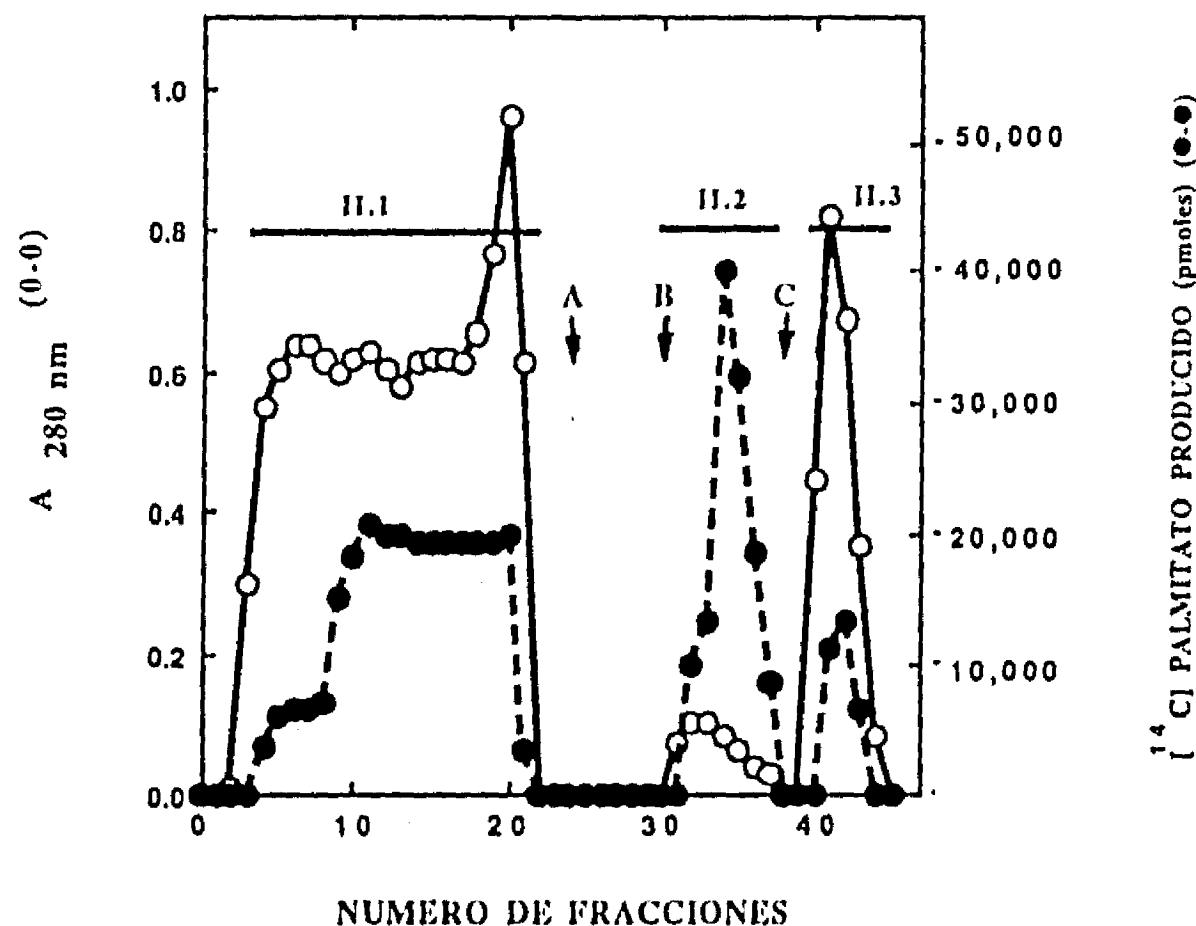


Figura 12. Cromatografía de afinidad-IR de la fracción II.2. Mezclamos el contenido de la fracción II.2 del cromatoenfoco de la Figura 11, con 1 ml de Tris-HCl 1 M pH 8.0 y 2.5 mM de  $\text{CaCl}_2$ . Aplicamos esta muestra a una columna de afinidad acoplada con el IR (0.44 X 5.4 cm) con 0.8 ml de resina, previamente equilibrada con el amortiguador inicial de Tris-HCl 100 mM pH 8.0, y eluimos la muestra con: A) el mismo amortiguador conteniendo 0.5 M de NaCl, B) Tris-HCl 100 mM pH 8.0 conteniendo 50 mM de EDTA y C) 0.1 M de ácido acético. Colectamos muestras de 1 ml por tubo. Las barras horizontales indican los cortes que se hicieron. La actividad de fosfolipasa la medimos por radioensayo como se describe en métodos. Las fracciones obtenidas con ácido acético las recibimos en tubos que contenían 1 ml de Tris-HCl 1 M pH 8.0.

#### 4.C. Criterio de pureza de la fracción II.2.

Para corroborar la pureza de la fracción II.2 (con actividad fosfolipásica del tipo A) fué iodada y se le analizó en geles de poliacrilamida con SDS, tanto en presencia como en ausencia de  $\beta$ -mercaptoetanol. Utilizamos las preparaciones con actividad fosfolipásica obtenidos de la fracción II.2, encontramos que en los geles de SDS en condiciones no reducidas se reveló dos bandas con pesos moleculares de 30,000 y 15,000 D (Figura 13), así como también se observa una banda en la región de albúmina bovina (BSA, como control positivo) con un peso molecular de 67,000 Daltons (Figura 13). En condiciones reducidas, donde empleamos el método descrito según el fabricante del sistema phast system (Pharmacia Uppsade, Suiza); sólo observamos una sólo banda de 15,000 Daltons, confirmando que la banda de 30,000 Daltons corresponde al dímero de la fosfolipasa y su

homogeneidad y pureza de una sólo banda protéica (Figura 14, A). También observamos a la fosfolipasa en condiciones nativas en geles de gradiente de 8-25 %, con el método de phast system (Figura 14, B).

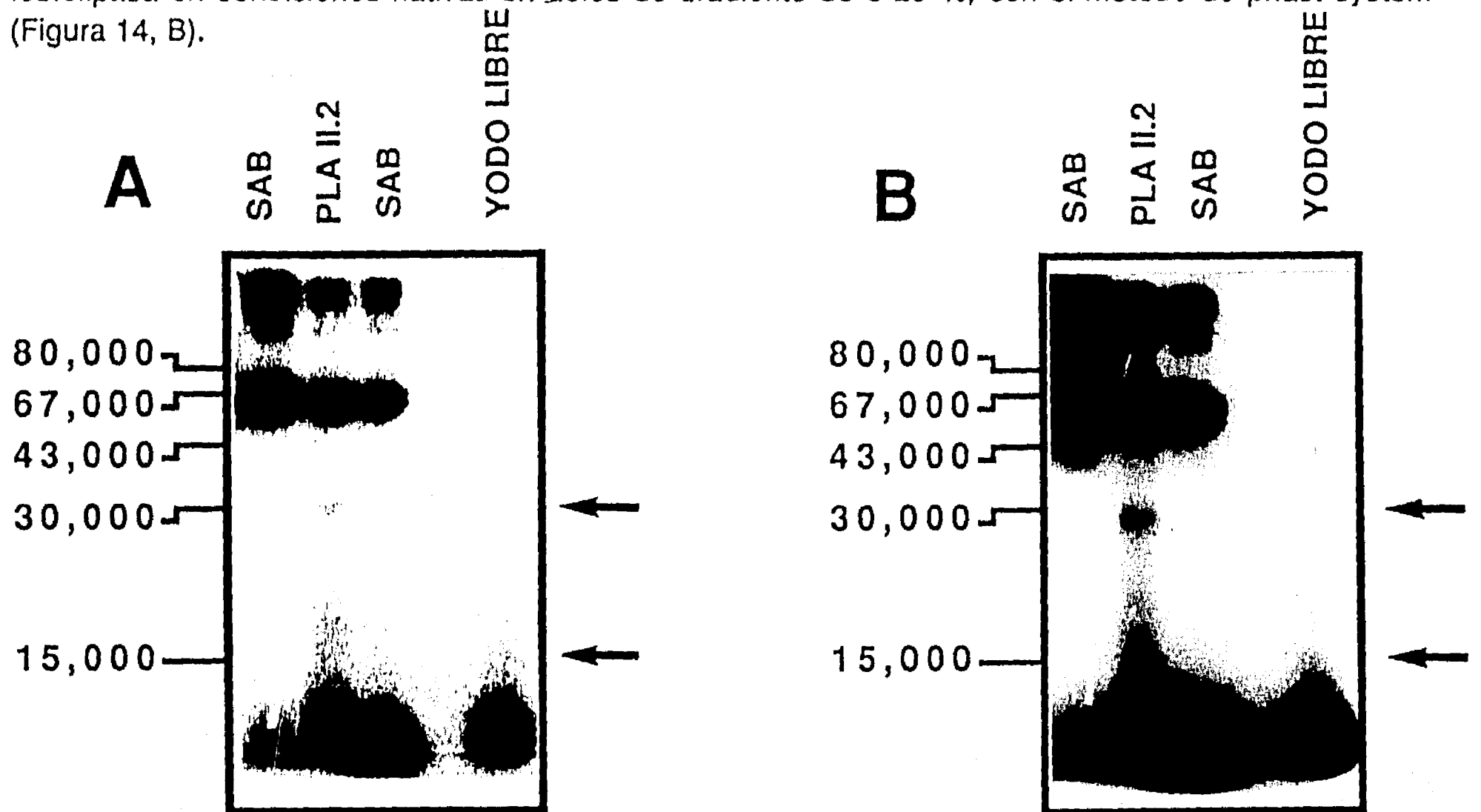


Figura 13. Electroforesis en gel en placa de poliacrilamida (12.5%) en presencia de SDS, de la fracción II.2 iodizada A (30 min de exposición) y B (1 hr de exposición). 1) BSA, como control positivo, 2) fracción II.2 (600,000 DPM). La posición de los estándares de peso molecular conocidos se encuentran indicadas a la izquierda de la Figura.

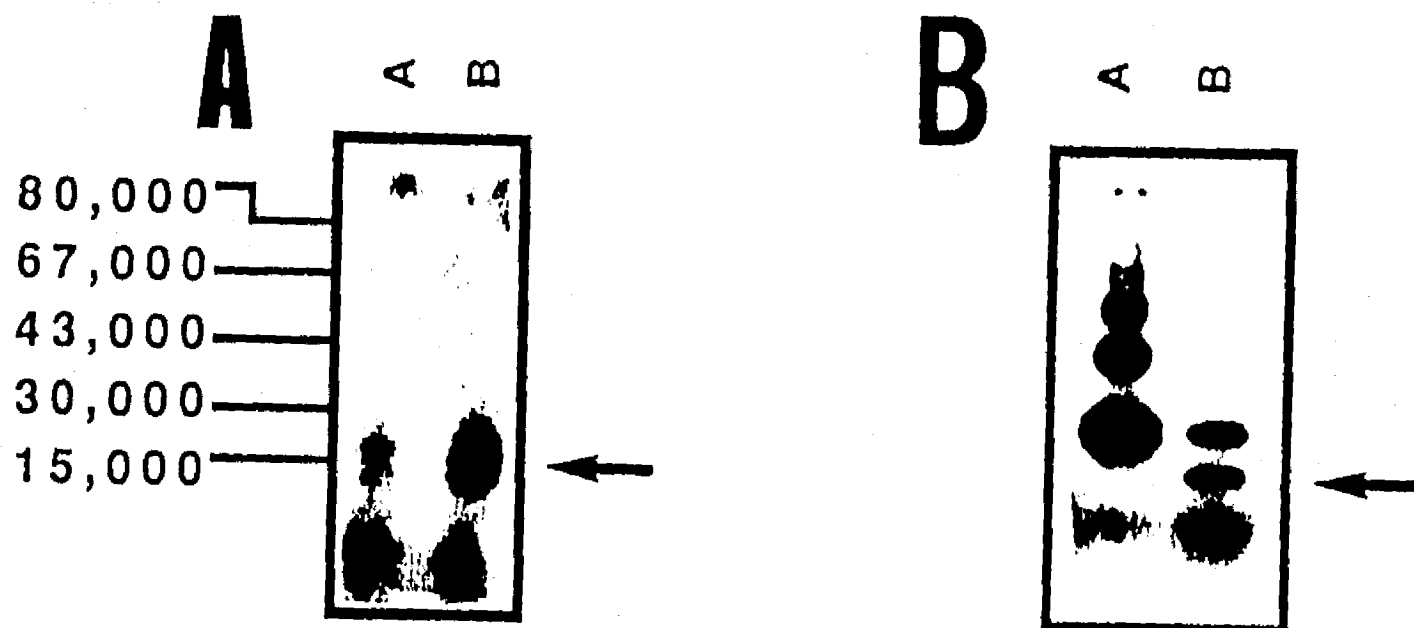


Figura 14. Electroforesis en placa de geles en condiciones de SDS al (20%) (A) y en condiciones nativas de Tris-HCl, homogéneos (8-25%) (B), de la fracción II.2. 1) seroalbumina bovina como control positivo y 2) fracción II.2.

#### 4.D. Punto isoeléctrico (pI) de la actividad fosfolipásica presente en la fracción II.2.

La determinación del pI de la actividad fosfolipásica de la fracción II.2 la hicimos mediante un gel de isoelectroenfoque con anfólitos en un gradiente de 3 a 9 de pH. Empleamos el método descrito según el fabricante del sistema phast system (Pharmacia Uppsade, Suiza); en este caso utilizamos las muestras iodinadas referidas anteriormente (ver inciso 4.C) y BSA. Los resultados del mismo se muestran en la Figura 15. El pI determinado gráficamente fué de 7.0 para la fracción II.2 y de 5.85-6.0 para BSA, respectivamente.

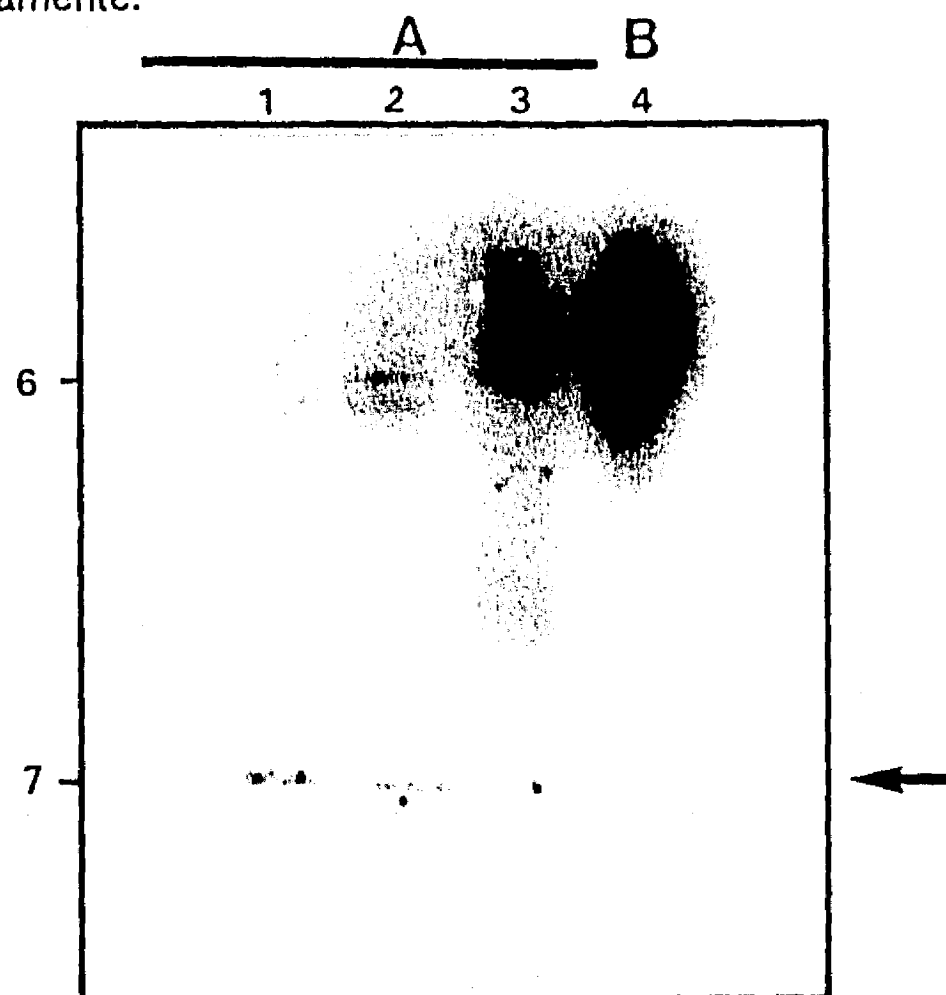


Figura 15. Isoelectroenfoque de la fracción II.2. Determinamos el punto isoeléctrico en geles de isoelectroenfoque en un rango de pH de 3.0 a 9.0. A) fracción II.2, carriles 1, 2, 3 y B) seroalbumina bovina como control positivo, carril 4.

#### Caracterización enzimática de la actividad fosfolipásica de la fracción II.2.

##### 4.E. La fracción II.2 presenta sólo actividad fosfolipásica del tipo A<sub>2</sub>.

La fracción II.2 contiene sólo actividad fosfolipásica del tipo A<sub>2</sub> ya que en el análisis de los productos de degradación de los substratos específicos revelaron que la radioactividad estuvo presente en las manchas correspondientes a [<sup>14</sup>C]AGL (cuando usamos el substrato L- 1,2 -dipalmitoil-[2-palmitoil-1-<sup>14</sup>C]-fosfatidilcolina ([<sup>14</sup>C]FC(1)) y ésta se incrementó con respecto al tiempo de incubación a 37 °C (Figura 16). No detectamos radioactividad en las manchas correspondientes a [<sup>14</sup>C]LFC, ni en las manchas de [<sup>14</sup>C]AGL cuando usamos el substrato específico para las lisofosfolipasas (L 1 -palmitoil-[1-palmitoil-<sup>14</sup>C]-lisofosfatidilcolina ([<sup>14</sup>C]LFC)) (Figura 16), lo que indica que no tiene actividad residual de fosfolipasa del tipo B. De aquí en adelante a la única fosfolipasa



presente en la fracción II.2, le llamaremos fosfolipasa II.2, por venir de ésta fracción.

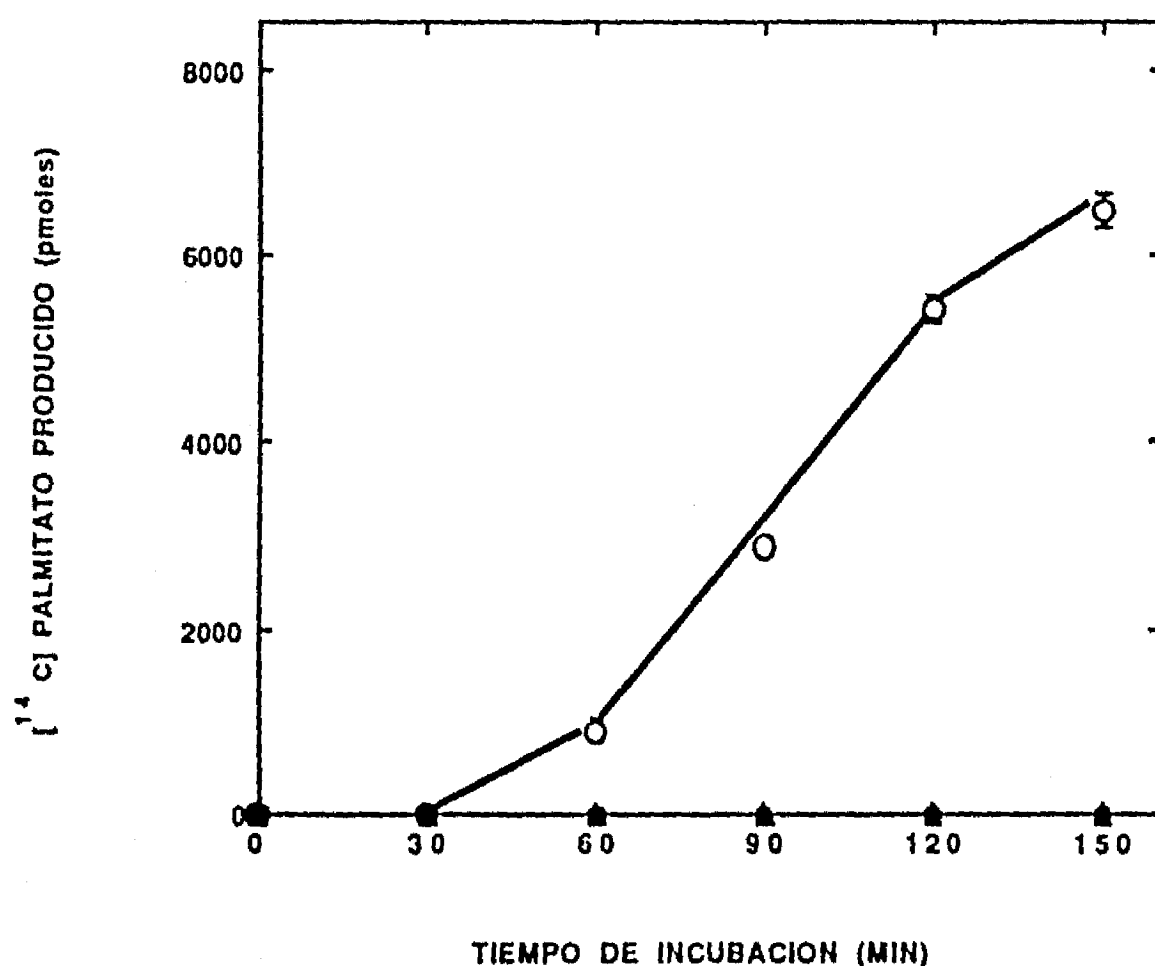


Figura 16. La fracción II.2 presenta sólo actividad fosfolipásica del tipo  $A_2$ . A tiempos variables de incubación a 37 °C determinamos el tipo de fosfolipasa A y/o la presencia de actividad de lisofosfolipasa en la fracción obtenida en la Figura 12 (II.2), cuando en las mezclas de ensayo usamos como sustrato el [<sup>14</sup>C]FC(1) 6 [<sup>14</sup>C]LFC y 10 µl de la fracción II.2 (600 ng de proteína total). Determinamos la radioactividad correspondiente a [<sup>14</sup>C]AGL (○) y [<sup>14</sup>C]LFC (●) o a [<sup>14</sup>C]AGL (▲) (proveniente del sustrato para lisofosfolipasa) después de separar estos productos mediante cromatografía en placa fina. Los símbolos corresponden al promedio y desviación estándar de seis determinaciones en tres experimentos independientes.

#### 4.F. La fosfolipasa II.2 presenta actividad a pH básico.

La fosfolipasa II.2 presenta su máxima actividad a pH 8.0, como se observa en la Figura 17, si bien dentro de todo el rango de 6 a 10 presenta una actividad enzimática significativa.

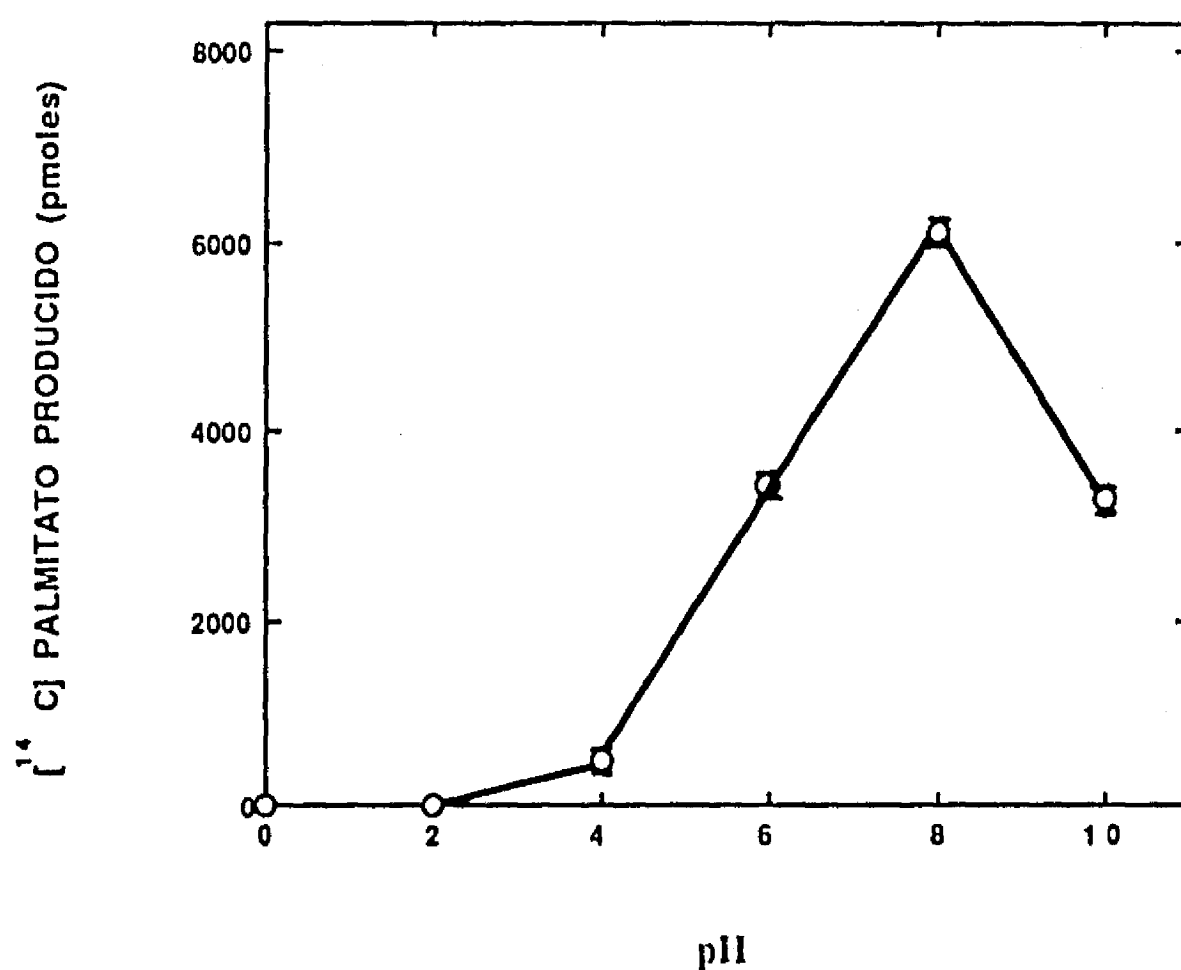


Figura 17. La fosfolipasa II.2 presenta actividad fosfolipásica del tipo A a pH básico. Determinamos la actividad fosfolipásica de la fosfolipasa II.2 en mezclas de ensayo ajustadas a diferentes valores de pH y adicionando como sustrato el [<sup>14</sup>C]FC(2) y 10  $\mu$ l de esta fosfolipasa (600 ng de proteína total). Los símbolos representan el promedio y desviación estándar del contenido de [<sup>14</sup>C]AGL en las mezclas de ensayo.

#### 4.G. La fosfolipasa II.2 es dependiente de Ca<sup>++</sup>

Determinamos la actividad de la fosfolipasa II.2 en presencia de Ca<sup>++</sup> ó ausencia de este catión. Encontramos, que esta enzima es dependiente de calcio, ya que su actividad se ve fuertemente disminuida (>95 %) en un amortiguador sin calcio y en presencia de 2 mM de EDTA (ver más adelante Figura 26)

#### Propiedades citotóxicas directas de la fosfolipasa II.2.

Los efectos tóxicos de la fosfolipasa II.2 fueron evaluados en dos tipos celulares: eritrocitos humanos (hemólisis) y células CHO (liberación de [<sup>3</sup>H]-UTP).

## 5. HEMOLISIS.

### 5.A. La fosfolipasa II.2 tiene actividad hemolítica que depende del tiempo de incubación y la dosis.

La actividad hemolítica de la fosfolipasa II.2 fué dependiente tanto del tiempo de incubación como de la dosis. Esta fosfolipasa incrementó la liberación de hemoglobina con respecto al tiempo de incubación, alcanzando el 100 % en 1 hr (Figura 18). La fosfolipasa purificada de *C. basiliscus*, presenta actividad hemolítica indirecta, es decir, por sí sola no presenta actividad hemolítica, ya que requiere de la preincubación con fosfatidilcolina y la producción de agentes líticos como AGL y LFC; si no hay una previa preincubación con fosfatidilcolina su efecto hemolítico se retarda, con respecto al tiempo de incubación, como se puede ver en la Figura 18. Para todas las determinaciones usamos 174 ng totales en masa tanto de la fosfolipasa II.2, como la fosfolipasa de *C. basiliscus*, pero la actividad fosfolipásica de esta última medida por el método de radioensayo es aproximadamente 20,000 veces mayor que la actividad fosfolipásica de la fracción II.2. En la curva dosis-respuesta encontramos que la fosfolipasa II.2 incrementa la liberación de hemoglobina proporcionalmente entre 0 y la máxima concentración empleada que fué de 174 ng de dicha fracción (Figura 19); la  $DH_{50}$  correspondió a 64 ng y el 100 % a 174 ng. Con la fosfolipasa pura de *C. basiliscus*, preincubada con fosfatidilcolina, la  $DH_{50}$  correspondió a 83 ng

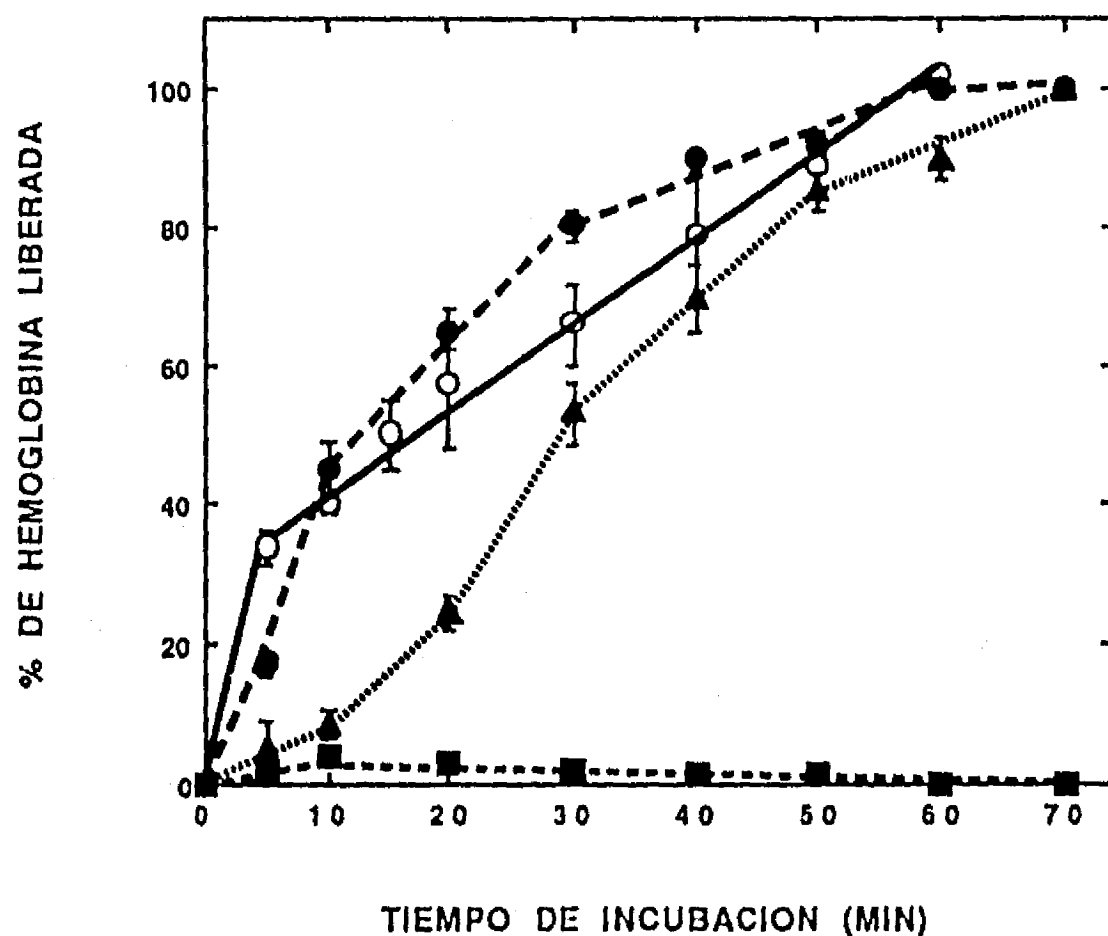


Figura 18. Liberación de hemoglobina en función del tiempo de incubación con la fosfolipasa II.2. A tiempos variables de incubación determinamos el porcentaje de hemoglobina liberada en mezclas de ensayo con 5  $\mu$ l de eritrocitos humanos al 5 % y con 174 ng de la fosfolipasa II.2 (○) ó la misma cantidad en proteína de la fosfolipasa pura de *Crotalus basiliscus* preincubada con fosfatidilcolina por 10 min a 37 °C (●), sin preincubar (▲) ó

sin fosfatidilcolina (■). Todas las determinaciones se hicieron en las mismas condiciones y se incubaron durante el tiempo indicado en la gráfica. Los símbolos corresponden al promedio y desviación estándar de seis determinaciones en dos experimentos independientes.

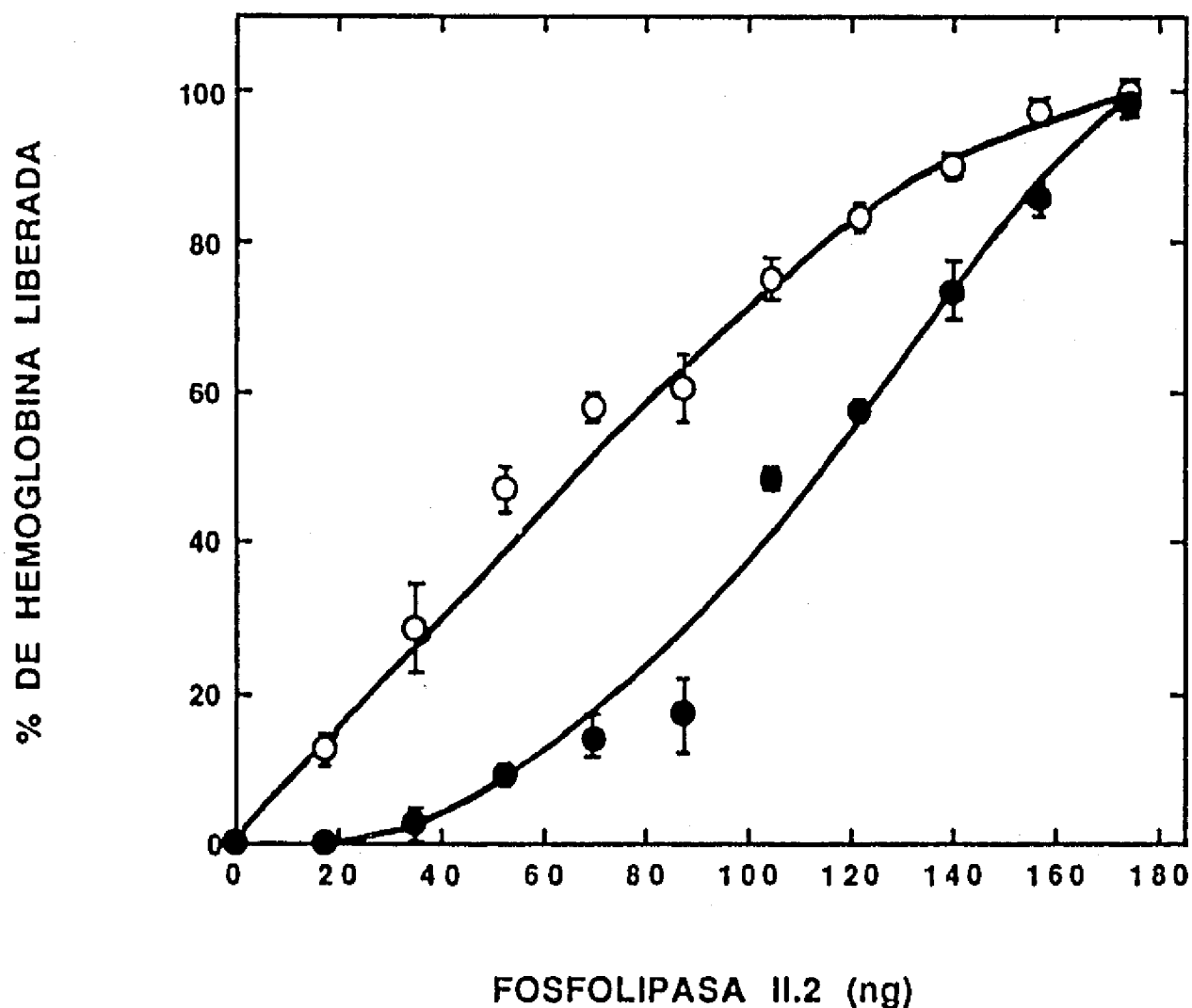


Figura 19. Curva dosis respuesta en la hemólisis por la fosfolipasa II.2. Después de 1 hr de incubación a 37 °C determinamos el porcentaje de hemólisis en mezclas de ensayo con 5 % de eritrocitos y cantidades variables de la fosfolipasa II.2 (○) ó de la fosfolipasa purificada de *Crotalus basiliscus* (preincubado con fosfatidilcolina por 10 min) (●), suspendidos en 10  $\mu$ l de SSB. Cada símbolo corresponde al promedio y desviación estándar de seis determinaciones en dos experimentos independientes.

El efecto hemolítico de la fosfolipasa II.2 parece ser del tipo directo, ya que no presenta fase lag, lo que contrasta con lo encontrado con la fracción P30, que sí posee un lag de varias horas (Figura 5), esto se podría explicar por la complejidad estructural de la P30, ó bien por la accesibilidad de la fosfolipasa II.2 en la P30 completa. En cambio con una fosfolipasa hemolítica indirecta tiene que haber acumulación de los productos de hidrólisis, antes de que se dispare su actividad y haya rompimientos de los eritrocitos, como ocurre con la fosfolipasa de *C. basiliscus* (Figura 18)

5.B. Las actividades hemolíticas de la fosfolipasa II.2 y de la fosfolipasa de *C. basiliscus* son inhibidas por el inhibidor de Rosenthal.

La actividad hemolítica de la fosfolipasa II.2 y la fosfolipasa pura de *C. basiliscus* se inhibieron con diferentes concentraciones del IR (Figura 20). La  $DI_{50}$  se alcanzó a una concentración de  $9 \mu\text{M}$  para la fosfolipasa II.2 y  $3.7 \mu\text{M}$  para *C. basiliscus*. Realizamos este estudio escogiendo la condición en que se obtenía el 75 % de liberación de hemoglobina, es decir,  $110 \text{ ng}$  ( $22 \mu\text{g/ml}$ ) de la fosfolipasa II.2 a 1 hr de incubación, y  $105 \text{ ng}$  ( $21 \mu\text{g/ml}$ ) de la fosfolipasa de *C. basiliscus* preincubada con fosfatidilcolina por 10 min (ver Figura 19).

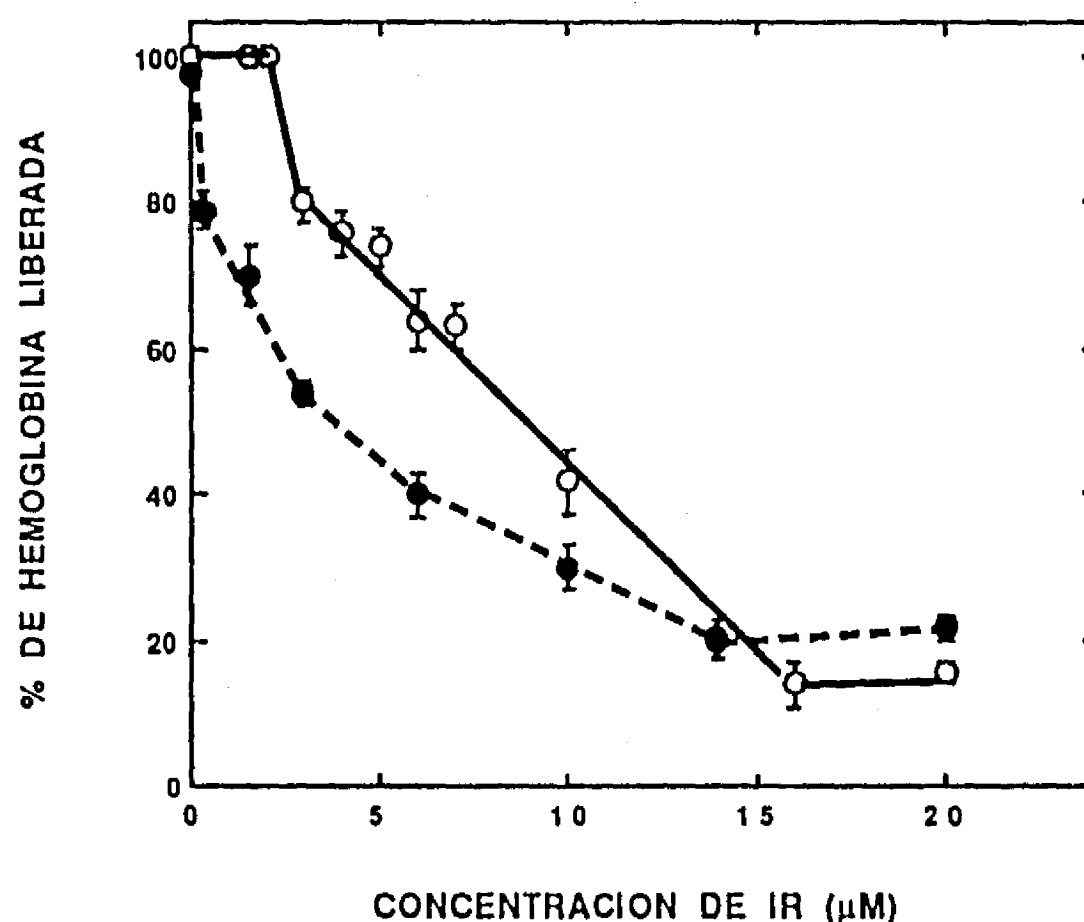


Figura 20. Efecto del inhibidor de Rosenthal en la liberación de hemoglobina producida por la fosfolipasa II.2 y de la fosfolipasa de *C. basiliscus*. Determinamos el porcentaje de hemoglobina liberada por  $110 \text{ ng}$  ( $DI_{75}$ ) de la fosfolipasa II.2 ( $\circ$ ) ó con la misma cantidad protéica de la fosfolipasa purificada de *Crotalus basiliscus* (preincubada con fosfatidilcolina por 10 min) ( $\bullet$ ), estas mezclas fueron preincubadas con diferentes concentraciones de IR durante 1 hr. Cada símbolo corresponde al promedio y desviación estándar de seis determinaciones en dos experimentos independientes.

5.C. La actividad hemolítica de la fosfolipasa II.2 es inhibida sólo por altas concentraciones de seroalbumina bovina.

La seroalbumina bovina deslipidizada produce una fuerte inhibición ( $DI_{50}$   $80 \text{ ng}$ ) sobre la fosfolipasa de *C. basiliscus* a  $115 \text{ ng}$ , como se observa en la Figura 21. La actividad hemolítica de la fosfolipasa II.2 fué mucho menos sensible a la presencia de la seroalbumina bovina. En este caso, se requirió de  $9.5 \mu\text{g}$  para alcanzar una inhibición del 50 % (ver Figura 21). Estos resultados apoyan

fuertemente que la actividad hemolítica de la fosfolipasa II.2 es en forma directa, ya que la actividad indirecta se disminuye profundamente con la presencia de la seroalbumina bovina.

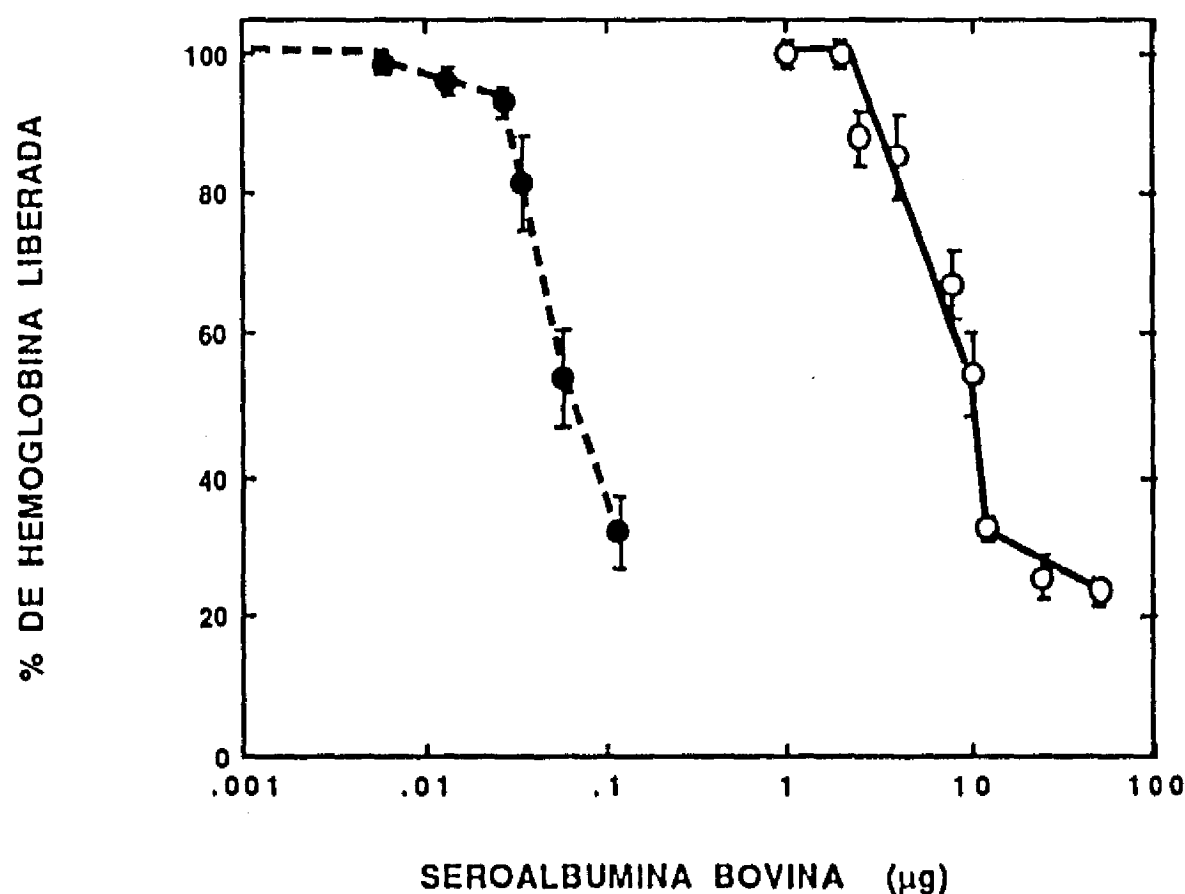


Figura 21. Efecto de la seroalbuminabovina en la liberación de hemoglobina producida por la fosfolipasa II.2 y la fosfolipasa de *C. basiliscus*. Se procedió en forma similar a lo descrito en la Figura 20. Cada símbolo corresponde al promedio y desviación estándar de seis determinaciones en dos experimentos independientes, (●) fosfolipasa de *C. basiliscus* y (○) de la fosfolipasa II.2.

## 6. CITOLISIS.

Determinamos el efecto de la fosfolipasa II.2 sobre las células CHO, cuya sensibilidad a las actividades citopáticas de extractos amibianos ya han sido claramente demostrados (40,41,43,48). Utilizamos el método citolítico descrito por Vargas-Villarreal J. y col. (56).

### 6.A. La fosfolipasa II.2 tiene actividad citolítica que es dependiente tanto del tiempo de incubación como de la dosis.

La fosfolipasa II.2 incrementó el porcentaje de citólisis en función al tiempo de incubación; se alcanzó casi el 100 % a las 6 hrs de incubación (Figura 22). Esto fué en cultivos celulares (CHO) premarcados con [<sup>3</sup>H]-UTP y 1.16 µg de dicha fosfolipasa. La fosfolipasa pura de *C. basiliscus* a una misma concentración en masa, no presentó actividad lítica sobre estas células; con la presencia de fosfatidilcolina esta enzima presentó actividad citolítica con un período de lag de 3 hrs y solo alcanzó un 35 % de citólisis. La fosfolipasa ó la fosfatidilcolina; por sí mismas, no presentaron actividad citolítica

sobre las células CHO como se puede ver en la Figura 22. También encontramos que la fosfolipasa II.2 incrementó el porcentaje de citólisis proporcionalmente con su dosis incubada por 5 hrs, como se observa en la Figura 23. La  $DC_{50}$  correspondió a 720 ng.

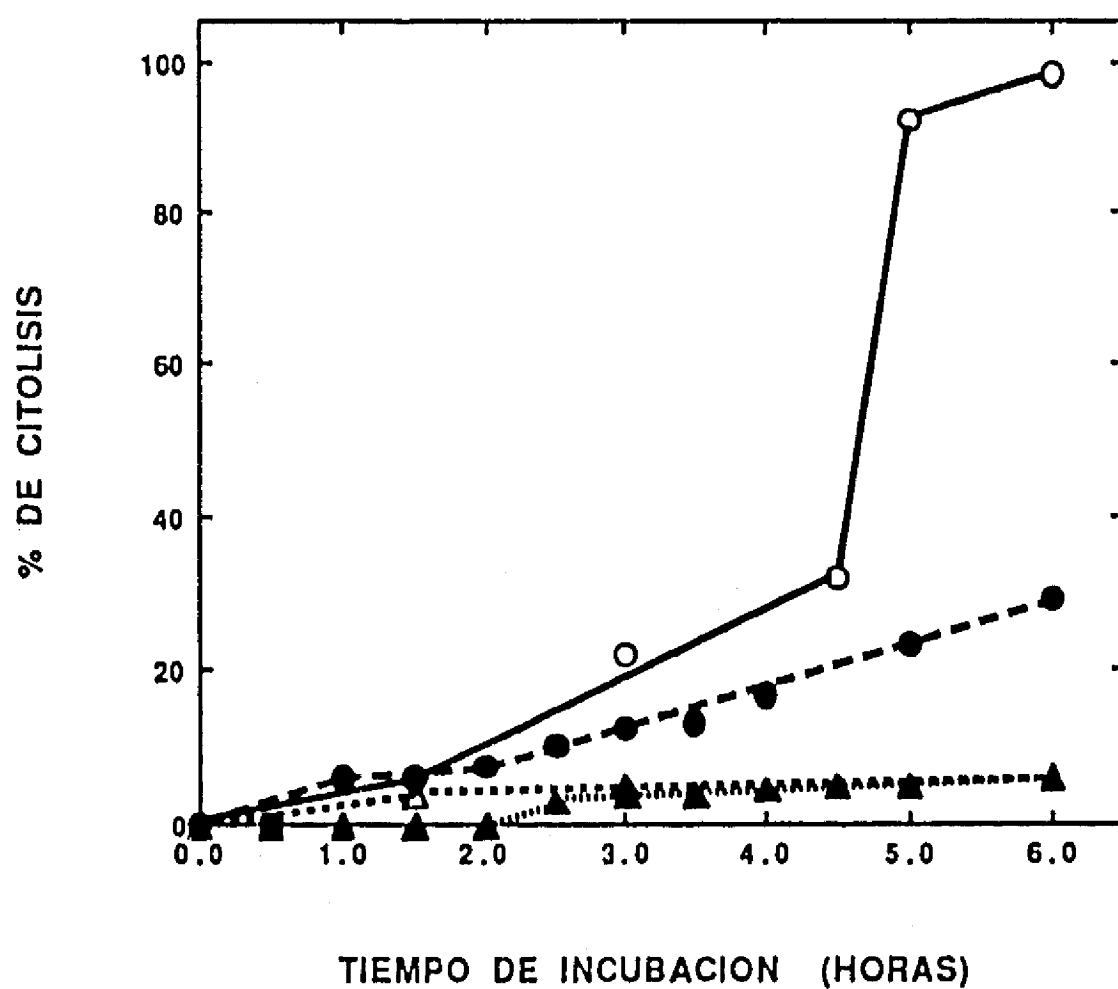


Figura 22. Relación temporal de la citólisis producida por la fosfolipasa II.2. A tiempos variables de incubación determinamos el porcentaje de citólisis en mezclas de ensayo con monocapas celulares confluentes premarcadas con  $[^3H]UTP$  por 2 hrs y 1.16  $\mu g$  de la fosfolipasa II.2 (O), la misma cantidad en masa de la fosfolipasa purificada de *Crotalus basiliscus* preincubada con fosfatidilcolina (●), sólo la fosfolipasa ( $\Delta$ ) ó sólo fosfatidilcolina ( $\blacktriangle$ ), suspendidos en 100  $\mu l$  de SSB. La liberación de  $[^3H]UTP$  la medimos como se describe en métodos. Los símbolos corresponden a un sólo experimento.

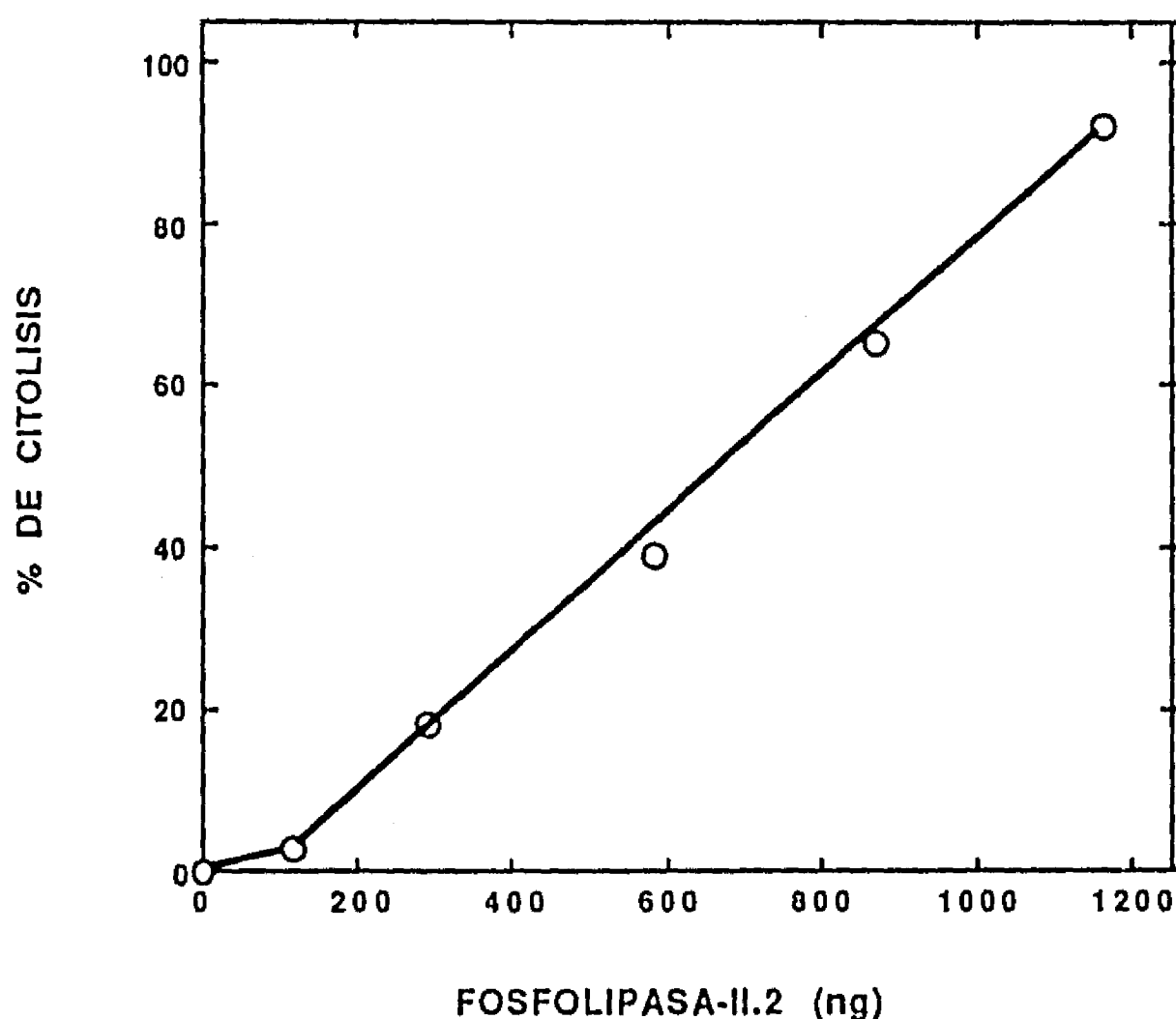


Figura 23. Relación entre la cantidad de proteína de la fosfolipasa II.2 y el porcentaje de citólisis. Después de 5 hrs de incubación a 37 °C determinamos el porcentaje de citólisis en mezclas de ensayo con monocapas de células premarcadas con [<sup>3</sup>H]UTP y cantidades variables de la fosfolipasa II.2 suspendidas en 100 µl de SSB. Cada símbolo corresponde a un sólo experimento.

#### 6.B. Cambios morfológicos producidos en los cultivos celulares incubados con la fosfolipasa II.2.

La liberación del [<sup>3</sup>H]-UTP por las células CHO incubadas con 1.16 µg de la fosfolipasa II.2 coincidió temporalmente con alteraciones morfológicas, donde las células sufrieron los siguientes cambios que están registradas en la Figura 24. En el panel A, se encuentra el daño producido por la fosfolipasa II.2 (1.16 µg de proteína total) por 6 hrs, observándose que las células sufrieron los siguientes cambios: 1) células incubadas por seis horas con SSB, como cultivos testigos, 2) a una hora y media, las células sufrieron un incremento de su diámetro de dos a tres veces su tamaño original, 3) a las tres horas, aumentó el número y tamaño de sus vacuolas y la aparición de protusiones membranales, 4 y 5) a las cuatro horas y media aumentó el número y tamaño de las protusiones membranales, 6) la monocapa celular disminuyó considerablemente a las seis horas de incubación. En el panel B, se encuentra el daño producido por la fosfolipasa purificada de *C. basiliscus* (1.16 µg de proteína total), preincubada con fosfatidilcolina por 15 min a 37 °C: 1) células incubadas por seis horas con SSB, como cultivo testigo, 2) a las tres horas de incubación, en algunas células empieza a aparecer un incremento del diámetro celular y a las cuatro horas y media aparecen las protusiones



celulares de una forma similar a las de la fosfolipasa II.2, 3) a las seis horas las células incrementan las protusiones en sus membranas plasmáticas. Cuando usamos como agentes líticos a la fosfolipasa pura de *C. basiliscus* ó la fosfatidilcolina, no observamos ninguna alteración morfológica en las células (resultados no mostrados), lo que coincidió con los resultados encontrados con las células premarcadas con [ $^3\text{H}$ ]UTP (ver sección 6A).

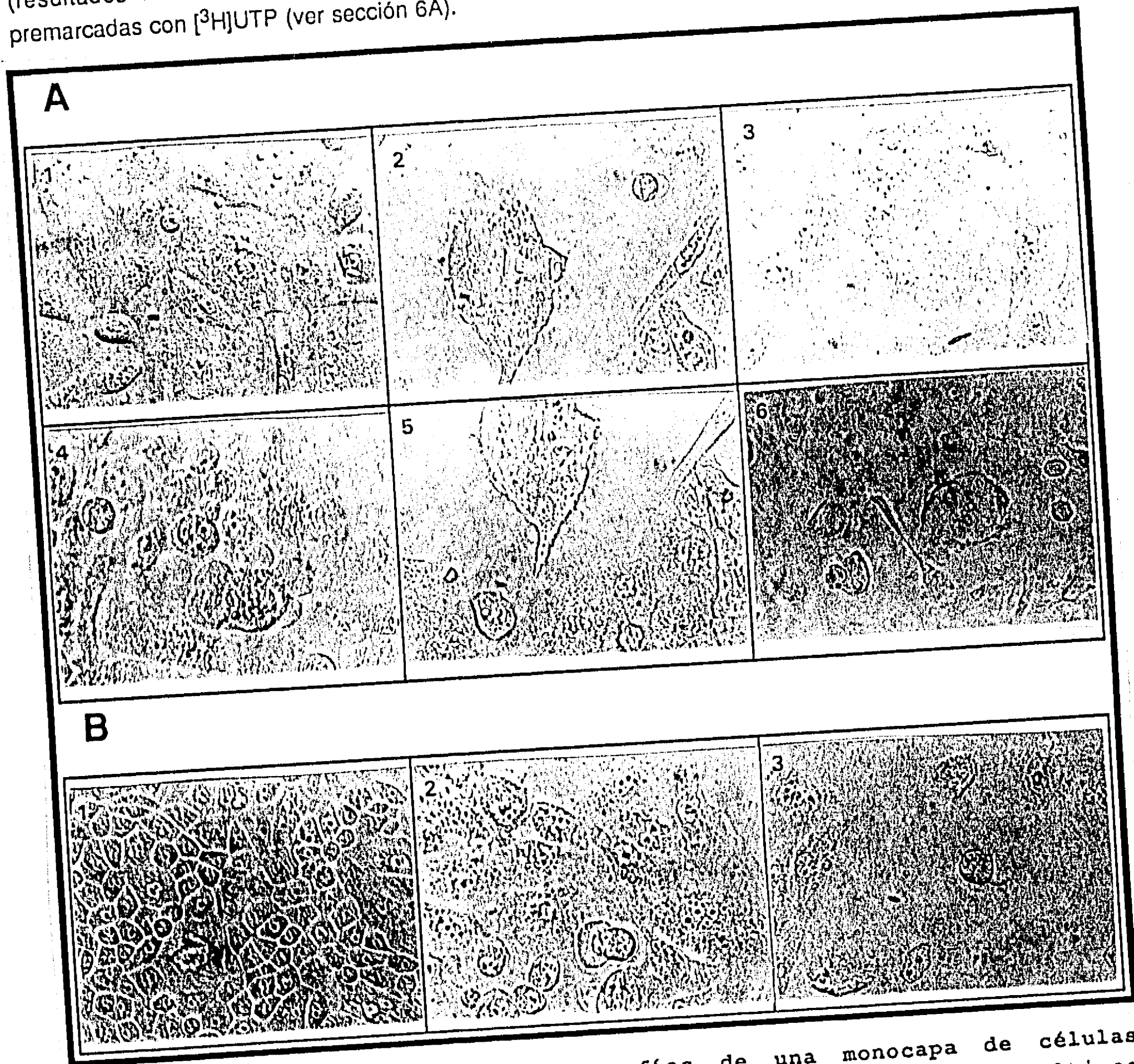


Figura 24. Secuencia de fotomicrografías de una monocapa de células CHO en presencia de la fosfolipasa II.2 durante 6 hrs. A) Cultivos testigos de células CHO incubadas con SSB. B) Cultivos celulares incubados con 1.16  $\mu\text{g}$ /pozo de la fosfolipasa II.2, por 6 hrs a 37 °C. Se tomaron las fotomicrografías con un fotomicroscopio de luz visible, con una amplificación de 256 diámetros.

## 7. Fraccionamiento y Caracterización parcial de otras fosfolipasas presentes en la interfase proteica obtenida con KCl y Tritón X-100.

Con la intención de fraccionar y caracterizar al mayor número posible de fosfolipasas amibianas, aparte de la fosfolipasa A<sub>2</sub> ya descrita, decidimos emplear la fracción solubilizada en presencia tanto de 1 M KCl y 0.5 % de Tritón X-100. Esta condición como fué mostrado anteriormente (Figura 10, Sección 3), es aquella en la que se logra la mayor solubilización de actividad fosfolipásica a partir de la interfase proteica.

### 7.A. La fracción obtenida con KCl-Tritón X-100 presenta 8 actividades fosfolipásicas separables por cromatoenfoque.

La fracción solubilizada con KCl-Tritón X-100 fué diluída 10 veces en un amortiguador de Tris-HCl 100 mM pH 9.4 y se aplicó a la columna de cromatoenfoque. Las proteínas fueron eluídas con un gradiente lineal de pH de 9.4 a 4.0, en presencia de Tritón X-100 al 0.05 %; a las fracciones se les midió su A<sub>280</sub>, así como su actividad fosfolipásica (Figura 25). Como puede observarse, se resolvieron 8 fracciones con actividad enzimática tipo A (A<sub>1</sub> y/o A<sub>2</sub>), la primera sale en el cargado de la columna, la segunda se eluye entre un pH de 8.2 y 8.1, la tercera eluye a pH de 8.0 y 7.3 (que se asemeja a la fracción II), la cuarta, quinta, sexta y séptima se eluyen en un pH entre 7.2-6.4, 6.4-5.5, 5.5-4.8 y de 4.8-4.0, respectivamente, y la última con el tratamiento de alta fuerza iónica. Resultados semejantes fueron encontrados en cromatografías de 2 preparaciones distintas. Las fracciones I y VIII dieron patrones electroforéticos aún muy complejos, por lo que ya no se siguieron caracterizando.

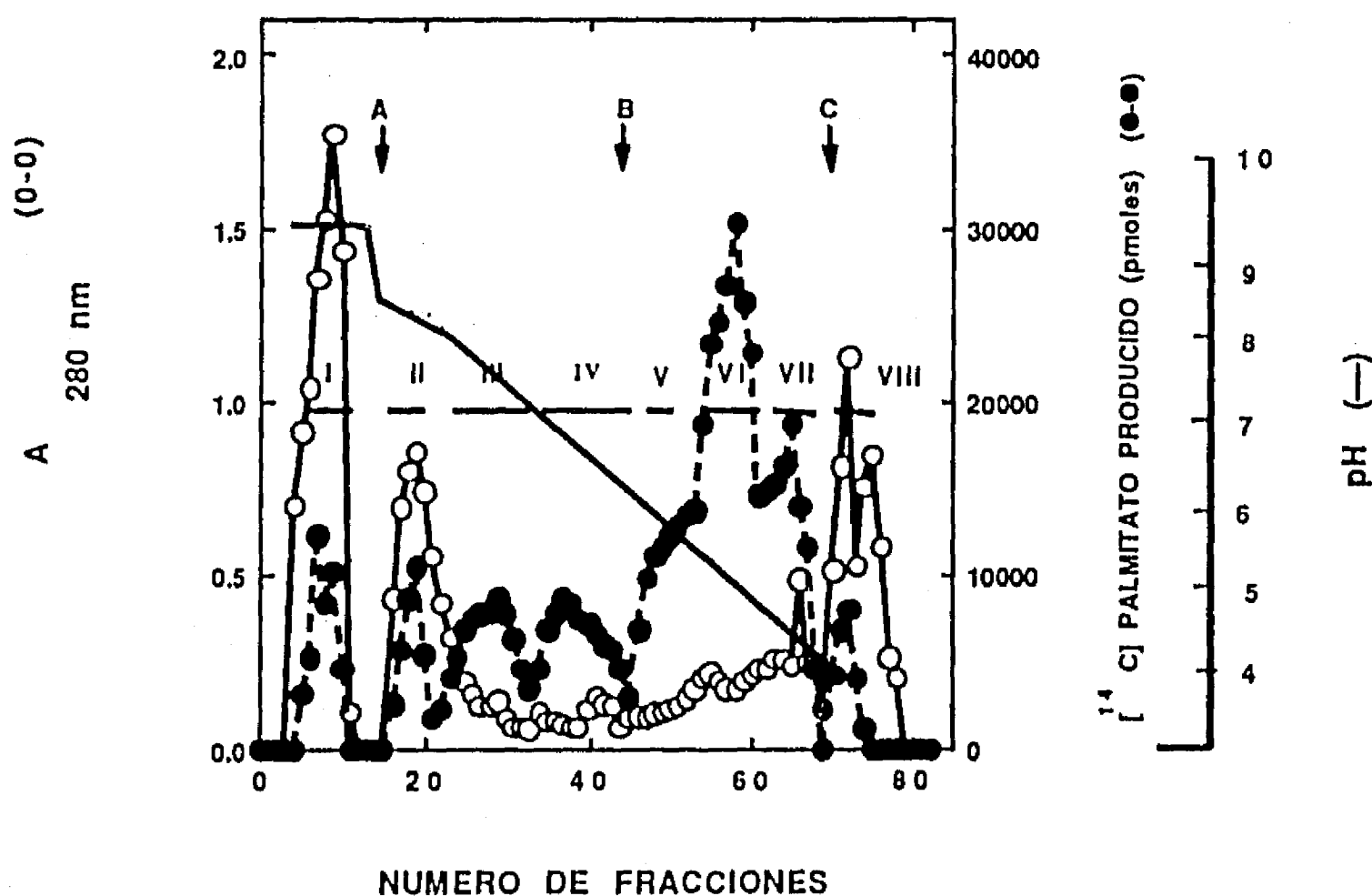


Figura 25. Cromatoenfoque de la fracción obtenida con KCl 1.0 M y

25, con la presencia de 2 mM de EDTA ó 2 mM de calcio cuando en las mezclas de ensayo usamos como sustrato  $[^{14}\text{C}]\text{FC}(2)$  y 10  $\mu\text{l}$  de las fracciones del cromatofoco. Determinamos la radioactividad correspondiente a  $[^{14}\text{C}]\text{AGL}$  después de separar los productos mediante cromatografía en placa fina, ver métodos.

### 8.B. Las fracciones presentan actividad fosfolipásica del tipo $A_2$ y $A_1$ .

Las fracciones II, V, VI y VII contienen actividad fosfolipásica del tipo  $A_2$  (que es mayoritaria en todos los casos) y actividad del tipo  $A_1$  (Figura 27), ya que encontramos un incremento tanto en las manchas correspondientes a  $[^{14}\text{C}]\text{AGL}$  y  $[^{14}\text{C}]\text{LFC}$ , cuando usamos el sustrato  $[^{14}\text{C}]\text{FC}(1)$ . En tanto las fracciones III y IV presentan actividades fosfolipásicas del tipo  $A_2$  solamente, ya que sólo encontramos radioactividad presente en las manchas cromatográficas correspondientes a  $[^{14}\text{C}]\text{AGL}$  cuando usamos como sustrato  $[^{14}\text{C}]\text{FC}(1)$  (ver Figura 27). En ninguna de las fracciones analizadas encontramos una hidrólisis importante cuando usamos como sustrato a  $[^{14}\text{C}]\text{LFC}$ , para detectar actividad de lisofosfolipasa.

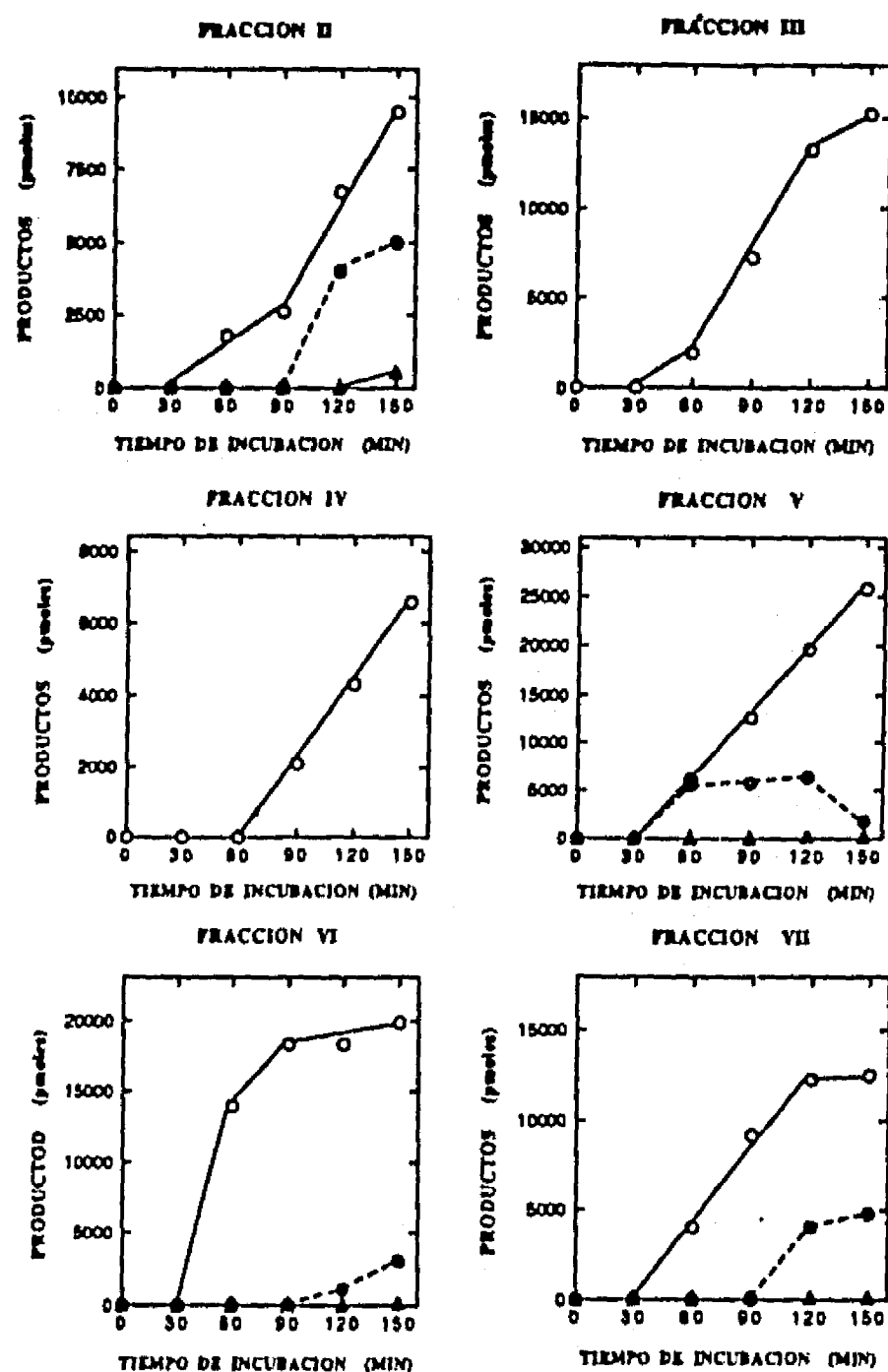


Figura 27. Identificación del tipo de fosfolipasa presente en las

fracciones II-VII. Determinamos a tiempos variables de incubación a 37 °C las actividades fosfolipásicas y de lisofosfolipasas presentes en la fracción II al VII. Se ensayaron 600 ng de las fracciones II, IV y V, 660 ng de las III y VII, y 1,900 ng de la VI, en un volumen de reacción de 20  $\mu$ l (ver métodos). Se indican los productos de hidrólisis, [ $^{14}$ C]AGL (○) y [ $^{14}$ C]LFC (●), cuando se empleó el fosfolípido marcado sólo en el acilo de la posición 2, [ $^{14}$ C]FC(1). Los (▲) representan los [ $^{14}$ C]AGL, liberados a partir del lisofosfatidilcolina ([ $^{14}$ C]LFC) como sustrato.

**8.C. La actividad fosfolipásica de las fracciones III, IV, V y VI puede aún resolverse en dos componentes a través de la cromatografía de afinidad.**

Las fracciones obtenidas del cromatoenfoco (ver Figura 25), se cromatografiaron en la columna de afinidad (IR), a cada fracción se les añadió Tris/HCl y CaCl<sub>2</sub> a fin de ajustar las concentraciones a 100 y 2.5 mM, respectivamente y el pH a 8.0. En estas condiciones cada fracción fué cargada en una columna de IR-sefarosa 4B y eluidas en las condiciones indicadas en la Figura 28. Encontramos que tanto las fracciones III, IV, V y VI pueden aún resolverse en dos componentes con actividad fosfolipásica. El primer componente se eluye en el cargado y no presentó especificidad sobre el IR, aún cuando fueron recromatografiadas en la misma columna y bajo las mismas condiciones, lo que nos indicó que no fué problemas de saturación del ligando presente en la columna empleada. El segundo componente que sí se pega al ligando (IR) se eluye en el caso de las fracciones III y IV con EDTA y en los casos de las fracciones V y VI, con un cambio de pH (ver Figura 28). Estos resultados nos sugieren que estas fracciones presentan cuando menos dos actividades fosfolipásicas con afinidades diferentes al ligando en la resina de afinidad. También encontramos que las fracciones II y VII sólo presentaron un pico de actividad fosfolipásica que sí se pega a la columna y ambas son eluidas con EDTA (Figura 28). Estas fracciones en gel de electroforesis de poliacrilamida con SDS, observamos varias bandas protéicas, confirmando la no homogeneidad de estas fracciones.

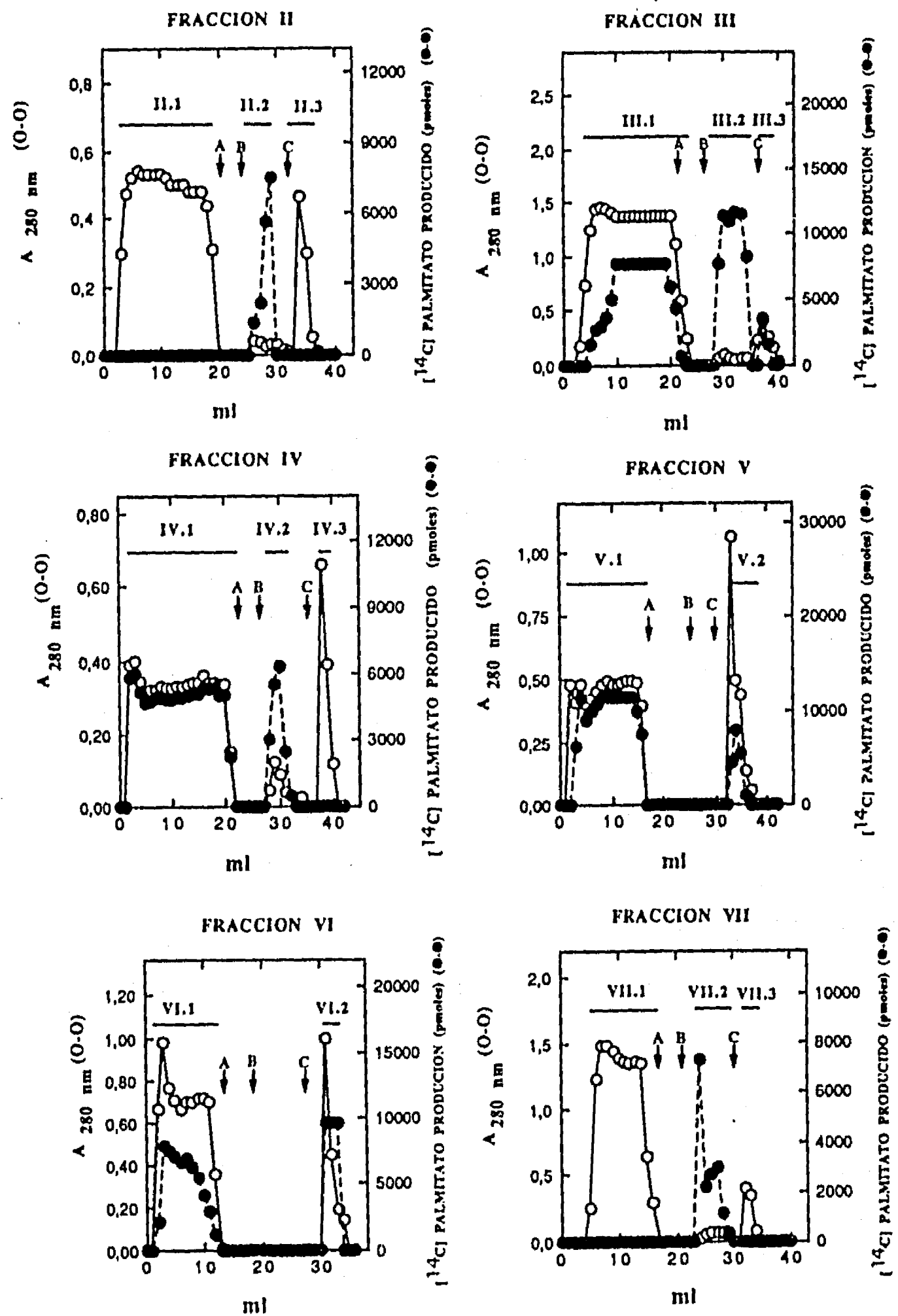


Figura 28. Cromatografía de afinidad-IR de las fracciones II-VII. Cada

gráfica corresponde a las fracciones del cromatoenfoco indicadas (ver Figura 25). Aplicamos cada muestra en una columna de afinidad-IR (0.44 X 5.4 cm) con 0.8 ml de resina, previamente equilibrada con un amortiguador inicial de Tris-HCl 100 mM y eluimos cada columna con: A) el mismo amortiguador conteniendo 0.5 M de NaCl, B) Tris-HCl 100 mM, conteniendo 50 mM de EDTA y C) 0.1 M de ác. acético. Colectamos las muestras de cada columna en fracciones de 1 ml/tubo. La actividad de fosfolipasa la medimos por radioensayo como se describe en métodos y la proteína fué seguida por A<sub>280</sub>. Las fracciones obtenidas con ácido acético las recibimos en tubos que contenían 1 ml de Tris-HCl 1 M.

**9. La fracción II (KCl) y la III (KCl y Tritón X-100) equivalen a la misma forma de fosfolipasa A<sub>2</sub>, aparentemente.**

La fracción II proveniente del extracto de P30 con 1 M de KCl (Figura 11, Sección 4-A) y la fracción III del extracto con 1 M de KCl y 0.5 % de Tritón X-100 (Figura 25, Sección 7-A) comparten las siguientes propiedades; que sugieren son equivalentes: i) eluyen entre pH 8.1 y 7.3 en la columna del cromatoenfoco (Figuras. 11 y 25). ii) sólo presentan actividad de fosfolipasa del tipo A<sub>2</sub> (Figura 16 y Figura 27). iii) su pH óptimo aparente es de 8.0 (Figura 17) iv) la actividad enzimática de ambas fracciones es inhibida por EDTA (Figura 26). Sin embargo, la actividad citotóxica y hemolítica de la fosfolipasa de la fracción III del extracto con KCl y Tritón X-100, aún no ha sido determinada.

Estas propiedades se resumen en la Tabla II, donde se incluyen los resultados para los demás fracciones.

TABLA II

CARACTERISTICAS DE LAS DISTINTAS FRACCIONES  
CON ACTIVIDAD DE FOSFOLIPASA DE

*E. histolytica*

Fracciones del cromatograma	pH de elución a pH 8.0	Tipo de actividad determinado	Inhibición por EDTA	No. de actividades separables por IR-Sefarosa
I	9.4	N.R.*	N.R.	N.R.
II	8.2-8.1	A (A1 y A2)	Estimulación	1
III	8.0-7.3	A2	+++	2-3
IV	7.2-6.4	A2	+++	2
V	6.4-5.5	A (A1 y A2)	-	2
VI	5.5-4.8	A (A1 y A2)	+	2
VII	4.8-4.0	A (A1 y A2)	+	1
VIII	NaCl	N.R.	N.R.	N.R.
IIKCl	8.1-7.3	A2	+++	2-3

\*N.R: No realizado

## V. DISCUSION

La virulencia de los microorganismos, incluyendo la de los protozoarios es un fenómeno muy complejo que depende de dos propiedades generales: invasividad y toxigenicidad (62). La virulencia de *Entamoeba histolytica* -cuyos mecanismos patogénicos se desconocen en gran parte-, parece depender fundamentalmente de su invasividad ya que su efecto destructivo se lleva a cabo por su gran capacidad para proliferar y destruir los tejidos del huésped (40,42,48,52,63,64). En los últimos años se ha propuesto las siguientes cinco etapas como constituyentes probables en una parte importante de los mecanismos patogénicos de las amibas, y que pueden analizarse cuantitativamente *in vitro*, estas son: quimiotaxis (40,65), adhesión a las células blanco (40,63,66), citólisis por contacto (40,43,56,63,65,67), fagocitosis (40,63,65,66,67) y degradación intracelular (40,63,65,67,68).

En nuestro grupo estamos interesados en estudiar los posibles factores involucrados en la citólisis por contacto de estos parásitos, sobre las células blanco. Desde hace algunos años se ha propuesto que la presencia de actividades biológicas asociadas a membranas o liberadas al medio de cultivo, podrían estar involucradas en los mecanismos líticos usados por este parásito; tales son: lectinas (69,70), colagenasa (71,), proteínas formadoras de poro (amibaporo) (44,45), tiol-proteasas (46,47), hemolisinas y citolisinas (40,42,43,48,50,51,52,56,63). En estos últimos dos mecanismos líticos se ha propuesto que una o varias fosfolipasas del tipo A<sub>2</sub> están relacionadas con estas actividades patogénicas de *Entamoeba histolytica* y que ésta(s) podría(n) ser un posible factor de virulencia del parásito (40,41,42,43,52,53,56).

En 1980 Saíd-Fernández y col. demostraron actividad hemolítica en homogenados de amibas, la mayor actividad se localizó en una fracción subcelular llamada "P30". Esta fracción (P30) es vesicular, es decir, está compuesta por vesículas selladas -analizadas por microscopia electrónica (50) de membrana celular, así como de las vesículas digestivas y lisosomales propias de los trofozoítos (50). Anteriormente, habíamos ya encontrado que el grueso de la actividad fosfolipásica (53), así como la actividad hemolítica y citolítica se localizaban en dicha fracción (50,52,56), la cual es cuatro veces mayor que en los extractos totales amibianos (50). Por estas razones, decidimos emplear la fracción P30 como punto de partida para la caracterización y purificación de las actividades fosfolipásicas ya que la determinación de actividades biológicas en las preparaciones libres de células y su caracterización general en extractos crudos son un prerrequisito para intentar la purificación de los factores responsables. Esta fracción P30 es máxima en presencia de calcio (1 mM) y a pH 8.0, y además su potencia basal se incrementa hasta 100 veces después de 36 hrs de incubación a 37 °C (50). El efecto hemolítico se debe en realidad a dos componentes: uno termoestable y el otro termolábil (52). El primero está constituido por ácidos grasos libres; posiblemente generados por una fosfolipasa A, la cual podría ser el factor hemolítico termolábil (52).

Después encontramos que la fracción P30 proveniente de extractos de trofozoítos cultivados axénicamente de *E. histolytica* (HK9), tienen dos tipos de actividad fosfolipásica, una A<sub>1</sub> y otra A<sub>2</sub>, además de una lisofosfolipasa. La actividad se debe al efecto de dos tipos de fosfolipasa: una cuya actividad máxima se detecta a pH 3.5 y no requiere calcio y la otra que sí requiere calcio y cuya actividad máxima es a pH 8.0 (53). Varios de nuestros hallazgos fueron confirmados por Ravdin y col. (41,42), donde demuestran dos tipos de fosfolipasas presentes en *E. histolytica*, una soluble e independiente



de calcio con un pH óptimo ácido y la otra asociada a la membrana plasmática, dependiente de calcio con un pH óptimo alcalino. También probaron varios inhibidores de fosfolipasas del tipo A, y estos disminuyeron la acción citolítica de trofozoítos y extractos de *E. histolytica* (42) sobre células CHO. Sin embargo, sólo uno de los inhibidores que emplearon el de Rosenthal (IR), puede considerarse como específico para fosfolipasas; los otros (quinacrina, fosfatidilcolina e hidrocortisona) pueden tener además otros niveles de acción como la alcalinización de lisosomas o la estabilización de membranas. Además en el caso del IR (42) fué utilizado en una sola concentración (10 mM) la que es muy alta para considerar que su efecto sólo sea a nivel de estas enzimas.

Obtuvimos la fracción P30 de los extractos totales (Figura 3) de los trofozoítos, mediante la homogeneización mecánica para preservar, en lo posible, la compartimentalización subcelular: otros investigadores rutinariamente homogenizan los trofozoítos mediante la sonicación ó ciclos repetidos de congelación-descongelación, con lo que posiblemente se desnaturalizan algunas enzimas. Ello explicaría la falta de éxito en múltiples intentos para detectar algunas actividades en los extractos amibianos (73,74). Evitamos el uso de suero, de medios indefinidos o de cualquier componente en las mezclas de ensayo que pudieran interferir con la actividad lítica de P30 ó la actividad fosfolipásica.

Elegimos a la cepa HK9 de *E. histolytica* para desarrollar este trabajo por ser una de las cepas que produce mayor rendimiento en los cultivos (57,75) y porque en ella se detectaron y cuantificaron las actividades de hemólisis (50,52,75), citólisis (48,56,) y actividad fosfolipásica amibianas (42,53). Seleccionamos como células blanco a los eritrocitos humanos por ser células susceptibles al efecto lítico de las fracciones amibianas y la composición y estructura de sus membranas son bien conocidos (2) y porque éstas células son muy abundantes y fáciles de obtener y manipular. Además utilizamos a las células de ovario de hamster chino, ya que estas son células nucleadas que pueden presentar una respuesta de reparación frente a un daño producido por algún agente lítico o inducir sistemas de defensa, y porque se conocen bien los efectos de las hemolisinas y citolisinas amibianas sobre los cultivos de estas líneas celulares (40,41,42,43,48,56,76).

De acuerdo con lo anterior, exploramos con mayor detalle el efecto de dos inhibidores específicos de fosfolipasas sobre la acción lítica de la fracción subcelular P30 y sus fosfolipasas sobre células de mamífero (eritrocitos humanos y células de la línea CHO), como punto de partida para la separación de las fosfolipasas de la fracción subcelular mencionada. Entre estas, seleccionamos una, cuyas características concuerdan con las de la fosfolipasa-hemolisina-citolisina propuesta por nuestro grupo (53) y el de Ravdin, una A<sub>2</sub>, dependiente de calcio, con actividad a pH 8.0, la cual purificamos a homogeneidad y caracterizamos, confirmando que esta enzima de un peso molecular de 15,000 Daltons, tienen una actividad hemolítica y citolítica directa; y por lo tanto puede tener un papel importante en el mecanismo patogénico de la amibiasis. A continuación discutimos los hallazgos más importantes de este trabajo.

En el estudio de la posible participación de las fosfolipasas en la virulencia de amibas, empleamos el efecto de dos inhibidores específicos de fosfolipasas del tipo A sobre la acción lítica de la fracción subcelular P30 sobre eritrocitos humanos. Los inhibidores que empleamos fueron dos análogos no hidrolizables de fosfatidilcolina: el PC\* (1-11-carboxiundecil-2-hexadecil-L-1-glicero-3-fosfatidilcolina) (26) y el IR (dimetil-dl-2,3-distearoilpropil-2'-hidroxietil-acetato de amonio) (49). En fases preliminares

del uso del PC\* en la actividad hemolítica de la fracción P30, encontramos que no fué un buen inhibidor en solución para las fosfolipasas amibianas, lo que nos sugirió que posiblemente tampoco lo era como ligando en una columna de afinidad, esto lo comprobamos más adelante al acoplar este inhibidor a sefarosa 4B y no encontrar una afinidad al ligando, de algunas fosfolipasas solubilizadas de la fracción P30. En vista de ello decidimos analizar al otro candidato el inhibidor de Rosenthal (IR).

La participación del IR en la hemólisis, la determinamos en la liberación basal de hemoglobina inducida por éste inhibidor, encontramos que con 150  $\mu\text{M}$  la hemoglobina liberada fué del 26 % después de 7 hrs de incubación (Figura 4), lapso de tiempo suficiente para observar el efecto hemolítico de casi cualquier agente lítico, así como las fracciones amibianas y fosfolipásicas.

Analizamos después en el modelo experimental de hemólisis la participación de las fosfolipasas de P30 amibianas. Obtuvimos el 100 % de hemólisis a las 7 hrs con P30 sin preincubar, lo cual es congruente con los datos obtenidos anteriormente que fué de 8.5 hrs con eritrocitos de rata (50). El tiempo tan prolongado de lisis por la P30 puede deberse a: a) que algunos factores hemolíticos amibianos se liberen en forma de proenzimas y se requiera este tiempo para su activación, b) que la hemólisis sea un proceso secuencial, es decir, que varios factores actúen en forma de cascada, hasta que se produzca la lisis, c) que los factores líticos se encuentren en baja concentración y requieran horas para alcanzar el máximo efecto hemolítico, d) que se requiera la acumulación de factores líticos como los ácidos grasos para la destrucción celular. Observamos que la  $\text{DH}_{50}$  correspondió a 110  $\mu\text{g}$  en 7 hrs de incubación a 37 °C y e) que las fosfolipasas están protegidas dentro de las vesículas de la fracción P30 y necesitan tiempo para ser liberadas (Figura 6). Con estos resultados pudimos confirmar lo esperado, que esta fracción sin incubación posee actividad hemolítica, cuantificable y reproducible, sobre los eritrocitos humanos, la cual fué dependiente tanto del tiempo de incubación como la dosis de extracto (Figuras. 5 y 6). Con respecto al tiempo de incubación encontramos que ésta actividad presenta un período lag de aproximadamente 5 hrs, en preparación preincubadas de P30, la hemólisis se inicia inmediatamente (50). La fase lag con preparaciones enriquecidas no se presenta y esto puede deberse a la contribución de hemolisinas de efecto más rápido (48) y posiblemente a los eritrocitos empleados en nuestros ensayos sean menos susceptibles al efecto hemolítico de la fracción P30, lo cual ya se conocen (51).

Con los resultados anteriores determinamos el efecto del IR sobre la actividad hemolítica de P30, este disminuyó fuertemente la liberación de hemoglobina, a una concentración de 20  $\mu\text{M}$  se alcanza una inhibición de aproximadamente 90% y no aumenta aún con mayores concentraciones del inhibidor (Figura 7). La  $\text{DH}_{50}$  fué de 10  $\mu\text{M}$ , lo que indica que la actividad del IR como inhibidor de las fosfolipasas A amibianas es buena. Estos resultados coinciden con lo ya reportados por McCaul y col, donde usando este mismo inhibidor *in vitro* puede inhibir el daño producido por trofozoítos íntegros y activos sobre células de mamífero (43).

Los datos presentados anteriormente, muestran que el IR es un potente inhibidor de la actividad hemolítica producida por las fosfolipasas de P30. El IR, de hecho, fué diseñado como un análogo de fosfatidilcolina para inhibir a la fosfolipasa A de la serpiente mocaín *Agkistrodon bilineatus* (49) y además de los estudios de J. Ravdin referidos anteriormente, también fué utilizado para inhibir la citotoxicidad mediada por fosfolipasas de mamíferos (40,41,42). De esta manera y en ausencia de datos que indiquen otro nivel de acción, los resultados de la inhibición por IR de la hemólisis inducida

por la fracción P30 sugieren, que una o más fosfolipasas A está involucrada en el mecanismo lítico ejercido por dicha fracción.

En base a los resultados con el IR, desarrollamos con éste un nuevo adsorbente para fosfolipasas del tipo A, y para la optimización de la columna de afinidad usamos venenos de animales que son ricos en fosfolipasas (1,3,4,5,6). Estos resultados están formalizados en el artículo "A NEW AFFINITY ADSORBENT FOR THE PURIFICATION OF PHOSPHOLIPASES A<sub>1</sub> AND A<sub>2</sub> FROM ANIMAL VENOMS, por VARGAS-VILLARREAL, J.; MARTIN-POLO, J.J.; REYNAUD, E. Y ALAGON-CANO, A; TOXICON (1991) Vol. 29: pp 119-124. Este artículo forma parte de la presente tesis y se adiciona una copia del mismo.

Empleamos a la fracción P30 para la caracterización y purificación de las actividades fosfolipásicas amibianas, ya que en ella reside más del 90 % de las actividades hemolíticas, citolíticas y fosfolipásicas (50,53,56); pero esta fracción (P30), es vesiculada (50). Por ello, decidimos incluir un paso de deslipidización de la fracción en base a que existen reportes de que los fosfolípidos endógenos interfieren con la unión de las fosfolipasas a ligandos específicos inmovilizados, ya sea secuestrado a las fosfolipasas en bicapas lipídicas ó bien, más frecuentemente, uniéndose al ligando por hidrofobicidad, disminuyendo así la cantidad del ligando disponible en la columna y una vez inmovilizado podría tener interacciones inespecíficas de proteínas no deseadas; la remoción de los lípidos resuelve estos problemas (77,78).

Probamos varios disolventes con diferentes propiedades en la deslipidización de P30. Encontramos que el éter etílico dió mejores resultados, en términos de la actividad fosfolipásica recuperada (Figura 8). Es de llamar la atención que otros disolventes, comúnmente utilizados para deslipidizar, e incluso para purificar parcialmente algunas proteínas membranales, como la acetona, etanol y cloroformo, destruyen casi en su totalidad la actividad fosfolipásica amibiana, lo que sugiere fuertemente que las fosfolipasas amibianas son muy hidrofóbicas y que sus estructuras terciarias se pierden con compuestos de constante dieléctrica más altas que las del éter etílico. Con este compuesto observamos que la suma de las actividades en el precipitado y en la fase acuosa es mayor que la encontrada en la fracción P30 intacta. Existen varias explicaciones a este hallazgo: a) que la accesibilidad del sustrato haya aumentado después de la deslipidización, b) que se haya removido un inhibidor con la extracción, y/o c) que haya ocurrido un proceso de activación.

Después probamos varias condiciones para solubilizar la actividad de fosfolipasa. Para ello empleamos dos métodos comunes para este propósito: a) alta fuerza iónica KCl 1M, ya que esta generalmente disminuye las interacciones electroestáticas entre las proteínas y los lípidos remanentes cargados (30,77,78) y b) varios detergentes con propiedades distintas (iónicos, no iónicos, zwitteriónicos y aniónicos) a 0.5 % (p/v); escogimos esta concentración, ya que es lo suficientemente alta para lograr la solubilización de las proteínas hidrofóbicas, y lo suficientemente baja para intentar después la separación del detergente (2,30,77,78). Encontramos que la solubilidad de la actividad fosfolipásica, fué de 26 % con KCl y 27 % con Tritón X-100, cuando fueron utilizados de forma independiente (Figura 9). La poca solubilización obtenida con los otros detergentes usados, se puede deber: a) que éstos se peguen directamente al sitio activo de la enzima, como ha sucedido con otras proteínas (4,77,78) ó b) que desnaturalicen fuertemente a las proteínas (4,77,78). Con la intención de solubilizar mayoritariamente la actividad fosfolipásica de la fracción protéica deslipidizada, intentamos

solubilizar ésta con KCl 1 M y los detergentes que habían dado mejores resultados en el experimento anterior. Encontramos que la combinación de 0.5 % Tritón X-100/KCl 1M (Figura 10), solubilizó un 85 % de la actividad fosfolipásica asociada a la fracción membranal.

Decidimos iniciar la purificación de las fosfolipasas amibianas utilizando la preparación de KCl 1 M, ya que presentaba actividad fosfolipásica soluble en ausencia de detergentes. Los detergentes interfieren fuertemente con los ensayos de hemólisis y citotoxicidad; la interferencia puede ser de dos maneras: produciendo *per se* lesiones en las membranas de las células blanco y/o potenciando dichas actividades e interfiriendo, como en el caso del Tritón X-100, en la determinación de la concentración protéica en las muestras. La remoción de los detergentes, se basa en separar estos de las proteínas o substituirlos por otro detergente que sean dializables, generalmente empleando: filtración en gel, cromatografía de afinidad ó reconstitución con fosfolípidos de composición conocida.

Por otro lado las amibas presentan una fuerte actividad proteolítica, casi el 90 % de ella depende de sulfhidrilo proteasas (46,47). Por ello durante los experimentos de purificación se incluyó un inhibidor reversible para estas enzimas, el p-cloromercuribenzoato de sodio. El inhibidor se empleó en todos los pasos a una concentración de 0.1 mM; a esta concentración este no tiene acciones deletéras sobre la actividad fosfolipásica total de P30.

Los primeros intentos de purificación de la fosfolipasa solubilizada con KCl 1 M fueron hechos pasando la fracción directamente por una columna IR-sefarosa. En estas condiciones la mayor parte de la actividad se une a la resina y es eluída con EDTA. El análisis electroforético de la fracción con la actividad de fosfolipasa mostró varias bandas. En vista de lo anterior, decidimos incluir un paso previo de fraccionamiento, cromatofoco en columna, que separa proteínas de acuerdo a su punto isoeléctrico (79).

La proteínas eluídas en el cromatofoco de la fracción solubilizada con KCl 1 M, mostró 3 actividades fosfolipásicas, que las identificamos como I, la que no se pega a la columna, indicando que tiene un pI muy alto, II, que eluyó dentro del gradiente de pH (entre 8.0 y 7.3) y representó el 38 % de la actividad fosfolipásica total y III, que se eluye con alta fuerza iónica (Figura 11). Toda la actividad proteolítica, medida por la capacidad de degradar caseína se localizó en el rango de pH entre 9.0 a 8.5. La actividad proteolítica puede medirse ya que el inhibidor de tiol-proteasas, p-cloromercuribenzoato de sodio, es reversible en presencia de altas concentraciones de 2-mercaptoetanol (47). Es de hacer notar que estas proteasas son activas en presencia de altas concentraciones de 2-mercaptoetanol, es posible que la explicación de este hecho resida en que las amibas crecen en un medio con potencial de oxido-reducción muy elevado (68).

Una vez obtenida la fracción II mediante la técnica de cromatofoco, continuamos la purificación, esta vez utilizando una columna de IR-sefarosa. La actividad fosfolipásica se separó en tres componentes (II.1, II.2 y II.3) (Figura 12). Las fracciones II.1 y II.3, presentaron una actividad específica muy baja; se congelaron a -70 °C para su posterior caracterización. El patrón electroforético de la fracción II.2 iodinadas y la deteminación de su pureza reveló en geles de poliacrilamida de SDS en condiciones no reductoras dos bandas protéicas de aproximadamente 30,000 y 15,000 Daltons, en condiciones reductoras sólo aparece una banda protéica de aproximadamente 15,000 Daltons,

demostrando que la banda de 30,000 corresponde al dímero de la fosfolipasa (Figura 13). Este resultado determinado por nosotros no es congruente con lo reportado por el grupo de Ravdin y col. para las dos fosfolipasas amibianas, donde reportan un peso molecular de 38,000 Daltons, determinada por filtración en gel (80), ó que la fosfolipasa purificada por el grupo de Ravdin es distinta de la que nosotros reportamos en esta tesis.

Después observamos el comportamiento de la fosfolipasa homogénea de la fracción II.2, con las muestra iodinadas en geles de condiciones nativas de Tris-HCl (Figura 14). Encontramos también sólo una banda protéica. La determinación del punto isoeléctrico de la actividad fosfolipásica de la fracción II.2 nos reveló un punto isoeléctrico de 7.0 (Figura 15), lo cual este resultado no es congruente con lo reportado por el grupo de Ravdin y col. (80), el cual observa un punto isoeléctrico de 4.5 y 5.5 para cada fosfolipasa descrita por este grupo. Esto nos hace pensar que la fosfolipasa de la fracción II.2 es diferente a las ya mencionadas.

Después investigamos a que tipo de actividad fosfolipásica correspondía la actividad detectada en la fracción II.2. Elegimos como sustrato [ $^{14}\text{C}$ ]FC(1), marcado en el carbón 1 del ácido palmítico esterificado en la posición 2 del glicerol, considerando que sí después de la incubación con la fracción II.2 la radioactividad se localizaba en las manchas cromatográfica correspondiente a [ $^{14}\text{C}$ ]LFC, pero no en la de [ $^{14}\text{C}$ ]AGL, la enzima sería del tipo  $A_1$ . En el caso contrario ésta correspondería a una fosfolipasa del tipo  $A_2$ . Como sólo encontramos un incremento de radiactividad en las manchas correspondientes a [ $^{14}\text{C}$ ]AGL, aún cuando usamos el sustrato para determinar actividad de lisofosfolipasa ([ $^{14}\text{C}$ ]LFC) (Figura 16), deducimos que la fracción II.2 presenta sólo actividad fosfolipásica del tipo  $A_2$ , y desde este momento la llamaremos fosfolipasa II.2 por ser sólo una fosfolipasa y provenir de esta fracción II.2

La fosfolipasa II.2 disminuyó fuertemente su actividad con la presencia de 2.5 mM de EDTA y es activa con 2 mM de calcio (Figura 26), por lo que concluimos que la fosfolipasa es dependiente de este catión. Se ha reportado anteriormente que el calcio tiene un papel importante en la virulencia amibiana, en ausencia del catión la actividad citolítica de este parásito no se manifiesta (40,42,73). Entre las sustancias que disminuyeron la acción citopática *in vitro* de los trofozoítos de *Entamoeba histolytica* están: EDTA, TMB-8, un antagonista de calcio intracelular (81), y verapamil y bepridil, dos bloqueadores de canales de calcio (40). Además la fosfolipasa II.2 tuvo una actividad enzimática máxima a pH 8.0 (Figura 17), aunque conservó una actividad significativa entre 6.0 y 10.0, lo que coincide con el pH óptimo de muchas otras fosfolipasas  $A_2$  caracterizadas de otras fuentes (1,3,4,5,6).

Enseguida comprobamos que la fosfolipasa II.2 podría también, al igual que la P30 lisar eritrocitos humanos. Probamos esta hipótesis y encontramos que la fosfolipasa II.2 presenta actividad hemolítica cuantificable y reproducible, lo cual es dependiente tanto del tiempo de incubación como de la dosis (Figuras. 18 y 19). En relación al tiempo de incubación, encontramos que desde los 5 min de incubación hubo un 35 % de la liberación de la hemoglobina de los eritrocitos lisados, la cual se incrementó linealmente y llega al 100 % de hemólisis a 1 hr de incubación. Estos resultados indican: i) que la hemólisis comienza tan pronto como la hemolisina entra en contacto con las células blanco, ii) que no se presenta una fase lag, lo que contrasta con lo encontrado con la fracción P30 no preincubada que es de horas (ver Figura 5) y iii) que la hemolisina parece ser de acción directa, es

decir, no requiere de la presencia de factores líticos directos como AGL y LFC, para llevar a cabo la hemólisis. En cambio, con una hemolisina con acción lítica indirecta como es la fosfolipasa A<sub>2</sub> de *C. basiliscus*, se presenta el comportamiento esperado de la fase lag, en presencia del sustrato, y la ausencia de hemólisis si éste no está presente (Figura 18). Con respecto a la dosis hemolítica de la fosfolipasa II.2, encontramos un incremento de la liberación de hemoglobina proporcional entre 0 y 174 ng, lo que permitió calcular con precisión la DH<sub>50</sub> (64 ng). Con la fosfolipasa de *C. basiliscus* fué de 83 ng (Figura 19).

Después analizamos los efectos del IR (inhibidor no hidrolizable para fosfolipasas en general del tipo A) y de la BSA (antagonista que actúa secuestrando a los factores líticos directos, AGL y LFC) sobre la actividad hemolítica para corroborar la posible participación de la fosfolipasa II.2 ambiental y de la fosfolipasa pura de *C. basiliscus*. Encontramos con el IR, una inhibición de ambos factores hemolíticos, la DI<sub>50</sub> se alcanzó a una concentración de 9 µM para la fosfolipasa II.2 y 3.7 µM para la fosfolipasa de *C. basiliscus* (Figura 20). Con la BSA encontramos que produce una fuerte inhibición (DI<sub>50</sub> de 115 ng) sobre la fosfolipasa de *C. basiliscus*, en tanto que se requiere una concentración equivalente a dos órdenes de magnitud mayor de seroalbumina bovina para la fosfolipasa II.2 para lograr el mismo efecto; en este caso se requirió de 9.5 µg para alcanzar una inhibición del 50 % (ver Figura 21). Estos resultados sugieren fuertemente que la fosfolipasa ambiental contenida en la fracción II.2, es una citolisina que actúa directamente sobre las membranas de las células blanco, debido a su actividad enzimática. Concluimos esto por las siguientes razones: a) la hemólisis se inicia inmediatamente y por lo tanto no hay tiempo para que se acumulen AGL y FLD, los cuales son líticos *per se* (1,3,5,6), b) la seroalbumina bovina no protege a las células (secuestrando AGL y FLD) y c) la actividad hemolítica y citolítica producida por la fosfolipasa II.2 purificada, es inhibida con la presencia del IR. Estos resultados son sugerentes de la acción directa de la fosfolipasa para el efecto lítico directo de esta fracción II.2.

Más tarde, determinamos el efecto de la fosfolipasa II.2 sobre las células CHO, cuya sensibilidad a las actividades citopáticas de extractos ambientales ya han sido claramente demostrados (42,48,56,63,73,76,80,81). Encontramos que esta tiene actividad citopática, cuantificable y reproducible, sobre las células nucleadas de mamífero, la cual fué como en el caso de la hemólisis (ver Figuras 18 y 19), dependiente tanto del tiempo de incubación como de la dosis (Figuras 22 y 23). De ambas funciones, posiblemente la más relevante y útil es la dosis-respuesta, que correspondió a un incremento de las dpm con respecto a la cantidad de fosfolipasa, donde la DC<sub>50</sub> correspondió a 720 ng. Encontramos que sólo cuando preincubamos la fosfolipasa de *C. basiliscus* (que usamos como control positivo) con fosfatidilcolina por 15 min y generando agentes líticos directos, fué cuando presentó actividad citolítica (ver Figura 22)

Las imágenes fotográficas presentadas en este trabajo (Figura 24), nos permitieron observar que las lesiones producidas por la fosfolipasa II.2 en las células CHO ocurren secuencialmente, observándose a partir de la hora y media de incubación un aumento del volumen celular seguido por un aumento de tamaño y número de las vacuolas, aparición de protusiones membranales y disminución de la confluencia de la monocapa celular que se agudiza en las células a las seis horas de incubación. Con la fosfolipasa purificada de *C. basiliscus*, observamos un efecto similar que con la fosfolipasa II.2, pero en mayor tiempo y en presencia de fosfatidilcolina exógena. Los controles respectivos, es decir, sólo fosfatidilcolina y sólo fosfolípidos, las células no presentaron cambios

morfológicos aún a tiempos largos de incubación. Estos resultados cualitativos coincidieron con los cuantitativos (liberación de [ $^3\text{H}$ ]UTP; Fig. 22). El efecto cualitativo que observamos en el daño celular producido por la fosfolipasa II.2, coincide con los mismos efectos y nosotros diríamos que iguales con lo ya reportado con la fracción completa de P30, sobre estas mismas células (56).

Los resultados anteriores también nos sugieren que la fosfolipasa II.2 presenta acción lítica directa sobre las membranas exógenas, lo cual es raro en este tipo de enzimas (82); la mayoría de éstas presentan acción lítica indirecta, es decir, produciendo AGL y LFC (1,2,3,4), sólo aquellas que presentan un sitio de reconocimiento intersticial, que es una pequeña porción peptídica fuertemente hidrofóbica que puede anclar a estas enzimas en bicapas organizadas para su destrucción, son las que tienen la capacidad de producir lisis directa (22). Sugerimos que posiblemente la fosfolipasa II.2 pertenece a este último grupo.

Con la intención de fraccionar y caracterizar al mayor número posible de fosfolipasas amibianas, aparte de la fosfolipasa  $A_2$  ya descrita, decidimos emplear la fracción solubilizada en presencia tanto de 1 M KCl y 0.5 % de Tritón X-100 (Figura 10). Esta fracción fué cromatografiada en la columna de cromatoenfoco, encontramos que sólo 6 de ellas se separaron en forma aceptable dentro del gradiente de pH (Fig. 25). Tanto la fracción que no se pega al cromatoenfoco (I), como la que se eluye con alta fuerza iónica (VIII) (NaCl), dada su complejidad electroforética, fueron guardadas a  $-70^\circ\text{C}$  para su posterior caracterización. Los resultados del cromatoenfoco y los obtenidos con la columna de afinidad indican que la fracción P30, presenta cuando menos 8 actividades fosfolipásicas distintas. Este número elevado de fosfolipasas no es alto ya que se ha demostrado en otras especies la presencia de cuando menos dos fosfolipasas en la membrana plasmática (1,3,4), una del tipo  $A_2$  para el recambio de fosfolípidos y la producción de ácido araquidónico para la producción de prostanglandinas y otra como segundo mensajero (fosfolipasa del tipo C), cuando menos dos lisosomales del tipo  $A_1$ , dos en la membrana interna y externa de las mitocondrias.

Después definimos la dependencia de  $\text{Ca}^{++}$ ; encontramos que la actividad fosfolipásica de las fracciones III y IV son inhibidas fuertemente por la presencia de 2 mM de EDTA, en tanto las fracciones VI y VII fueron sólo parcialmente, la única actividad no inhibida por la presencia de este quelante fué la actividad fosfolipásica de la fracción V. Es de llamar la atención que la fracción II es estimulada por la presencia de EDTA, lo cual ya habíamos encontrado con la actividad de fosfolipasa de la fracción P30 (53). También se incluye la fracción II<sub>KCL</sub> para comparar (Figura 26). Enseguida determinamos el tipo de fosfolipasas ( $A_1$  o  $A_2$ ) de cada fracción, donde encontramos que las fracciones II, V, VI y VII contienen la presencia de una fosfolipasa del tipo  $A_2$  en forma mayoritaria y algo de actividad de  $A_1$  (ver Figura 27). En tanto las fracciones III y IV presentan sólo actividad fosfolipásica del tipo  $A_2$ . En ninguna de las fracciones analizadas encontramos una hidrólisis significativa, cuando usamos como substrato a [ $^{14}\text{C}$ ]LFC para detectar actividad de lisofosfolipasa.

Las fracciones fueron cromatografiadas en la columna de afinidad IR-sefaraosa 4B; encontramos que las fracciones III, IV, V y VI pueden aún resolverse en dos componentes con actividad fosfolipásica. El primero se eluye en el cargado y no presentó afinidad por el IR, aún cuando fueron recromatografiadas en la misma columna y bajo las mismas condiciones, lo que nos indicó que no fué

problema de saturación del ligando presente en la columna empleada. El segundo componente que sí se pega al ligando y se eluye, en el caso de las fracciones III y IV, con un quelante como es el EDTA, en los casos de las fracciones V y VI, con un cambio de pH utilizando ácido acético (ver Figura 28). Estos resultados nos sugieren que estas fracciones presentan cuando menos dos actividades fosfolipásicas diferentes, con diferentes afinidades a la resina con el IR. También encontramos que las fracciones II y VII sólo presentaron un pico de actividad fosfolipásica que sí se pega a la columna y ambas son eluidas con EDTA (Fig. 28). En geles de poliacríamida observamos que estas fracciones no estaban puras, es decir había varios componentes todavía en los carriles protéicos.

Aún no sabemos cuál es el papel que juegan todas las demás fosfolipasas identificadas en este trabajo. Algunas pudieran también estar involucradas en la acción citotóxica amibina y otras en el metabolismo normal de este protozoario. De hecho, no es posible descartar que la fosfolipasa II.2 también cumpla funciones convencionales en la célula amibiana. En forma abreviada, el resto de las fosfolipasas pueden ser descritas de la siguiente manera: la fracción II con actividad fosfolipásica del tipo A<sub>1</sub> con pI básico y dependiente de calcio, la IV con actividad A<sub>2</sub> con pH 8.0, dependiente de calcio, pero susceptible a las proteasas amibianas, la acídica V del tipo A<sub>1</sub> independiente de calcio, la VI acídica del tipo A<sub>1</sub> dependiente de calcio y la fracción VII del tipo A<sub>1</sub> acídica e independiente de calcio.

Las observaciones de los resultados anteriores sugieren cuando menos 8 fosfolipasas presentes en la fracción P30, separables en la columna de cromatoenfoco (Figura 25). Estas se reducen a 4 cuando las manipulaciones (obtención de la fracción P30, deslipidización, solubilización con Tritón y cromatoenfoco) se realizan en ausencia del inhibidor de proteasas, p-cloromercuribenzoato de sodio, las fracciones corresponden a III, IV, V y VI y sólo la actividad fosfolipásica de la fracción IV disminuyó dramáticamente en 48 h, aún cuando esta fracción se almacenó a -20 y -70 °C.

Durante la caracterización de la actividad hemolítica de P30, Saíd-Fernández y López-Revilla encontraron que su máximo efecto ocurría a pH 8.0 y con dependencia de Ca<sup>++</sup> (50,75,83). Es muy probable que exista una identidad entre la hemolisina termolábil, descubierta en trabajos previos (50,75,83) y la actividad fosfolipásica del tipo A<sub>2</sub> de la fracción II.2 ya que esta se manifiesta a pH 8.0, es dependiente de calcio y es resistente a proteasas amibianas.

Hasta ahora se han propuesto aisladamente varias moléculas citolíticas para los trofozoítos de *Entamoeba histolytica* y se han identificado, y aún purificado algunos factores que podrían actuar como tales para producir las lesiones en la amibiasis. Es muy probable que todas ellas, y aún más, participen en la destrucción tisular y por lo tanto la propiedad citolítica de *E. histolytica* sea un mecanismo multifactorial en que posiblemente está implicada la actividad fosfolipásica que aquí se ha estudiado. El conocimiento más profundo de esta actividad permitirá determinar de la contribución específica de ésta en los mecanismos citolíticos de *E. histolytica*.

### Perspectivas

Como objetivos siguientes nos proponemos obtener información de la secuencia peptídica de la fosfolipasa II.2 a fin de poder aislar su gen y caracterizarlo, así como conocer la distribución subcelular de la enzima y definir su contribución, si realmente la tiene, en los mecanismos moleculares citotóxicos de los trofozoítos de *Entamoeba histolytica*.



## REFERENCIAS

- 1.- Bosh, H.V.D. (1974). Phosphoglyceride metabolism. En: Snell, E.E., Boyer, P.D., Meister, A. y Richardson, Ch.C. (Eds.), Ann. Rev. Biochem. Vol. 43 pp. 243-277. Annual Reviews Inc. Palo Alto CA. USA.
- 2.- Lehninger, A.L. 1979. Bioquímica. pp: 307-312. Ed. Omega. S.A., Barcelona España.
- 3.- Van Den Bosch, H. (1980). Intracellular phospholipase A. Biochim. Biophys. Acta. 604: 191-246.
- 4.- Hawthorne, S.N., y Ansell, G.B. (1982). Phospholipids pp. 313-426. Edición Elsevier Biomedical Press Amsterdam, New York, Oxford.
- 5.- Rosenberg, P. (1976). Toxins. Animal, plant and microbial. En: 5th. International Simposium on Animal, Plant and Microbial Toxins. San José, Costa Rica, pp. 1-1134. P. Rosenberg (Ed.) Pergamon Press Ltd. Headigton Hill Hall.
- 6.- Wells, M. A. (1974). A phospholipase A<sub>2</sub> model system. Calcium enhancement of the amine-catalysed methanolysis of phosphatidilcholine. Biochim. 13: 2258-2264.
- 7.- Oda, N., Sakai, H., Snieh, T.Ch., Nakamura, H., Sakamoto, S., Kihara, H., Chang, Ch.Ch., y Ohno, M. (1987). Purification and characterization of phospholipase A<sub>2</sub> from *Trimeresurus granineus* venom. J. Biochem. 102: 1441-1449.
- 8.- Kramer, R., Jung, I.B., y Zahler, P. (1974). Some characteristics of a phospholipase A<sub>2</sub> from sheep red cell membranes. Biochim. Biophys. Acta 373: 404-415.
- 9.- Khimasa, M., Morooka, T. y Niimura, T. (1984). Purification and properties of a membrane-bound phospholipase B from baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). J. Biochem. 95: 137-145.
- 10.- Doi, O., Ohki, M., y Nojima, S. (1972). Two of phospholipase A and lysophospholipase in *Escherichia coli*. Biochim. Biophys. Acta. 260: 244-258.
- 11.- Takeuchi, Y., Okumura, T., Sugatani, J., y Saito, K. (1987). Molecular relationship between two types of phospholipase B from *Penicillium notatum* and reconstitution of active enzyme from its peptide fragments. Arch. Biophys. 252: 206-217.
- 12.- Sugatani, J., Okumura, T., Saito, K., Ikeda, K., y Hamaguchi, K. (1984). Studies on two types of phospholipase B from *Penicillium notatum*. J. Biochem. 95: 1407-1415.
13. Snyder, W.,R., (1987). A continuous spectrophotometric assay for the *Bacillus cereus* phospholipase C using a thiophosphate substrate analog: Evaluation of assay conditions and chromogenic agents. Analytical. Biochemical. 164: 199-206.

- 14.- Lowenstein, J.M. (Ed.) (1959). *Methods in Enzymology*, Vol. 14, pp. 131-221. Academic Press, New York, USA.
- 15.- Nishijima, M., Akanatsu, Y., y Nojima, S. (1974). Purification and properties of a membrane bound phospholipase A from *Mycobacterium phlei*. *J. Biol. Chem.* 249: 5658-5667.
- 16.- Wells, M.A. (1972). A kinetic study of the phospholipase A<sub>2</sub> (*Crotalus adamanteus*) catalized hydrolysis of 1,2, dibutyryl-sn-glicero-3-phosphorylcholine. *Biochemistry* 11: 1030-1041.
- 17.- Waite, W., y Sisson, P. (1971). Partial purification and characterization of the phospholipase A<sub>2</sub> from rat liver mitochondria. *Biochemistry* 10: 2377-2383.
- 18.- Gray, N.C.C. y Strickland, P. (1982). The purification and caracterization of phospholipase A<sub>2</sub> activity from the 106,000 on phosphatidilinositol. *Can. J. Biochem.* 60: 108-117.
- 19.- Chang, J., Musser, J.H., y McGregor, H. (1987). Phospholipase A<sub>2</sub>: Function and pharmacological regulation. *Bioch. Phar.* 36: 2429-2436.
- 20.- Shier, W.T. (1979). Activation of high levels of endogenous phospholipase A<sub>2</sub> in cultured cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 195-199.
- 21.- Vadas, P., Wasi, S., Mouat, H.Z., y Hay, J.B. (1981). Extracellular phospholipase A<sub>2</sub> mediates inflammatory hyperaemia. *Nature* 293: 583-585.
22. - Dijkstra, W.B., Drenth, J., Kalk, K.H., y Van Der Maelen, P.J. (1978). Three-dimensional structure and disulfide bound connections in bovine pancreatic phospholipase A<sub>2</sub>. *J. Mol. Biol.* 129:53-60
- 23.- Ormand, W.E., y Vankatesan, S. (1982). Similarities of lipid metabolism in mammalian and protozoan cells: An evolutionary hypothesis from the prevalence of ateroma. *Microbiol. Rev.* 46: 296-307.
- 24.- Suzuki, T., Salasluan, R., Saito-Taki, T., Stechscolte, J.D., y Balentine, L. (1980). Studies of Fc receptors of human B lymphocytes: Phospholipase A<sub>2</sub> activity Fcr receptors. *Biochemistry*.19: 6037-6044.
- 25.- Shiloah, J. Kibiansky, C. De Vries, A. y Berger, A. (1973). Phospholipase B activity of a purified phospholipase A from *Vipera palestinae* venom. *J. Lipid. Rev.* 14: 267-278.
- 26.- Opperdoes, F.R., y VanRoy, J. (1982). The phospholipase of *Trypanosoma cruzi* bloodstream forms and cultured procycles. *Mol. Bioch. Parasitol.* 5: 309-319.
- 27.- Habermann, E. y Hardt, K.L. (1972). Phospholipase assay by egg yolk plate test. *Anal. Biochem.* 50: 163

- 28.- Shier, T. y Trotter, J.S. (1978). Phospholipase A<sub>2</sub> electrophoretic variants and their detection after polyacrylamide gel electrophoresis. *Analyt. Biochem.* 87: 604-611.
- 29.- Alberts, B., Bray, D., Raff, M., Roberts, K. y Watson, J.D. (1983). *Molecular biology of the cell*. pp: 255-280. Ed. Garland Publishing, Inc. New York and London.
- 30.- Allen, G. (1981). Sequencing of proteins and peptides. pp: 263-272. Ed. North-Holland Publishing Company. Amsterdam. Nueva York. Oxford.
- 31.- Bordier, C. (1981) Phase separation of internal membrane proteins in Triton X 114 solution. *J. Biol. Chem.* 25: 1604-1607.
- 32.- Bricker, T. y Sherman, L.A. (1984). Triton X 114 phase fractionation of membrane proteins of *Cyanobacterium anacystis nidulans* R2. *Arch. Bioch. Biophys.* 235: 204-211.
- 33.-Hjelmeland, L.M. (1980). A nondenaturing zwitterionic detergent from membrane biochemistry: Desing and synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77: 6368-6370.
- 34.- Hijerten, S. (1983). A study on the renaturation of membrane proteins after solubilization in SDS or following polyacrylamide gel electrophoresis in SDS with special reference to a phospholipase from *Acholeplasma laidlawii*. *Bioch. Biophys. Acta.* 736: 130-136.
- 35.- Zwaal, R.F., Flucking, R., Monser, S. y Zahler, P. (1974). Lecithinase activites A<sub>1</sub> the surface of erythrocyte membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* 373: 416-424.
- 36.- King, T.P. Alagón, A.C. Kuan, J. Soboloka, A.K. y Lichenstem, L.M. (1983). Immunochemical studies of yellowjacket venom proteins. *Molec. Immol.* 20: 297-305.
- 37.- Roch, C., O., y Snyder, F. (1975). Rapid purification of phospholipase A<sub>2</sub> from *Crotalus adamanteus* venom by affinity chromatography. *J. Biol. Chem.* 250: 6565-6566.
- 38.- Tizard, I., Nielsen, K.H., Seed, J.R., y Hall, J.E. (1978). Biologically active products from african trypanosomes. *Microbial Rev.* 42: 661-681.
- 39.- Hysmith, M. y Franson, R.C. (1982). Elevated leveles of cellular and extracellular phospholipase from pathogenic *Nagleria fowleri*. *Biochem. Bioph. Acta.* 711:26-32.
- 40.- Ravdin, J.I. y Guerrant, R.L. (1982). A review of the parasite cellular mechanisms involved in the pathogenesis of amebiasis. *Rev. Infect. Dis.* 4: 1185-1207.
- 41.- Long-Kurg, S.A., Fisher, J.K., Hygmith, M.R., y Ravdin, J.I. (1985). Phospholipase A enzymes of *Entamoeba histolytica*: Description and subcellular localization. *J. Infect. Dis.* 152: 536-541.
- 42.- Ravdin, J.I. (1985). Effect of antagonists of calcium and phospholipase A on the cytopathogenicity of *Entamoeba histolytica*. *J. Infect. Dis.* 152: 542-549.

- 43.- McCaul, T.F., Poston, R.N., y Bird, R.G. (1977). *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba invadens*. Chromium release from labeled human liver cell in culture. *Exper. Parasitol.* **43**: 342-352.
- 44.- Ding, J.E.Y., y Zanvil, A.C. (1985). Molecular mechanisms of cytotoxicity mediated by *Entamoeba histolytica*: Characterization of a pore-forming protein (PFP). *J. of Cell. Biochem.* **29**:299-308.
- 45.- Gitler, C., Mogyoros, M., Calef, E., y Rosenberg I. (1985). Lethal recognition between *Entamoeba histolytica* and the host tissues. *Trans. Royal Socie. Trop. Med. and Hyg.* **79**:581-586.
- 46.- Avila, E.E., Sanches, M.G., y Calderón J. (1985). *Entamoeba histolytica* and *E. invadens*: Sulfhydryl-dependent proteolytic activity. *J. Protozool.* **32**:163-175
- 47.- Ostoa, P.S., Cabrera, N., Becker, I., Perez-Montfort R. (1989). proteinases of *Entamoeba histolytica* associated with different subcellular fractions. *Mol. Biochem. Parasitology.* **32**: 133-144
- 48.- Castro-Garza, J. (1986). Detección de una citolisina de efecto inmediato en extractos de trofozoítios de *Entamoeba histolytica* desarrollo de un modelo experimental. Tesis de Maestría
- 49.- Rosenthal, A.F., y Beyer, R.P. (1968). A synthetic inhibitor of venom lecithinase A. *J. Biol. Chem.* **235**: 2202-2206.
- 50.- Saíd-Fernández, S. y López-Revilla, R. (1982). Subcellular distribution and stability of the mayor cytolytic activity of *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Zeitschrift.Parasitenkunde Research.* **67**: 49-259.
- 51.- Prasad, A.K., Das, S.R. y Sagar, P. (1982). Hemolysis: An in vitro model to investigate tissue necrotic activity of *Entamoeba histolytica*. *Ind. J. Exptl. Biol.* **20**: 721-725.
- 52.- Saíd-Fernández, S. y López-Revilla, R. (1986). Free fatty acids generatioed from endogenous phospholipids are the major heat-stable hemolytic factor of *Entamoeba histolytica*. *Inf. & Immun.* **56**: 874-879.
- 53.- Vargas-Villarreal, J., Alagón, A.C. y Saíd-Fernández, S. Characterization of the major phospholipase activity from *Entamoeba histolytica* trophozoites. (Manuscrito en preparación).
- 54.- Saíd-Fernández, S., Vargas-Villarreal, J., Castro-Garza, J., Mata-Cárdenas, B., Navarro-Marmolejo, L., Lozano-Garza, G. y Martínez-Rodríguez, H.(1988). PEHPS medium: an alternative for axenic of *Entamoeba histolytica* and *E. invadens*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hygiene.* **82**: 249-253.
- 55.- Puck, T.T., Ceiciura, S.J. y Robinson, A. (1958). Genetic of somatic mammalian cells. III. Long Term cultivation of euploid cells from human and animal subjets. *J. of Exp. Med.* **108**: 945-955.

- 56.- Vargas-Villarreal, J. y Saíd-Fernández, S. (1984). *Entamoeba histolytica*: Cytolytic activity of cell-free trophozoites extract upon cells. Arch. Invest. Med. 15: 1-12.
- 57.- López-Revilla, R. y Rodríguez-Báez, J. (1981). Manual para el cultivo axénico de *Entamoeba histolytica*. Editorial Ciencia y Desarrollo. México.
- 58.- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.S., Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 183: 265-275.
- 59.- Skipsky, J.P. y Barclay, M. (1969). Thin-layer chromatography of lipids, pp: 530-599. En J.M. Lowenstein (Ed). Methods in Enzymology, Vol. 14. Academic Press, N.Y.
- 60.- Vargas-Villarreal J., Martín-Polo J.J., Reinaud, E. y Alagón-Cano A. (1991). A novel affinity adsorbent for purification of phospholipase A<sub>1</sub> and A<sub>2</sub> from animal venoms. Toxicon 29: 119-124
- 61.- Granelli-piperno, A., Vasalli, J-D., y Reich, E. (1978). J. Exp. Med. 146: 1693-1670.
- 62.- Davies, B.D., Dulbecco, R., Elisen, H.N., Ginsberg, H.S. y Wood, W.B. (1976). Infecciones bacterianas y micóticas. En tratado de microbiología, Versión Española de Microbiology. Barcelona. (España) pp: 621-670.
- 63.- Ravdin, J.I. y Guerrant, R.L. (1982). Separation of adherence, cytolytic and phagocytic event in the cytopathogenic mechanisms of *Entamoeba histolytica*. Arch. Invest. Med. 13:(Supl.3): 123.
- 64.- Takeuchi, A. y Phillips, P.B. (1975). Electron microscope studies of experimental *Entamoeba histolytica* infection in the guinea Pig. I. Penetration of the intestinal epithelium by trophozoites. Am. J. of Trop. Med. and Hyg. 24: 34
- 65.- Roa, V.G. y Padma, M.C. (1971). Some observations on the pathogenicity of strains mechanisms involved in the pathogenesis of amebiasis. Rev. Infect. Dis. 4: 1185-1207.
- 66.- López-Revilla, R. y Cano-Mancera, R. (1982). Adhesion of *Entamoeba histolytica* trophozoites to human erythrocytes. Infect. Imm. 37: 281-285.
- 67.- Eaton, R.D.P., Meerouitch, E. y Costerton, J.W. (1970). The functional morphology of pathogenicity in *Entamoeba histolytica*. Ann. Trop. Med. and Para. 64: 299-304.
- 68.- Kretschmer, R.R. (1990). Amebiasis: Infection and disease by *Entamoeba histolytica*. CRC Press. pp: 19-58.
- 69.-Koblier, D. y Mirelman, D. (1980). Lectin activity in *Entamoeba histolytica*, Infect. Immun. 29:221-227

- 70.- Mirelman, D. y Ravdin, J.I. (1986). Lectin in *Entamoeba histolytica*, in Microbial Lectin and agglutinins: Properties and Biological Activities, Mirelman, D., Ed. John Wiley & Sons, New York.
- 71.- Muños, L., Calderón, J. y Rojkind, M. (1982). Presencia de actividad colagenolítica en trofozoitos de *Entamoeba histolytica*. Arch. Invest. Med. 13 (Supl.3): 191.
- 72.- Gadasi, H y Kessler, E. (1983). Correlation of virulence and collagenolytic activity in *Entamoeba histolytica*. Infect. Immun. 39 528-534
- 73.- Ravdin, J.I. y Guerrant, R.L. (1980). Cytopathogenic mechanisms of *Entamoeba histolytica*: J. Experim. Med. 152: 377-390.
- 74.- Eaton, R.D.P., Meerouitch, E. y Costerton, J.W. (1970). The functional morphology of pathogenicity in *Entamoeba histolytica*. Annals of Tropical Med. and Parasitology. 64: 299-304
- 75.- López-Revilla, R y Saíd-Fernández, S. (1980). Cytopathogenicity of *Entamoeba histolytica*: hemolytic activity of trophozoite homogenates. American J. Tropical Medicine and Hygiene. 29: 209-212.
- 76.- Saíd-Fernández, S. y López-Revilla, R. (1981). Cytopathogenicity of *Entamoeba histolytica*: Trophozoites modulation DNA synthesis in mammalian cell line. 2. Parasitenkunde pp: 1-7.
- 77.- Lichtenberg, D., Robinson, R.J. y Dennis, E.A. (1983). Solubilization of phospholipids by detergents structural and kinetic aspect. Biochem & Biophysic Acta. 737: 285-304.
- 78.- Helenius, A. y Simons, K. (1975) Solubilization of membranes by detergents. Biochem. & Biophysica Acta. 415: 29-79
- 79.- Suyterman, L.A. y Elgersma, O. (1978). Chromatofocusing: Isoelectric focusing on ion exchange columns. J. Chromatogr. 150: 17-30.
- 80.- Wyler, D.J. (1990). Modern parasite biology. Freeman. pp: 126-150
- 81.- Ravdin, J., Moreau, F., Sullivan, J.A., Petri, W.A., Mandell, G.L. (1988). Relationship of free interacellular calcium to the cytolytic activity of *Entamoeba histolytica* Infection & Immun. 56: 1505-1512.
- 82.- Sosa, B.P., Alagón, A.C., Possani, L.D. y JuliEa, J.Z. (1979). Comparison of phospholipase activity with direct and indirect lytic effects on animal venoms upon red blood cells. Comp. Biochem. Physiol. 64: 231-234.
- 83.- Saíd-Fernández, S, Vargas-Villarreal, J. y Castro-Garza, J. (1986). Mecanismo multifactorial de la actividad citolítica de *Entamoeba histolytica*. Arch. Invest. Méd. 17: 173-178.

## SHORT COMMUNICATIONS

### A NEW AFFINITY ADSORBENT FOR THE PURIFICATION OF PHOSPHOLIPASES $A_1$ AND $A_2$ FROM ANIMAL VENOMS\*

J. VARGAS-VILLARREAL, J. J. MARTIN-POLO, E. REYNAUD and A. C. ALAGON†

Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Mor. 62270, México

(Received 7 May 1990; Accepted 26 July 1990)

J. VARGAS-VILLARREAL, J. J. MARTIN-POLO, E. REYNAUD and A. C. ALAGON. A new affinity adsorbent for the purification of phospholipases  $A_1$  and  $A_2$  from animal venoms. *Toxicon* 29, 119-124, 1991.—Dimethyl-di-2,3-distearoyloxypropyl-2'-hydroxy-ethylammonium (Rosenthal's inhibitor) was coupled to carboxyhexyl-Sepharose 4B, through carbodiimide chemistry. Phospholipase  $A_2$  from *Heloderma horridum horridum* and *Crotalus adamanteus* bind to the immobilized ligand in the presence of  $Ca^{2+}$  and can be easily eluted under acidic conditions or in the presence of a chelating agent, respectively. This affinity media proved to be effective also in the purification of a  $Ca^{2+}$ -independent phospholipase  $A_1$  from vespid venom.

PHOSPHOLIPID acylhydrolases are ubiquitous enzymes and based on their positional specificity, they can be distinguished as phospholipases  $A_1$  (EC 3.1.1.32) and  $A_2$  (EC 3.1.1.4) (VAN DEN BOSCH, 1980; VERHEIJ *et al.*, 1981). Most phospholipases A that have been isolated are from animal venoms or mammalian pancreas origin, where they occur in soluble form and high concentrations (VERHEIJ *et al.*, 1981; ROSENBERG, 1986). Published examples of purifications of phospholipases A from other sources are scarce, mostly because they are present in lower amounts and/or are membrane-bound (VAN DEN BOSCH, 1980; AARSMAN *et al.*, 1984; KRAMER, 1989). Phospholipases A play important roles in physiological and pathological conditions and are useful tools in the structural analysis of lipids (BARSUKOV *et al.*, 1980; VERHEIJ *et al.*, 1981; VADAS and PRUZANSKI, 1986; CHIANG *et al.*, 1986). There is, therefore, a real need for the continuous improvement and development of procedures for the purification of such enzymes. Affinity chromatography is one of the best choices, as documented by others (ROCK and SNYDER, 1975; AARSMAN *et al.*, 1984).

We found that phospholipases A from venoms of a number of animal species displayed different susceptibilities toward Rosenthal's inhibitor and an alkyl ether analog of phosphatidyl choline used as a ligand for the isolation of phospholipase  $A_2$  (ROCK and SNYDER, 1975). Rosenthal's inhibitor, in many instances, was a much better inhibitor. This substance was indeed synthesized as a lecithin analogue to inhibit American water moccasin venom phospholipase A (ROSENTHAL and GEYER, 1960) and it has been also

\*Part of these results were presented at the III Symposium on Animal, Plant and Microbial Toxins of the Pan-American Section of the International Society on Toxicology at Oaxtepec (Mexico), 9-12 January, 1990.

†Author to whom correspondence should be addressed at: above address (Apdo. Postal 510-3).

used to inhibit phospholipase-mediated cytotoxicity of mammalian (PRYB and FRIOU, 1975) and protozoan cells (LONG-KRUG *et al.*, 1985). In this paper the coupling of Rosenthal's inhibitor to Sepharose 4B and its use in the purification of phospholipases A from saurian, snake and vespid venoms is described.

Venom from *Heloderma horridum horridum* (Mexican beaded lizard) was obtained as previously described (ALAGON *et al.*, 1982). Venom sac extract from *Dolichovespula maculata* (white-faced hornet) was a gift from Dr T. P. KING (The Rockefeller University, NY, U.S.A.). *Crotalus adamanteus* (Eastern diamond rattlesnake) venom, cyanogen bromide activated Sepharose 4B, 1,3-dicyclohexylcarbodiimide and 6-aminohexanoic acid were from Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, U.S.A. Rosenthal's inhibitor was obtained from Calbiochem, La Jolla, CA, U.S.A. Other chemicals and solvents used were reagent grade.

Two different protocols were designed in order to obtain variable amounts of Rosenthal's inhibitor coupled to Sepharose. For the preparation of adsorbent with low level of substitution, commercial cyanogen bromide activated Sepharose 4B (2.5 g) was swollen and washed with 200 ml of 0.1 M sodium carbonate buffer (pH 9). The resin was allowed to react with 131 mg (1 mmole) of 6-aminohexanoic acid in 15 ml pH 9 buffer for 24 hr at room temperature. The carboxyhexyl-Sepharose 4B obtained was washed and suspended in 10 ml of dioxane containing 206 mg (1 mmole) of 1,3-dicyclohexylcarbodiimide followed by the addition of 75 mg (0.1 mmole) of Rosenthal's inhibitor and 49 mg (0.4 mmole) 4-dimethylaminopyridine in 10 ml of dioxane/chloroform (1:1 v/v) (WILLIAMS and IBRAHIM, 1981). After agitating 24 hr at room temperature, the resin was washed three times with 50 ml each 2-propanol and chloroform, followed by dioxane and water. Highly substituted adsorbent was obtained as above with two modifications: (1) Sepharose 4B was activated with solid CNBr (CUATRECASAS *et al.*, 1968), which is the desirable procedure for the preparation of affinity gels containing large amounts of ligand (KOTIN and WILCHEK, 1978); (2) a higher amount of inhibitor (302 mg; 0.4 mmole) was reacted with carboxyhexyl-Sepharose 4B for 48 hr in chloroform. The amount of coupled inhibitor was calculated by measuring the fatty acid content of Rosenthal inhibitor-Sepharose 4B by capillary gas-liquid chromatography (HOLMAN *et al.*, 1983).

Chromatographic conditions for phospholipases are described in the Figure legends. Phospholipase activity was determined titrimetrically with egg yolk as substrate (KING *et al.*, 1983). Electrophoresis was carried out in 7.5% polyacrylamide tube gels containing Tris buffer (JOVIN *et al.*, 1984) or in 15% slab gels containing Tris-sodium dodecylsulfate buffer (LAEMMLI, 1970). The protein bands in tube and slab gels were detected by staining with Coomassie brilliant blue G-250 (REISNER *et al.*, 1975) or silver (MERRIT *et al.*, 1980), respectively. Prior to gel electrophoresis, protein fractions were dialyzed against 20 mM ammonium acetate buffer at pH 6 and concentrated by ultrafiltration with an Amicon PM-10 membrane. Protein concentration was measured spectrophotometrically by assuming that 1 absorbing unit at 280 nm = 1 mg/ml.

The amount of coupled inhibitor in the low level-substituted Rosenthal inhibitor-Sepharose 4B was 0.27  $\mu$ mole per ml of swollen gel. The highly substituted resin was 10 times higher. In both cases, we assume that the inhibitor formed an ester linkage between its alcohol functionality and the carboxylic acid bound to the resin. The usefulness of the new adsorbent, particularly with the low level-substituted resin, is illustrated with its use in the purification of different types of venom phospholipases A from three distinct species. The first example was obtained with the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent phospholipase  $\text{A}_2$  from *H. h. horridum* (SOSA *et al.*, 1986). Seven mg of crude venom containing 1050 phospholi-



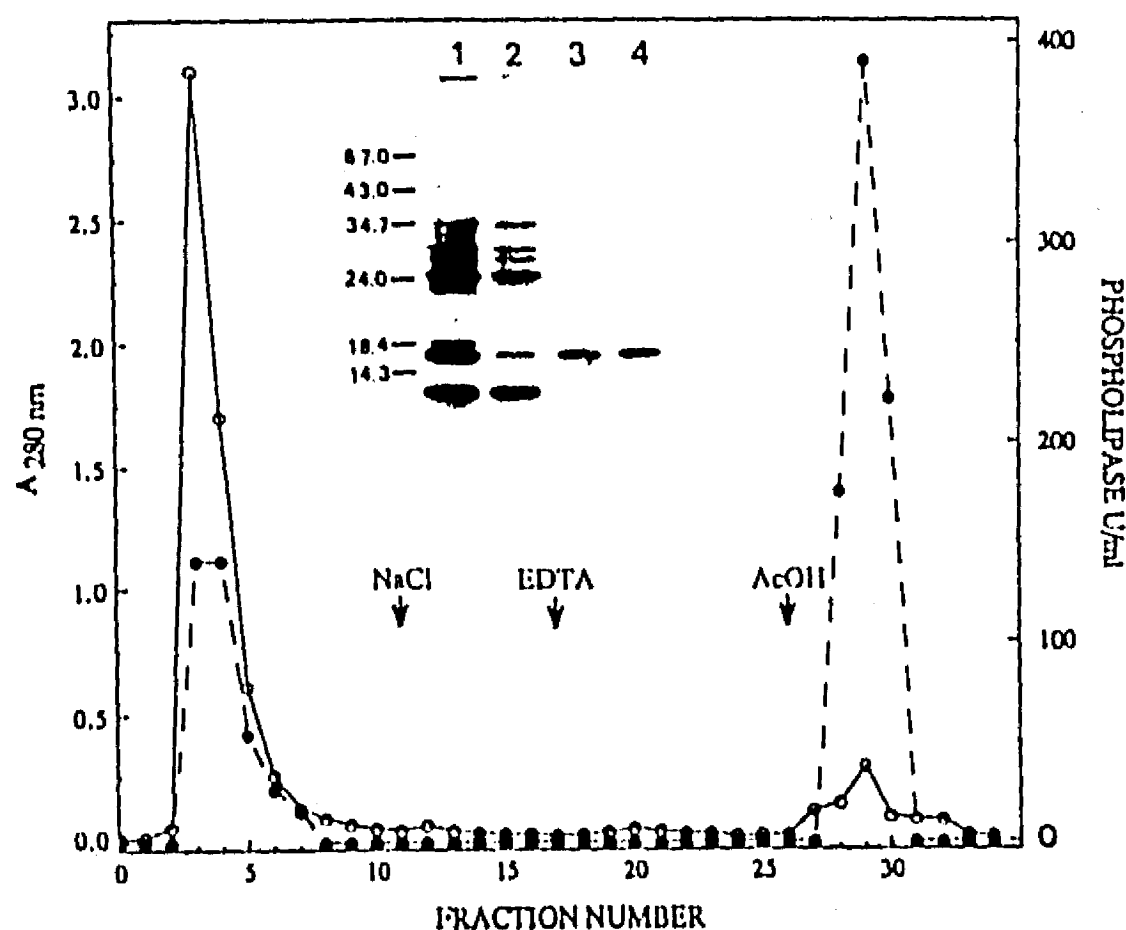


FIG. 1. PURIFICATION OF *H. h. horridum* VENOM PHOSPHOLIPASE  $A_2$  ON ROSENTHAL INHIBITOR-SEPHAROSE 4B.

Lyophilized venom was dissolved in 0.1 M Tris/HCl buffer at pH 7.95 containing 25 mM  $CaCl_2$  (loading buffer) and clarified by centrifugation. The venom was then applied to the Rosenthal inhibitor-Sepharose 4B column ( $0.44 \times 5.4$  cm, 0.8 ml bed volume). Unbound proteins were eluted with loading buffer. After the  $A_{280}$  returned to baseline, the column was successively developed with the following solutions: loading buffer containing 0.5 M NaCl, 50 mM ethylenediamine-tetraacetic acid in 0.1 M Tris buffer pH 7.95, and 0.1 M acetic acid. Arrows indicate where elutions with the different buffer solutions were initiated. The flow rate was 14 ml/hr and fractions of about 1 ml were collected. Fractions obtained with acetic acid were received in tubes containing 1 ml of 1 M Tris/HCl at pH 7.95. All column operations were carried out at room temperature. The  $A_{280}$  (open circles) and the phospholipase activity (solid circles) are shown. Inset, sodium dodecylsulfate-gel electrophoresis of crude venom (lane 1; 5.2  $\mu$ g), unbound proteins (lane 2; 3.2  $\mu$ g), phospholipase eluted with acetic acid (lane 3; 2  $\mu$ g), and phospholipase purified by conventional procedures (lane 4; 2  $\mu$ g). A parallel lane was used to run standard proteins, their mobility and mol. wt (in kDa) is indicated.

pase units, were applied in 0.3 ml of buffer into a Rosenthal inhibitor-Sepharose 4B column. As can be seen in Fig. 1, 27% of the activity did not bind to the column. This was due to saturation of the binding capacity of the column, since rechromatography of the breakthrough peak in the same column resulted in total removal of the activity from the venom (results not shown).

The bound phospholipase could not be eluted with 50 mM ethylenediamine-tetraacetic acid. It was eluted only under acidic conditions. It is well established that most  $Ca^{2+}$ -dependent phospholipases of the  $A_2$ -type first bind  $Ca^{2+}$  and subsequently the enzyme- $Ca^{2+}$  complex binds the substrate (WELLS, 1972). Therefore, in another experiment the venom was dissolved in 0.1 M Tris/HCl pH 7.95 containing 50 mM ethylenediamine-tetraacetic acid and applied into the same column. The same buffer was used for the elution of the unbound material. Under these conditions all the phospholipase activity

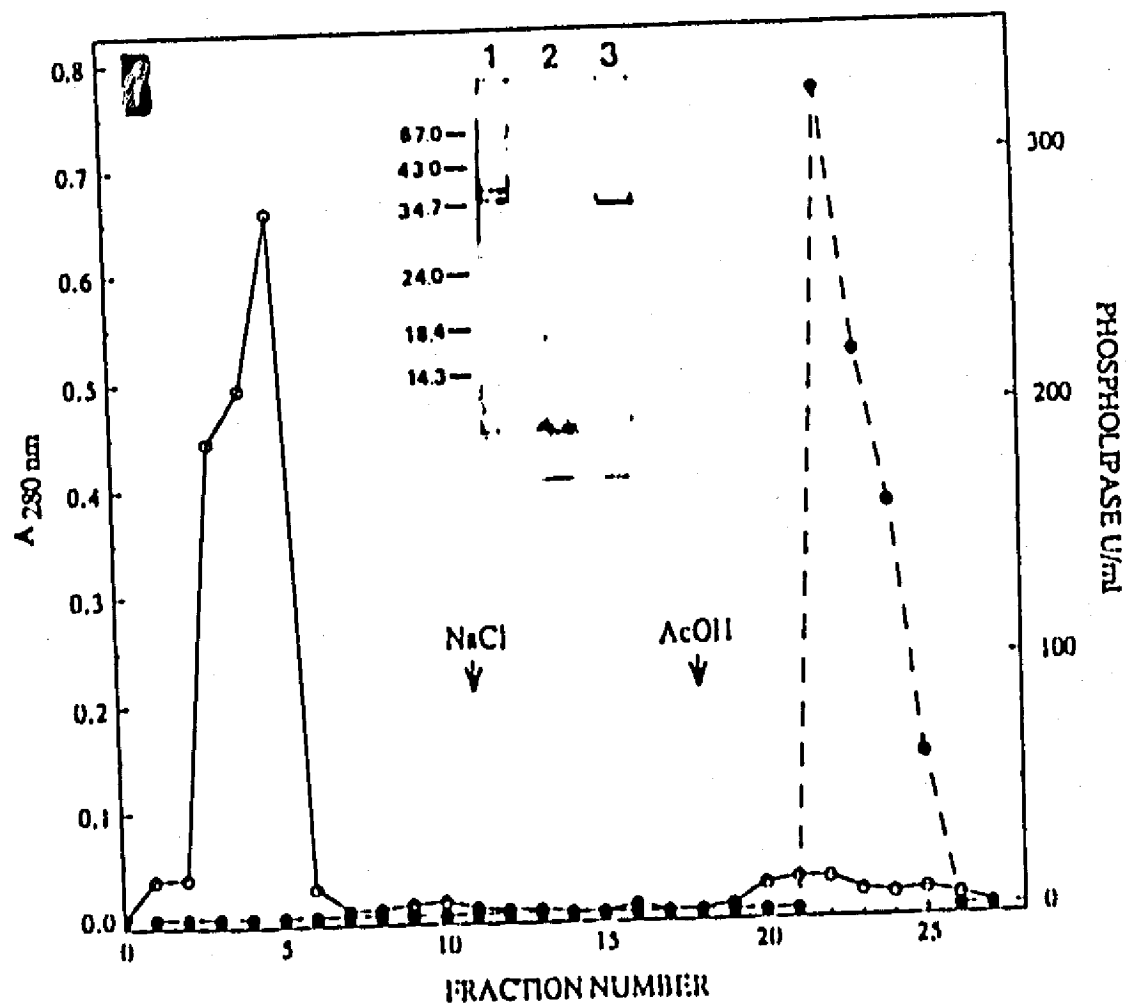
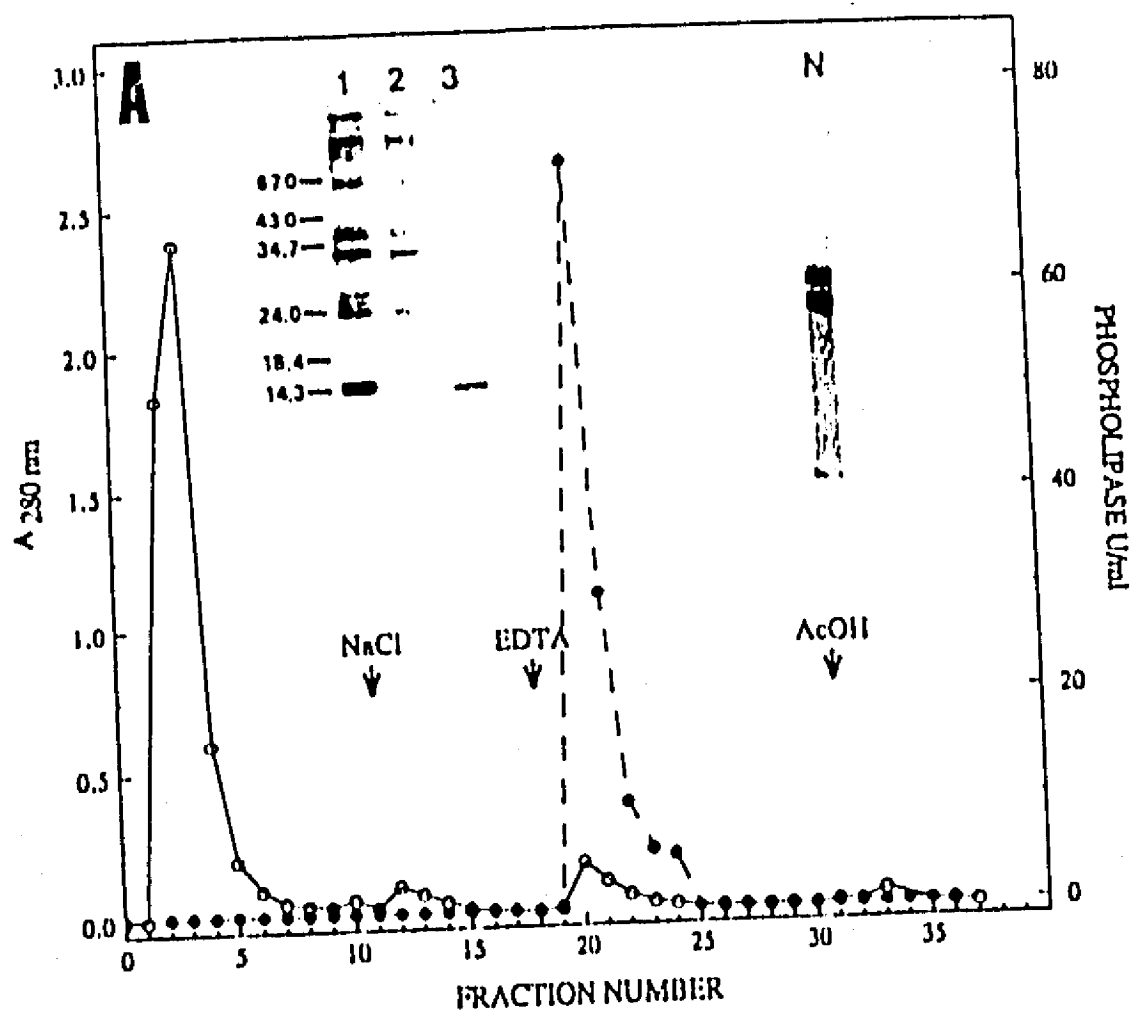


FIG. 2. PURIFICATION OF *C. adamanteus* PHOSPHOLIPASE  $A_2$  (A) AND *D. maculata* PHOSPHOLIPASE  $A_1$  (B) ON ROSENTHAL INHIBITOR-SEPIAROSE 4B. Chromatographic conditions are as in Fig. 1. With *D. maculata* venom ethylenediamine-tetraacetic acid solution was not used. Insets in A: denatured (left) and native (right) gel electrophoresis of crude venom (lane 1; 3.4  $\mu$ g), unbound proteins (lane 2; 2.3  $\mu$ g), and purified fraction (lane 3; 0.9  $\mu$ g); native gel (N) was loaded with 35  $\mu$ g of pure phospholipases. Inset in B, sodium dodecylsulfate-gel electrophoresis of vespid venom sac extract (lane 1; 4.1  $\mu$ g), unbound proteins (lane 2; 2.9  $\mu$ g), and purified phospholipase (lane 3; 1.1  $\mu$ g).

passed through the column without any significant binding (data not shown). These results demonstrate the  $\text{Ca}^{2+}$  requirement for binding of the *Heloderma* venom phospholipase  $\text{A}_2$  to the support. The purified phospholipase  $\text{A}_2$  gave a single band in sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis with a mobility equal to phospholipase  $\text{A}_2$  from the same venom isolated by conventional procedures (SOSA *et al.*, 1986), as shown in the inset of Fig. 1. Also, its specific activity of 1750 U/mg is comparable to the activity previously reported (SOSA *et al.*, 1986).

The adsorbent was also used for the fractionation of 6.6 mg (122 enzymic units) of venom from *C. adamanteus* as shown in Fig. 2A. In this case, all the activity bound to the column and was eluted with 50 mM ethylenediamine-tetraacetic acid. Fraction III contained 92% of the initial activity, and its specific activity was increased 20.4 times compared with that of the crude venom. Electrophoretic analysis of the purified fraction yielded one band in the presence of sodium dodecylsulfate and two bands under native conditions as illustrated in the inset of Fig. 2A. Indeed, it is known that *C. adamanteus* venom contains two proteins with phospholipase  $\text{A}_2$  activity that have similar mol. wt (WELLS, 1969).

We also studied the ability of the Rosenthal inhibitor-Sepharose 4B to bind phospholipase  $\text{A}_1$  by the chromatography of 2.45 mg (930 units of activity) of dialyzed venom sac extract from the white-faced hornet as shown in Fig. 2B. Vespid venoms are known to contain a  $\text{Ca}^{2+}$ -independent phospholipase  $\text{A}_1$  with residual B activity (KING *et al.*, 1983, 1984). Elution of the enzyme was achieved by lowering the pH. The purified enzyme had a mol. wt of about 37,000 (inset, Fig. 2B) and an enzymatic specific activity of 3500 units/mg. These values correspond very well to the ones reported for purified homologous proteins from *Vespula* and *Polistes* venoms (KING *et al.*, 1983, 1984).

The highly substituted resin was unsuitable for the purification of the phospholipases  $\text{A}_2$  present in the venoms of *Heloderma* and *Crotalus*. We found that with such resin many other proteins bind to the column. Also, the total phospholipase activity recovered with highly derived beads was below 10% of the activity applied (data not shown).

Our results indicate that the Rosenthal inhibitor-Sepharose 4B is a simple and versatile affinity adsorbent for the purification of phospholipases  $\text{A}_1$  and  $\text{A}_2$ . The enzymes were purified with a high degree of homogeneity and in more than 85% yield. The adsorbent can be stored at 4°C in 30% methanol with no change in its binding capacity for at least 12 months. The ligand used in this affinity adsorbent is rather hydrophobic, which could explain our results with the highly substituted preparation. This phenomenon has been fully documented and discussed by us for the use of the Rock and Snyder affinity resin in the purification of *H. h. horridum* phospholipase  $\text{A}_2$  (SOSA *et al.*, 1986). The binding of unspecific proteins to the adsorbent was substantially decreased by lowering the amount of coupled ligand. The adsorbent so obtained still had sufficient specific binding capacity (about 80  $\mu\text{g}$  of *Heloderma* phospholipase per ml of swollen and packed gel). We found, however, that its binding capacity decreased after several runs of the same column unless it was washed with 1% sodium dodecylsulfate after every use. A plausible explanation for the different elution behavior in the presence of ethylenediamine-tetraacetic acid between the *Heloderma* and *Crotalus* phospholipases  $\text{A}_2$  could be a higher affinity for  $\text{Ca}^{2+}$  in the enzyme-inhibitor complex of the former. In fact, it is known that phospholipases  $\text{A}_2$  from different sources display variable affinities for  $\text{Ca}^{2+}$  (VEAUEN *et al.*, 1981).

The affinity medium here described has also been a powerful tool for the purification of the phospholipases A from other venoms and a membrane-bound phospholipase A from *Entamoeba histolytica* (J.V.-V., PhD thesis, in preparation).

*Acknowledgements*—We thank ALEJANDRO OLIVERA for his technical assistance and Dr SANTIAGO CAPELLA (Facultad de Química, UNAM) for measuring the fatty acid content of Rosenthal inhibitor-Sepharose 4B. This study was supported by a grant from the Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la Universidad Nacional Autónoma de México.

## REFERENCES

- AARSMAN, A. J., NEYS, F. and VAN DEN BOSCH, H. (1984) A simple and versatile affinity column from phospholipase  $A_2$ . *Biochim. biophys. Acta* 792, 363-366.
- ALAGON, A. C., MALDONADO, M. E. A., JULIA, J. Z., SANCHEZ, C. R. and POSSANI, L. D. (1982) Venom from two sub-species of the lizard *Heloderma horridum* (Mexican headed lizard): General characterization and purification of a N-benzoyl-L-arginyl ethyl ester hydrolase. *Toxicon* 20, 463-475.
- BARSKOV, L. I., BAFRAKOV, S. G., BERGELSON, L. D., DYATLOVITSKAYA, E. V., MOLOTKOVSKY, J. G. and PRUKAZOVA (1980) Determination of purity and characterization of lipid substances. In: *Lipid Biochemical Preparations*, pp. 65-77 (BERGELSON, L. D., Ed.). Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomedical Press.
- CHANG, J., MUSSER, J. H. and MCGREGOR, H. (1987) Phospholipase  $A_2$ : function and pharmacological regulation. *Biochem. Pharmacol.* 36, 2429-2436.
- CUATRECASAS, P., WILCHEK, M. and ANFINSEN, C. B. (1968) Selective enzyme purification by affinity chromatography. *Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A.* 61, 636-643.
- FRYE, L. D. and FRIDU, G. J. (1975) Inhibition of mammalian cytotoxic cells by phosphatidyletholine and its analogue. *Nature* 258, 333-335.
- HILMAN, R. T., JOHNSON, S. B., GERRARD, J. M., MAUER, S. M., KUPCHO-SANDBERG, S. and BROWN, D. M. (1983) Arachidonic acid deficiency in streptozotocin-induced diabetes. *Proc. Natn. Acad. Sci. USA* 80, 2375-2379.
- JOVIN, T., CHIRAMIAHI, A. and NAUGHTON, M. A. (1964) An apparatus for preparative temperature-regulated polyacrylamide gel electrophoresis. *Analyt. Biochem.* 9, 351-356.
- KING, T. P., ALAGON, A. C., KUAN, J., SOUSTKA, A. K. and LICHTENSTEIN, L. M. (1983) Immunochemical studies of yellow jacket venom proteins. *Molec. Immunol.* 20, 297-308.
- KING, T. P., KOCHOUMIAN, L. and JOSLYN, A. (1984) Wasp venom proteins: phospholipase  $A_1$  and B. *Archs Biochem. Biophys.* 230, 1-12.
- KOHN, J. and WILCHEK, M. (1978) A colorimetric method for monitoring activity of Sepharose by cyanogen bromide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 84, 7-14.
- KRAMER, R. M., HESSON, C., JOHANSEN, B., HAYES, G., MCGHAY, P., CHOW, E. P., TIZARD, R. and PEPINSKY, R. B. (1989) Structure and properties of a human non pancreatic phospholipase  $A_2$ . *J. Biol. Chem.* 264, 5768-5775.
- LAEMMLI, U. K. (1970) Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage "T4". *Nature* 227, 680-685.
- LONG-KRUG, S. A., FISHER, K. J., HYSMITH, R. M. and RAVDIN, J. I. (1985) Phospholipase A enzymes of *Entamoeba histolytica*: description and subcellular localization. *J. Infect. Dis.* 152, 536-541.
- MERRIL, C. R., GOLDMAN, D., SEDMAN, S. A. and ENERT, M. H. (1980) Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins. *Science* 211, 1437-1438.
- REISNER, A. H., NEMES, P. and BUCHOLTZ, C. (1975) The use of Coomassie brilliant blue G250 perchloric acid solution for staining in electrophoresis and isoelectric focusing on polyacrylamide gels. *Analyt. Biochem.* 64, 509-516.
- ROCK, C. O. and SNYDER, F. (1975) Rapid purification of phospholipase  $A_2$  from *Crotalus adamanteus* venom by affinity chromatography. *J. Biol. Chem.* 250, 6565-6566.
- ROSENBERG, P. (1986) The relationship between enzymatic activity and pharmacological properties of phospholipases in natural poisons. In: *Natural Toxins*, pp. 129-174 (HARRIS, J. B., Ed.). Oxford: Oxford University Press.
- ROSENTHAL, A. F. and GEYER, R. P. (1960) A synthetic inhibitor of venom lecithinase A. *J. Biol. Chem.* 235, 2202-2206.
- SOSA, B. P., ALAGON, A. C., MARTIN, B. M. and POSSANI, L. D. (1986) Biochemical characterization of the phospholipase  $A_2$  purified from the venom of the Mexican beaded lizard (*Heloderma horridum horridum* Wiegmann). *Biochemistry* 25, 2927-2933.
- VADAS, P. and PRUZANSKI, W. (1986) Biology of disease: role of secretory phospholipases  $A_2$  in the pathobiology of disease. *Lab. Invest.* 55, 391-404.
- VAN DEN BOSCH, H. (1980) Intracellular phospholipase A. *Biochim. biophys. Acta* 604, 191-246.
- VERHEE, H. M., SLOTHOOM, A. J. and DELHAAS, G. H. (1981) Structure and function of phospholipases  $A_2$ . *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 91, 91-203.
- WELLS, M. A. (1972). A kinetic study of the phospholipase  $A_2$  (*Crotalus adamanteus*) catalyzed hydrolysis of 1,2-dibutyl-sn-glycero-3-phosphatidyletholine. *Biochemistry* 11, 1030-1041.
- WELLS, M. A. and HANAHAN, D. J. (1969) Studies on phospholipase A. I. Isolation and characterization of two enzymes from *Crotalus adamanteus* venom. *Biochemistry* 8, 414-424.
- WILLIAMS, A. and IURAHIM, T. I. (1981) Carbodiimide chemistry: recent advances. *Chem. Rev.* 81, 589-636.