

36

TM
Z5320
FCB
1985
V37

36

TM
Z5320
FCB
1985
V37



1020066255

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
DIRECCION GENERAL DE ESTUDIOS DE
POST GRADO

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

RECIBIDO
OCT. 12 1988

FIRMA



CARACTERIZACION DE LA PRINCIPAL ACTIVIDAD
FOSFOLIPASICA DE ENTAMOEBAS HISTOLYTICAS

TESIS

QUE EN OPCION AL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS



DIRECCION GENERAL DE
ESTUDIOS DE POSTGRADO

PRESENTA

JAVIER VARGAS VILLARREAL



MONTERREY, N. L.

MARZO DE 1985

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

CARACTERIZACION DE LA PRINCIPAL ACTIVIDAD
FOSFOLIPASICA DE ENTAMOEBAS HISTOLYTICA

TESIS
QUE EN OPCION AL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA
JAVIER VARGAS VILLARREAL

DIRECTOR EXTERNO



DR. SALVADOR SAID FERNANDEZ



TM
ZS320
FCB
1985
V37



153313

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

CARACTERIZACION DE LA PRINCIPAL ACTIVIDAD
FOSFOLIPASICA DE ENTAMOEBAS HISTOLYTICA

TESIS
QUE EN OPCION AL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA
JAVIER VARGAS VILLARREAL

COMISION DE TESIS:



DR. SALVADOR SAID FERNANDEZ

PRESIDENTE



BIOL. MARIO R. MORALES VALLARTA

SECRETARIO



BIOL. JORGE VERDUZCO MARTINEZ

VOCAL



El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Bioquímica de Parásitos de la Sección de Biología Celular. Unidad de Investigaciones Biomédicas del Noreste. Instituto Mexicano del Seguro Social, bajo la asesoría del Dr. Salvador Said Fernández.

DEDICATORIA

A quien debo mi ser, mi formación

y mi carrera:

Héctor Vargas García

y

Elvia Villarreal de Vargas

A LA MEMORIA DE MI ABUELO:

Alejandro Vargas Guerra

A MIS HERMANOS:

Héctor

Elvia

Leticia

A MIS MAESTROS.

A MIS COMPAÑEROS DE GENERACION

A TODOS MIS FAMILIARES Y AMIGOS

INDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	x
LISTA DE FIGURAS	xii
AGRADECIMIENTOS	xiii
RESUMEN	xv

I. INTRODUCCION

Fosfolipasas	1
Clasificación	1
Características generales de las fosfolipasas A	1
Métodos de ensayo	3
Purificación de las fosfolipasas asociadas a membrana	4
Antecedentes de la actividad fosfolipásica de F30	4
Hipótesis	5
Secuencia del trabajo experimental	6
Contribución y perspectivas del presente trabajo	7

II. MATERIALES

A. Origen de los reactivos	8
B. Material biológico	8
C. Preparación del medio de cultivo PEHPS-1	9
Medio basal (PEHP)	9
Medio completo (PEHPS-1)	9
D. Composición y preparación de soluciones	
Fosfolipasa A2 de veneno de abeja 100X	10
Fosfolipasa A2 de veneno de abeja 1X	10

Tris-HCl 10X	10
Tris-HCl 1X	10
Solución amortiguadora de fosfatos (PBS)	11
CaCl ₂ -2H ₂ O 10X	11
CaCl ₂ -2H ₂ O 1X	11
Tritón X100 10X	11
Reactivo de Dragendorff (solución concentrada)	11
Reactivo de Dragendorff (solución de trabajo)	11
Solución de cloroformo-metanol (2:1)	12
Mezcla crómica	12
Mezcla de ensayo 2X	12
Mezcla para parar la reacción	12

III. METODOS

A. Tratamiento del material para cultivo	
Lavado y esterilización	14
B. Tratamiento del material para cromatografía	
Lavado y secado	15
C. Cultivo amibiano axénico	
Resiembra y cosecha	15
Mantenimiento de la cepa HK9	16
D. Obtención de los extractos totales de trofozoítos y de la fracción subcelular P30	
Fracción subcelular P30	18
Extractos totales	18
Obtención de P30	18
E. Cuantificación de proteínas	18
F. Método para determinar la actividad fosfolipásica	20

G. Cuantificación de la actividad fosfolipásica -----	20
H. Cromatografía en placa fina -----	21
I. Identificación de lípidos -----	21
J. Obtención de lípidos -----	21
K. Cuantificación de la actividad fosfolipásica en P30 -----	22
L. Determinación de la actividad fosfolipásica de P30 en mezclas de ensayo con pH, calcio, o EDTA variables	
pH -----	23
Calcio -----	23
EDTA -----	23
M. Determinación de actividades lisofosfolipásicas -----	23
N. Análisis estadísticos -----	24
O. Efecto de inhibidores específicos sobre la actividad de P30 -----	24
IV. RSEULTADOS	
I. Adaptación de un micrométodo para cuantificar actividad fosfolipásica -----	25
II. Determinación de la actividad fosfolipásica de P30 ----- Efecto del pH, calcio y EDTA sobre la actividad fosfolipásica de P30	
Identificación preliminar -----	27
Detección en P30 de una fosfolipasa A1 y A2 -----	31
Confirmación de la existencia de actividad de lisofosfolipasa en P30 -----	31
Efecto de inhibidores específicos sobre la actividad fosfolipásica de P30 -----	34
V. DISCUSION -----	37

Conclusión	50
Perspectivas	51
VI. REFERENCIAS	53

LISTA DE ABREVIATURAS

<u>N</u>	Concentración Normal.
ml.	Mililitros.
g	Gramos.
%	Por ciento.
mM	Concentración milimolar.
pH	Potencial de hidrógeno.
EDTA	Etilen diamino tetracético.
IR	Inhibidor de Rosenthal.
COOF-FC	1(11 carboxinonil)-2-hexadecil-glicero-3-fosfatidil colina.
°C	Grados centígrados.
min.	Minutos.
h.	Horas.
µl.	Microlitros.
µg.	Microgramos.
<u>X</u>	Concentración con respecto a la solución de trabajo.
mg.	Miligramos.
mm	Milímetros.
DO	Densidad óptica.
nM	Nanómetros.
FC	Fosfatidilcolina.
LFC	Lisofosfatidilcolina.
GFC	Gliceril-fosforil-colina.
AGL	Acidos grasos libres.
RI	Regiones intermedias.

cm	Centímetros.
r ²	Correlación con la recta.
P	Probabilidad.
v/v	Volumen a volumen.
mCi	Microcuries.
SAB	Seroalbúmina bovina.
AP	Acido palmítico.
[¹⁴ C]FC	L- κ -dipalmitoil-[2-palmitoil-1- ¹⁴ C]-fosfatidilcolina.
[¹⁴ C]LFC	L-1 o 2-dipalmitoil-[palmitoil ¹⁴ C]-fosfatidilcolina.
[³ H]FC	L- κ -dipalmitoil [colina-metil- ³ H]-fosfatidilcolina.
[³ H]LFC	L-1 o 2-palmitoil[colina- metil- ³ H]fosfatidilcolina.
[³ H]GFC	L- κ -gliceril-[colina-metil ³ H]fosfatidilcolina.

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

1 - Clasificación de las fosfatido-acil hidrolasas, de acuerdo con la posición en la molécula del éster que hidrolizan -----	2
2 - Crecimiento de <u>E. histolytica</u> cepa HK9 -----	17
3 - Fraccionamiento subcelular de trofozoítos de <u>E. histolytica</u> ----	19
4 - Relación entre la cantidad de mU de fosfolipasa A2 de veneno de abeja y la liberación del monoacil-gliceril-[³ H]colina -----	26
5 - Relación temporal de la actividad fosfolipásica de P30 -----	28
6 - Efecto del pH sobre la actividad fosfolipásica de P30 -----	29
7 - Efecto de la concentración de cloruro de calcio y la actividad fosfolipásica de P30 -----	30
8 - Incremento de una actividad fosfolipásica de P30 en función de la concentración de EDTA -----	32
9 - Relación entre la cantidad de proteínas totales de P30 y la liberación del monoacil-[¹⁴ C]gliceril- fosforilcolina y el ácido [1- ¹⁴ C]palmítico -----	33
10 - Actividad de lisofosfolipasa en P30 y en una preparación comercial de fosfolipasa A2 de veneno de abeja -----	35
11 - Fosfatidilcolina, L- α -, dipalmitoil-[colina-metil ³ H] -----	41
12 - Presencia de una fosfolipasa A y posiblemente una lisofosfolipasa en P30 -----	42
13 - Fosfatidilcolina, L- α -, dipalmitoil-[2-palmitoil-1 ¹⁴ C]-----	44
14 - Presencia de una fosfolipasa A1 y/o una lisofosfolipasa -----	46
15 - Lisofosfatidilcolina, L- α -, palmitoil-[1-palmitoil-1 ¹⁴ C] -----	47
Tabla 1 -----	49
Tabla 2 -----	36

AGRADECIMIENTOS

Agradezco:

A la Unidad de Investigaciones Biomédicas del Noreste del IMSS por otorgarme las facilidades para la realización de ésta tesis.

Al Dr. Salvador Said Fernández por la enseñanza, dirección, asesoría y amistad que me brindó en el presente trabajo.

A la Dra. Herminia Guadalupe Martínez Rodríguez por su asesoría, confianza y estímulo.

Al Biol. Mario R. Morales Vallarta y al Biol. Jorge Verduzco Martínez por sus consejos y revisión del manuscrito de ésta tesis.

A los Drs. Gilberto Molina Ballesteros y Dr. Gerardo Forsbach Sánchez, quienes fungieron como Directores de la Unidad de Investigaciones Biomédicas del Noreste, durante la elaboración del presente trabajo, por las amplias facilidades que me otorgaron.

Al Dr. Raúl Garza Chapa, Jefe de la Sección de Genética de la UNIBIN por sus consejos y apoyo.

Al Dr. Alejandro Alagón Cano, por sus valiosas observaciones, sugerencias y facilidades.

Al C.P. Ignacio Atristain Alarcon, administrador de la UNIBIN, por el apoyo y confianza que me otorgó.

Al Médico Cirujano Juan Antonio Luna de la Rosa, por el excelente trabajo gráfico que ilustra ésta tesis.

Al Biólogo Ricardo Martín Cerda Castillo por su valiosa ayuda en el análisis estadístico de los resultados.

A la Q.B.P. Adriana Gricelda Medrano Castillo por su inapreciable compañía, estímulo y por la ayuda en la escritura de ésta tesis.

A los integrantes del Laboratorio de Bioquímica de Parásitos; Sección de Biología Celular: M. en C. Benito David Mata C., Q.F.B. Leticia Navarro Marmolejo, Biol. Jorge Castro Garza, M.C.V. Gerardo Lozano Garza y Victoria Moreno, 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 hidrolasas conocidas con el nombre genérico de esterases. Se dividen en A1, A2, B, C, D.

Las fosfolipasas A se localizan principalmente en la membrana plasmática de todas las células estudiadas hasta ahora y en los lisosomas de los eucariotes. También pueden encontrarse en forma soluble, como parte de los venenos de insectos y reptiles o toxinas de microorganismos.

Las fosfolipasas son parte esencial de diversos mecanismos biológicos fundamentales: i) intervienen en el recambio de fosfolípidos membranales, ii) actúan como enzimas digestivas y iii) participan en el mecanismo de la regulación génica.

Hace algunos años se encontró que los extractos totales de trofozoítos del género Entamoeba tienen actividad hemolítica y citolítica -sobre eritrocitos de varias especies de mamíferos y las células CHO respectivamente-. La mayor parte de ambos efectos residen en una fracción vesicular llamada P30. Es sedimentable a 30 000 g y es máxima a pH 8.0 en presencia de calcio 1 mM.

Recientemente se encontró que la actividad hemolítica se debe a dos componentes: uno termoestable y el otro termolábil. El primero está constituido por ácidos grasos libres; posiblemente generados por el efecto de una citolisina termolábil, una fosfolipasa A.

En este trabajo nos propusimos caracterizar dicha actividad enzimática para después intentar su purificación y finalmente evaluar su contribución

específica a la virulencia de E. histolytica.

Adaptamos un método para determinar actividad fosfolipásica en extractos libres de trofozoítos de E. histolytica que consistió de dos etapas: a) la determinación de la actividad fosfolipásica por un agente bien caracterizado, la fosfolipasa A2 de veneno de abeja, con el cual determinamos las condiciones experimentales que después usaríamos sistemáticamente y b) la caracterización de la actividad fosfolipásica causada por los extractos amibianos.

Observamos una liberación reproducible de [³H]LFC, [³H]GFC, [¹⁴C]LFC, o [¹⁴C]AGL, de acuerdo con el sustrato utilizado. Las cantidades de los productos radiactivos se incrementaron en función de la dosis de P30 y del tiempo de incubación, entre 0 y 45 min.

Cuando analizamos el efecto del pH, calcio, y EDTA sobre la actividad fosfolipásica de P30 observamos que esta fue máxima a pH 3.5 y 8.0, cuando estudiamos el efecto de calcio encontramos un pico de actividad cuando adicionamos calcio. Sin embargo la hidrólisis específica de [³H]FC fue del 50% con respecto a la actividad máxima en las mezclas a las que no añadimos calcio. Por ello analizamos el efecto del EDTA en ensayos sin calcio y encontramos que la actividad hidrolítica se incrementó linealmente con respecto a la concentración, hasta 20 mM del quelante.

Como cuando usamos como sustrato [¹⁴C]FC, marcado en el ácido graso esterificado en la posición 2 del glicerol, observamos una liberación tanto del ác. [¹⁴C]palmítico, como de [¹⁴C]LFC. Por esto concluimos que P30 contiene una fosfolipasa A1 y posiblemente una A2 y/o una lisofosfolipasa. Para confirmar la presencia de la lisofosfolipasa en P30 utilizamos un

sustrato específico ($[^{14}\text{C}]\text{LFC}$), con el cual encontramos un incremento claro de radiactividad en la mancha del ác. $[^{14}\text{C}]\text{palmítico}$.

Por otro lado, comparamos mediante la prueba de T de Student los valores normalizados correspondientes a ác. $[^{14}\text{C}]\text{palmítico}$ y a $[^3\text{H}]\text{GFC}$; el primero por ser un producto específico tanto de una fosfolipasa A2 como de una lisofosfolipasa y el segundo exclusivamente de una lisofosfolipasa. Encontramos que el producto común de ambas actividades era significativamente mayor (la P de que ambos valores fueran iguales fue <0.0005). Concluimos entonces que en P30 hay una lisofosfolipasa y una fosfolipasa A2, además de una fosfolipasa A1, previamente detectada.

Por último analizamos el efecto del inhibidor de Rosenthal y del 1 (11 carboxinonil)-2-hexadecil-glicero-3-fosfatidilcolina. Ambos compuestos son inhibidores específicos de fosfolipasas A. Encontramos que la actividad fosfolipásica total de P30 disminuyó un 91 y 78% con respecto a los testigos no tratados.

Por los resultados anteriores llegamos a las siguientes conclusiones:

- 1) Desarrollamos un método confiable para cuantificar actividad fosfolipásica en muestras particuladas y complejas.
- 2) Confirmamos la existencia en P30 de un efecto hidrolítico sobre fosfolípidos.
- 3) La actividad fosfolipásica de P30 se debe en realidad al efecto de dos tipos de fosfolipasas, una cuya actividad máxima se detecta a pH 3.5 y otra a pH 8.0. Posiblemente la primera no requiere calcio y la otra si la requiere, llegamos a esta deducción porque: Las condiciones de la hemolisina caracterizada por Said-Fernández y López-Revilla, requiere calcio y su pH óptimo es 8.0.
- 4) Lo más probable es que la fosfolipasa básica dependiente de calcio sea el factor hemolítico termolábil, que a su vez genera al factor hemolítico termoestable (ácidos

grasos libres). 5) P30 posee en realidad dos tipos de fosfolipasas, una A1, y otra A2, además de una lisofosfolipasa. En este trabajo no detectamos a cual de las dos corresponde la hemolisina termolábil. 6) Ambas fosfolipasas son inhibibles por los análogos de FC probados, lo que abre la posibilidad inmediata de intentar la purificación de las fosfolipasas amibianas. -

Los modelos in vitro, como el que presentamos en este trabajo, constituyen un avance en el proceso de identificación de los posibles factores patogénicos amibianos. Nuestro método experimental y la información que obtuvimos de él abren la posibilidad inmediata de caracterizar e identificar los factores citolíticos que podrían estar implicados en la virulencia amibiana.

I. INTRODUCCION

Las fosfolipasas son enzimas ubicuas (1), que pertenecen al grupo de las hidrolasas conocidas con el nombre genérico de esterases (2,3).

Clasificación

Las fosfolipasas más comunes se dividen en: A1,A2,B,C,D, de acuerdo con la posición del éster que hidrolizan preferentemente (Fig.1)(2). Muchas de estas actúan con mayor eficiencia sobre un tipo específico de acil fosfátidos (cfr.refs.4-7), p.e., la fosfolipasa A2 de Crotalus adamanteus hidrolisa preferentemente fosfatidilcolina (8), y la de mitocondrias de hígado de rata fosfatidiletanolamina (9).

Características generales de las fosfolipasas A

Las fosfolipasas A se localizan principalmente en las membranas plasmáticas y en los lisosomas de todas las células estudiadas hasta ahora (1), pero también pueden encontrarse en forma soluble, principalmente formando parte en los venenos de hongos y de animales o de toxinas de microorganismos (10,11). Las fosfolipasas celulares son esenciales en diversos mecanismos fundamentales para la vida: i) intervienen en el recambio de fosfolípidos membranales (1,3), ii) actúan como enzimas digestivas en los fagosomas (1), ó iii) participan en el mecanismo de la regulación de la expresión génica mediante la producción de ácidos grasos libres, a partir de los cuales las ciclooxigenasas sintetizan las prostaglandinas, que finalmente intervienen en muy diversos mecanismos de regulación celular (1,3). Las fosfolipasas membranales se hallan estrechamente asociadas a la bicapa lipídica membranal y se inactivan rápidamente cuando se les separa de ésta matriz con disolventes orgánicos. Pero se mantienen estables, e incluso se

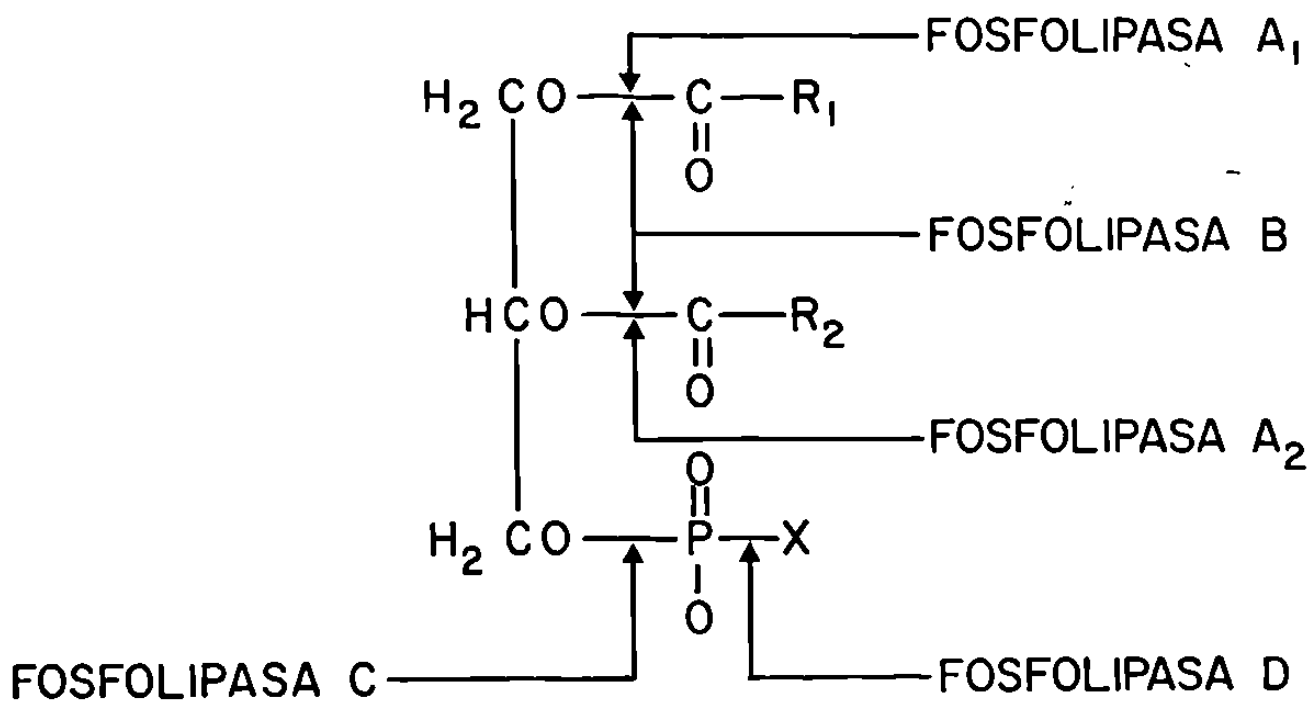


Fig. 1. Clasificación de las fosfatido-acil hidrolasas, de acuerdo con la posición en la molécula del éster que hidrolizan.

activan en presencia de detergentes no iónicos (cfr. refs. 6-10), que mimetizan el ambiente hidrofóbico original de estas enzimas. Un gran número de fosfolipasas A1, A2, B y C requieren la presencia de agentes tensoactivos naturales, tales como: i) ácidos grasos libres, ii) fosfolisoderivados ó iii) factores líticos directos. Los cuales son péptidos anfipáticos, lineales con 20 a 30 residuos. Estos últimos frecuentemente están asociados a las fosfolipasas solubles en venenos de reptiles e insectos en los mecanismos citolíticos correspondientes (1,10,11). Algunas otras fosfolipasas lisosomales se activan por efecto del colesterol, mediante un mecanismo aún no determinado (12). El pH, la temperatura de incubación, el calcio y magnesio son los factores que más influyen en la actividad de la mayoría de estas enzimas (3,5,10,13,14).

Métodos de ensayo

Los métodos de ensayo para las fosfolipasas A, de los más diversos orígenes, se fundamentan en la cuantificación de los ácidos grasos libres y la de los fosfolisoderivados producidos por la hidrólisis de los fosfolípidos correspondientes. Dos de los métodos que se usan con mayor frecuencia por su confiabilidad, precisión y sencillez son a) el titulométrico y b) el radioensayo. El primero consiste en la cuantificación de la cantidad de hidróxido de sodio (expresada en nanomoles) necesario para mantener estable el pH de la mezcla de ensayo por un tiempo fijo, la cual es proporcional al número de moléculas de ácidos grasos liberados y por lo tanto, a la actividad de la enzima (cfr. ref.15). El segundo método se basa en la separación por cromatografía en placa fina de los productos de hidrólisis y el sustrato no hidrolizado marcados con radioisótopos en sitios específicos, para después cuantificar la radiactividad en las manchas lipídicas correspondientes. Las dpm porcentuales en los productos de hidrólisis son proporcionales a la

actividad expresada en nanomoles, de fosfolípidos hidrolizados y consecuentemente, a la actividad de la enzima (16).

El radioensayo permite también determinar con precisión el tipo a que pertenece la fosfolipasa en estudio, dependiendo de la localización de la marca radiactiva en los fosfolípidos y en los productos de hidrólisis: p.e. si la marca se localiza originalmente en la cadena alifática que ocupa la posición 1 en el fosfolípido, y la actividad aparece en la mancha cromatográfica correspondiente a los ácidos grasos, pero no en la de los fosfolisoderivados, la enzima es una fosfolipasa A₁; en el caso contrario es una A₂(2,4,8) (Fig.1).

Purificación de fosfolipasa A asociada a membrana

Los métodos que se usan con mayor frecuencia para purificar las fosfolipasas asociadas a membrana son: a) cromatografía de exclusión molecular, (4,17); b) cromatografía de intercambio iónico (7); y c) cromatografía de afinidad, uno de los métodos más rápidos, eficientes y específicos. Las columnas para esta clase de cromatografía se construyen con análogos de lecitina acopladas covalentemente a Sepharosa 4B. En un solo paso pueden obtenerse las fosfolipasas prácticamente puras, con muy altos rendimientos (13,14). Una condición indispensable para evitar la desnaturalización de las fosfolipasas asociadas a membrana durante su purificación es que el eluyente contenga entre 0.5 y 1% de un detergente no iónico, y el extracto crudo este libre de proteasas (9,13).

Antecedentes de la actividad fosfolipásica de *E. histolytica*

Los trofozoítos de *E. histolytica* cultivados axenicamente tienen actividad de fosfolipasa A (18) pero no se ha determinado si ésta es A₁ o A₂. El mayor contenido de esta fosfolipasa (84%) se localiza en la fracción

vesicular llamada P30. Sus principales sustratos son: fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y esfingomiélin. Es detectable en una mezcla de reacción que contiene calcio 1mM en solución salina balanceada de Hanks, ajustada a pH 8.0 (19). Esta enzima no es extraíble mediante choques hipotónicos con agua destilada o concentraciones variables de etanol, cloroformo-metanol (2:1) o EDTA (Said-Fernández, comunicación personal). Por ello, es posible que la fosfolipasa amibiana, como muchas otras, sea lábil en medios hidrofílicos y requiera la presencia de agentes tensoactivos; tanto para estabilizar su estructura como para su adecuado funcionamiento.

Hipótesis

Las fosfolipasas A de venenos de hongos, plantas y animales, las de un gran número de microorganismos patógenos y las de linfocitos de mamífero son potentes citolisinas (7,10,11,12,13,16,20). En el mecanismo patogénico de algunos protozoarios, las citolisinas con actividad fosfolipásica juegan un papel determinante: el ciclo vital de algunas especies de Babesia y Plasmodium dependen de la hemólisis de los parásitos intraeritrocíticos, la cual se produce por la actividad de una fosfolipasa A2 (12) y en las enfermedades producidas por varias especies de Tripanosomas, este mismo tipo de actividades enzimáticas es responsable de diversos síntomas (12,21).

E. histolytica es otro protozoario patógeno, cuya propiedad más notable es la de destruir tejidos. La que a su vez, parece depender de la fagocitosis (22,23) y de la citólisis por contacto (24,25). En modelos in vitro de interacción de trofozoítos enteros o de extractos amibianos con células susceptibles de mamífero, la actividad citolítica amibiana parece depender de una fosfolipasa A (18,26). La cual reside fundamentalmente en la fracción vesicular (lisosomal) llamada P30 (19). Por ello, la fosfolipasa amibiana

podría ser un factor relevante en el mecanismo patogénico de la amibiasis.

Secuencia del trabajo experimental

Dividimos este trabajo en cuatro partes. 1) La primera consistió en el desarrollo de un modelo experimental que permitió la determinación de la actividad fosfolipásica de la fracción amibiana P30. Esto implicó a) la determinación de la radiactividad producida por cantidades variables de un agente bien caracterizado: La fosfolipasa A2 de veneno de abeja (3), con lo cual pudimos efectuar los diferentes ensayos con resultados predecibles, para después analizar la actividad enzimática amibiana en cuestión y b) la determinación de la relación temporal de la actividad fosfolipásica producida por dosis fijas de extracto amibiano. 2) En la segunda etapa determinamos las condiciones óptimas para el funcionamiento in vitro de esta actividad. Lo cual incluyó el análisis de los efectos de los siguientes factores: a) pH, b) la concentración de calcio y c) la concentración de EDTA. 3) En la penúltima fase clasificamos las fosfolipasas de P30, e hicimos un descubrimiento importante: la actividad fosfolipásica se debe en realidad a cuando menos dos enzimas: una A1 y otra A2, una que requiere calcio y la otra que no lo requiere; una cuya máxima actividad se detecta a pH 3.5 y otra a 8.0. Como la actividad hemolítica descubierta y caracterizada por Said-Fernández y López-Revilla (27) es máxima a pH 8.0 en presencia de calcio (19), la fosfolipasa básica, dependiente de calcio muy posiblemente corresponde a la hemolisina termolábil amibiana (18). La fosfolipasa acídica quizás sea un agente potenciador o simplemente no intervenga en el efecto lítico. Encontramos además que P30 tiene una actividad reproducible de lisofosfolipasa, la cual también puede tener importantes implicaciones en la patogenia amibiana. 4) La última parte de la tesis consistió en la determinación del efecto de dos análogos de fosfatidilcolina, bien

caracterizados como inhibidores específicos de fosfolipasas A: a) el 2,3-distearoiloxipropil(dim- etil)-B-hidroxi-etilamonio acetato mejor conocido como inhibidor de Rosenthal (28) y b) el 1(11-carboxi)-undecil-2hexadecil-glicero-3-fosfatidilcolina (13,14). Estos inhibidores actuaron con mucha eficiencia sobre la actividad fosfolipásica-amibiana total, lo que indica que todas las fosfolipasas A de P30 son inhibibles con dichos reactivos. Este hallazgo abre la posibilidad inmediata de purificar las tres fosfolipasas detectadas en este trabajo, mediante cromatografía de afinidad.

Contribución y perspectivas del presente trabajo

Consideramos que la principal contribución al campo de la amibiasis experimental aportado por nuestro trabajo, es la caracterización de la actividad fosfolipásica en extractos crudos de trofozoítos de E. histolytica que permitiría, con mucha probabilidad, purificar a las enzimas que aquí detectamos. El aislamiento de éstas, a su vez, permitiría quizás analizar la participación de estos factores en la virulencia de E. histolytica.

Las perspectivas a largo plazo consisten en aprovechar las citolisinas amibianas aisladas como inmunógenos o reactivos confiables para el diagnóstico preciso y oportuno de la amibiasis invasora.

II. MATERIALES

A. Origen de los reactivos.

Obtuvimos de Sigma Chemical Company (Saint Louis, Missouri, EUA), de grado reactivo: L-cisteína, ácido ascórbico, seroalbúmina bovina (fracción V), L- α -fosfatidilcolina, fosfolipasa A2 de veneno de abeja, reactivo de Folin-Cicalteau, lauril sulfato de sodio, trisma base, trisma-HCl, glicina, histidina y glutámico.

Adquirimos de Merck México, S.A., el 2,5-difeniloxazole (PPO), 2,2'-p-fenilenbis(5-feniloxazol) (POPOP), cloruro de calcio, cloruro de sodio, nitrato de bismuto, ioduro de potasio, ácido acético glacial, placas de cromatografía, metanol; de Reactivos Monterrey, S.A.: Carbonato de sodio, ácido clorhídrico, cloruro de calcio, hidróxido de sodio, cloroformo, iodo resublimado, tolueno, fosfato de potasio monobásico, fosfato de potasio dibásico; Bioxón de México, S.A.: Peptona de caseína, glucosa; Inhibidor de Rosenthal de Calbiochem; L-Distearoil- α -glicerilfosforil-N-N', Dimetiletanolamina, L-2-3-Dihexadecilglicero-1-fosforilcolina de Beckten-Dickinson and Co.; L-distearoil- α -glicerilfosforil, N,N', dimetiletanolamina, L- α -cefalín dipalmitoil, L-dipalmitoil- α -glicerilfosforil N,N' dimetiletanolamina de Dickinson and Co.; rac 1-(11 carboxi)-undecil-2-hexadecil-glicero-3-fosfatidilcolina de R. Berhtold Mattenhofs; L-1-lisopalmitoil-L-1-[palmitoil-1 C]fosfatidilcolina, L- α -dipalmitoil-[2-palmitoil-1-¹⁴C]-fosfatidilcolina, L-dipalmitoil [colina-metil-³H]fosfatidilcolina de New England Nuclear (Boston Mass. EUA), Suero de caballo de Química de Fosfatos, S.A.

B. Material biológico.

Cepa HK9 de E. histolytica (Diamond, 1968).

Proviene del cepario del Dr. López-Revilla, del Departamento de Biología Celular, CINVESTAV, IPN, México D.F., y la hemos cultivado axénicamente en nuestro laboratorio durante 3 años.

C. Preparación del medio de cultivo PEHPS-1

Medio basal (PEHP).

Peptona de caseína 5 g; D-glucosa 3 g; L-cisteína 0.5 g; ácido ascórbico 0.1 g; NaCl 0.2 g; KH_2PO_4 0.3 g; K_2HPO_4 0.5, Extracto de hígado y pancreas 125 ml.

Mezclamos 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, o bien 80 ml. en botellas de borosilicato con tapón de rosca. Esterilizamos el medio en autoclave por 15 min. con los tapones flojos, los que apretamos después, estando los recipientes todavía calientes. Almacenamos el medio a temperatura ambiente, por no más de quince días.

Suero de caballo

Descongelamos el suero en baño maría a 36°C y lo descomplementamos a 56°C por 30 min, agitándolo suavemente cada 5 min. Transferimos asépticamente 10 ml del suero a tubos estériles de borosilicato con tapón de rosca y los incubamos a 36°C por 5 días, para comprobar su esterilidad y lo almacenamos a -20°C.

Medio completo (PEHPS-1)

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

D. Composición y preparación de las soluciones

Indicamos la concentración de las soluciones madres con un número seguido de una X, que representa su concentración respecto a la solución de trabajo (o solución 1X).

Fosfolipasa A2 de veneno de abeja 100X

Fosfolipasa A2 de veneno de abeja 1 mg.

Disolvimos el componente en 8 ml. de agua bidestilada estéril, aforamos la solución a 10 ml. y la distribuimos en volúmenes de 1 ml. a viales de 1.5 ml. con tapón de rosca (Bellco, vineland) y la almacenamos en atmósfera de nitrógeno a -70°C .

Fosfolipasa A2 de veneno de abeja 1X

Preparamos la solución de trabajo diluyendo 0.1 ml. de la solución 100X con 9.9 ml. de agua bidestilada estéril y la almacenamos a -70°C , en alícuotas de 1 ml.

Tris-HCl 10X

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 , diluida en porciones de 1 ml.

Tris-HCl 1X.

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

Solución amortiguadora de fosfatos (PBS).

NaCl 6.5 g; K_2HPO_4 2.8 g; KH_2PO_4 0.5 g.

Disolvimos los componentes en 100 ml. de agua bidestilada estéril, ajustamos el pH a 7.4-7.5 con NaOH 10N, esterilizamos la solución en autoclave y la almacenamos a 4°C, dividida en porciones de 10 ml.

$CaCl_2-2H_2O$ 10X.

$CaCl_2-2H_2O$ 36.8 mg.

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

Tritón X100 10X.

Tritón X100 1 ml.

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

Reactivo de Dragendorff (solución concentrada)

Solución 1.- Nitrato de bismuto 1.7 g. Disolvimos en 100 ml. de ácido acético al 20% y almacenamos en un frasco envuelto en aluminio.

Solución 2.- Ioduro de potasio 40 g. Disolvimos en 100 ml. de agua bidestilada estéril y lo almacenamos en un frasco envuelto en aluminio.

Reactivo de Dragendorff (solución de trabajo)

Mezclamos 21 ml. de la solución 1 y 5.26 ml. de la solución 2 y aforamos a 100 ml. con agua bidestilada; usamos inmediatamente después de ser

preparada.

Solución de cloroformo metanol (2:1).

Cloroformo 300 ml; Metanol 150 ml. Mezclamos los componentes y almacenamos a temperatura ambiente.

Mezcla crómica.

Dicromato de potasio 100 g. Disolvimos el componente en 750 ml de agua bidestilada y ésta solución se depositó en un recipiente extendido, de polipropileno o de vidrio, colocado sobre abundante hielo picado y después se incorporaron lentamente a la mezcla 250 ml. de H_2SO_4 concentrado, agitando suavemente. La mezcla crómica se almacenó a temperatura ambiente en un recipiente de polipropileno (Nalgene).

Mezcla de ensayo 2X.

Mezclamos los siguientes componentes: 200 μ l de Tris-HCl (10X); 200 μ l de $CaCl_2$ (10X); 200 μ l de Tritón X100 (10X); 2 μ l de fosfatidilcolina de yema de huevo (1 mg/10 ml); 200 μ l de fosfatidilcolina marcada con radiactividad en diferentes partes de la molécula. Después se aforó a 1 ml con agua bidestilada y se sonicó (sonicador LAB-LINE INSTRUMENTS, INC. MELROSE PARK, ILL. 60160) a 40 Whats por 60 seg. Usamos inmediatamente la mezcla de ensayo ó la almacenamos en atmósfera de nitrógeno a $-70^\circ C$.

Mezcla para parar la reacción.

Mezclamos 18 mg de un digerido (3 mg de ovolecitina + 300 mU de fosfolipasa A2 de veneno de abeja incubadas por 30 min. a $37^\circ C$; 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 y 1 ml. de TCA en butanol al 5%. Almacenamos en alícuotas de 1 ml. a -20°C .

III. METODOS

A. Tratamiento del material para cultivo

El tratamiento del material y los métodos de cultivo, de resiembra y de cosecha de amibas son los descritos por López-Revilla y Rodríguez-Báez (29). El medio PEHPS-1 fue desarrollado por nuestro grupo de trabajo, en la división de Biología Celular, UNIBIN, IMSS (datos no publicados).

Lavado y esterilización

El lavado de tubos y botellas para cultivo comprendió los siguientes pasos: 1)enjuague por lo menos de 12h en cloralex diluido al 1% en agua de la llave, 2)tallado con escobillón, 3)cuatro enjuagues con agua de la llave, 4)enjuague por 12h con 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. Los tubos y botellas con las bocas y cuellos cubiertas con hojas dobles de papel aluminio, se esterilizaron en un horno a 200°C por 3h y se almacenaron en gavetas cerradas.

Las pipetas serológicas (Bellco Glass Inc. N.Y. EUA) y las pipetas pasteur se lavaron mediante: 1)remojo en microquat al 1% (en pipeteros de polipropileno Nalgene Labware Division, N.Y. EUA) por 12h, 2)enjuague en un sifón (Nalgene) para lavar pipetas por lo menos 2h, 3)remojo en mezcla crómica por 12h, 4)enjuague en sifón por 1h y 5)dos enjuagues por inmersión en pipeteros con agua destilada. Las pipetas se secaron en el horno a 200 °C durante 60 min, colocadas verticalmente con la punta hacia arriba en canastillas metálicas. Las pipetas pasteur y serológicas se esterilizaron envueltas en papel aluminio en el horno a 200°C por 3h.

Los tapones de tubos y botellas se enjuagaron en microquat al 1% por 12h y después se lavaron como los tubos y botellas, dejándolos escurrir para secarlos.

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. Los tubos contaminados con material biológico se esterilizaron en autoclave y después se lavaron como los tapones.

B. Tratamiento del material para cromatografía

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 con el material colocado boca abajo en canastillas metálicas, 6)enjuague por 12h 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 3h, 11)los bulbos y tapones se dejaron secar a temperatura ambiente y se almacenaron en recipientes libres de lípidos y herméticamente cerrados. Todo este material se manipuló con guantes de polietileno.

C. Cultivos amibianos axénicos

Resiembra y cosecha

Incubamos la cepa HK9 de E. histolytica a 36 °C en una incubadora de CO₂ (National Appliance Co.). Antes de cada resiembra observamos los cultivos con el microscopio invertido (Biovert, Reichert, Austria) para comprobar el buen aspecto morfológico y la movilidad de las amibas. Después sumergimos las

botellas o los tubos en agua-hielo por 10 min, los agitamos suavemente, determinamos la concentración amibiana, con un hematímetro (American Optical Scientific Instrument Div.) e inoculamos un número conocido de amibas en tubos o botellas que contenían medio PEHPS-1 (datos no publicados) fresco.

Cosechamos las amibas mediante enfriamiento de los cultivos en agua-hielo por 10 min, la centrifugamos a 600 Xg en una centrífuga DPR 6 000, Damon/IEC por 15 min a 4°C y las lavamos con PBS.

Mantenimiento de la cepa HK9.

Mantuvimos la cepa HK9 resemebrándola a 3 tubos por vez: del mejor incubamos 1 000 trofozoítos por ml. a cada uno de los 3 nuevos tubos con medio fresco. Conservamos los de la penúltima resiembra hasta comprobar el crecimiento de las amibas y la ausencia de contaminación en los cultivos recién sembrados. Obtuvimos los cultivos masivos para los experimentos sembrando botellas con 125 ml. ó de 1 l. de PEHPS-1 fresco, a partir de un tubo de referencia.

La Fig. 2 corresponde a una curva típica de crecimiento donde se observa una ausencia de la fase Lag de crecimiento.

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

$$\text{Número de amibas/ml} = e^{0.037390(\text{h de incubación}) + 7.2838}$$

$$\text{Correlación con la recta } r^2 = 0.9937$$

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

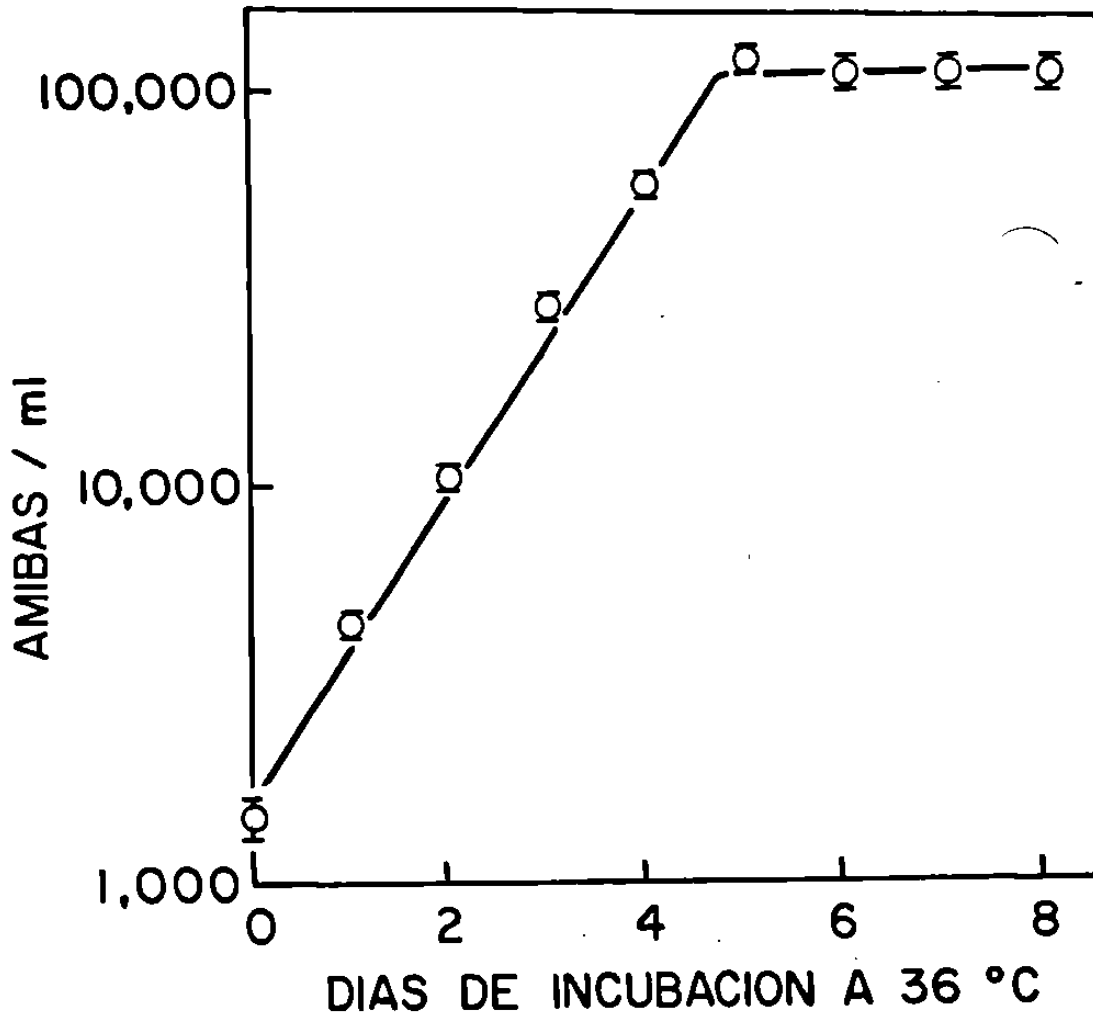


Fig. 2. Relación temporal del crecimiento de la cepa HK9 de E. histolytica. Inoculamos por triplicado 1000 amibas por mililitro en tubos con 5 ml. de PEHPS-1. Después de diferentes tiempos de incubación a 37 °C determinamos la densidad de los cultivos con un hematímetro. Cada punto corresponde a tres determinaciones independientes. El coeficiente de correlación con la recta (r^2)=0.9937; $P < 0.001$.

fisiológicas.

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

En la Fig. 3 esquematizamos el método de sedimentación fraccionada que utilizamos para obtener los extractos amibianos:

Extractos totales

Resuspendimos los trofozoítos lavados con dos volúmenes de Tris-HCl 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. EUA), activado con un motor eléctrico a 1 000 rpm. Después de éste tratamiento no observamos trofozoítos enteros.

Obtención de P30

Centrifugamos el extracto total a 135 Xg por 15 min. y obtuvimos un sedimento, la fracción nuclear (N) y el sobrenadante correspondiente, que centrifugamos a 30 000 Xg por 30 min. y el sedimento correspondió a la fracción P30, la cual resuspendimos con un volumen de Tris-HCl. Durante éste proceso, manipulamos todas las muestras a 4°C.

E. Cuantificación de proteínas

Determinamos la concentración de proteínas en muestras biológicas mediante el método de Lowry et. al. (30). En tubos de ensayo colocamos muestras por triplicado de 0.2 ml. que contenían entre 20 y 100 µg de proteínas; 1 ml. de reactivo C (1 ml. de tartrato de sodio al 1% y sulfato de cobre al 0.5%, diluído en 50 ml. de carbonato de sodio al 2% e hidróxido de sodio al 0.1 N), agitamos las muestras con un vórtex y las incubamos 10 min. a temperatura ambiente; después añadimos a cada tubo 0.1 ml. de reactivo de

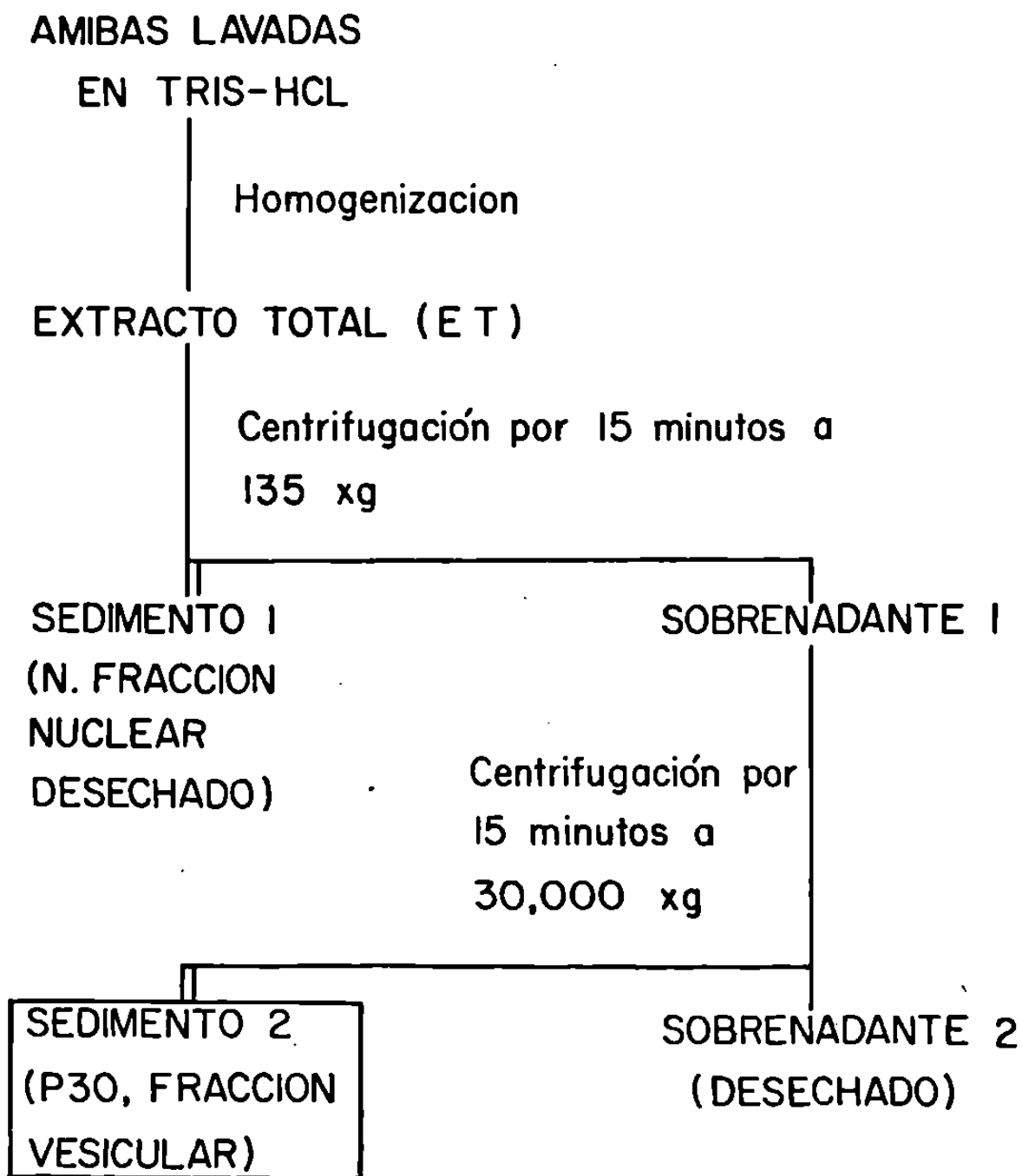


Fig. 3. Obtención de las fracciones subcelulares amibianas.

Folin-Ciocalteu 1 N, diluido en HCl 1 N agitamos inmediatamente después con un vórtex, incubamos las muestras 30 min. a temperatura ambiente y determinamos la densidad óptica de cada una de ellas a 750 nm (DO 750) en un espectrofotómetro (Zeiss, modelo PMQIII, Alemania). Calculamos la masa de proteínas de las muestras ambientales con la ecuación que determinamos al analizar, por regresión lineal, la relación de la DO750 con respecto a cantidades variables de seroalbúmina bovina. Obtuvimos ésta ecuación por cada una de las determinaciones realizadas.

F. Métodos para determinar la actividad fosfolipásica

Mezclamos en tubos de 15X15 mm (de borosilicato, Bellco) 10 μ l. de la mezcla de ensayo 2X (Tris-HCl, CaCl₂, Tritón X100, FC) y 4 μ Ci de [³H]FC ó [¹⁴C]FC. Después añadimos a cada tubo cantidades variables de fosfolipasa A2 de veneno de abeja, de P30 o de SAB -como testigo negativo- e incubamos las mezclas por 45 min. a 37°C. Después de ello añadimos a cada tubo 25 μ l. de una mezcla de FC, AGL, LFC en TCA-butanol al 5% para parar la reacción, agitamos los tubos por 15 seg. con un vórtex. Después separamos los lípidos de cada muestra mediante cromatografía en placa fina (31).

G. Cuantificación de la actividad fosfolipásica

Determinamos la radiactividad en las cromatoplasmas eluidas por raspado de las manchas correspondientes al sustrato no hidrolizado ([³H]FC ó [¹⁴C]FC) y a los productos de hidrólisis ([³H]LFC ó [¹⁴C]LFC, [³H]AGL y [¹⁴C]AGL). Raspamos la silica gel de cada mancha lipídica y la mezclamos con 5 ml. de coctel 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 (Tri-Carb, Packard, modelo 3 000 EUA) ajustado a una eficiencia del 60%.

H. Cromatografía en placa fina

Cargamos las cámaras cromatográficas (de borosilicato, 8X23X23.5 cm. SMI) con una mezcla de disolventes para lípidos polares (cloroformo-metanol-ác. acético-agua, 170:40:16:8) y las dejamos saturar por 12h a temperatura ambiente selladas herméticamente (31).

Aplicación de la muestra y cromatografía

Aplicamos 25 μ l. de cada muestra gota a gota con una jeringa Hamilton de 50 μ l, a 3 cm. del borde inferior de las cromatoplasas y 1 cm. del borde izquierdo; los 8 restantes cada 2 cm. Secamos las muestras con un calentamiento ligero con aire de un secador de pelo.

Colocamos verticalmente las cromatoplasas dentro de las cámaras presaturadas; cerramos herméticamente las cámaras, dejamos ascender 17 cm. de la fase líquida sobre las cromatoplasas y evaporamos los disolventes de las placas con aire caliente por 15 min.

I. Identificación de los lípidos

Revelamos las manchas de fosfatidilcolina y sus lisoderivados como puntos anaranjados y fondo amarillo al rociar las cromatoplasas con el reactivo de Dragendorff (cuatro partes de nitrato de bismuto al 1.7% en ácido acético al 20% v/v, una parte de ioduro de potasio al 40% y catorce partes de agua) (31) y calentamos ligeramente la cromatoplasa o colocando las cromatoplasas verticalmente dentro de cámaras saturadas con vapores de yodo, con lo cual las manchas lipídicas se revelaron como puntos amarillos o cafés sobre fondo blanco (31,32,33).

J. Obtención de lípidos

Obtuvimos estandares originales de fosfatidilcolina y

lisofosfatidilcolina a partir de lípidos totales de hígado de rata; partimos de 3 hígados de rata Long Evans picados con tijeras y lavamos 3 veces con PBS, precipitamos con TCA al 5% y centrifugamos por 15 min. a 600 Xg, el sedimento lo resuspendimos en 8 volúmenes de metanol (50°C) y 16 volúmenes de cloroformo, centrifugamos 15 min. a 600 Xg y obtuvimos la fase lipídica en la parte inferior del tubo, la interfase y en parte superior del tubo la fase acuosa. Secamos cada extracto con una corriente de nitrógeno, determinamos su peso seco y después la resuspendimos con cloroformo, ajustando su concentración a 10 mg./ml. Distribuimos los extractos en recipientes de vidrio y los almacenamos en atmósfera de nitrógeno a -70°C.

Obtuvimos los ácidos grasos libres colocando 150 mg. de lípidos totales de hígado de rata en un tubo de borosilicato (cónico, graduado de 15 ml. con tapón de rosca, Corning), evaporamos el disolvente con una corriente de nitrógeno, añadimos 4 ml. de KOH 4 N y 4 ml. de etanol absoluto y agitamos el contenido con una pipeta pasteur; tapamos el tubo los sumergimos en baño maría a 70°C por 4h, dejamos enfriar el contenido a temperatura ambiente y extrajimos 4 veces con 7 ml. de éter de petróleo el material no saponificable. Ajustamos a pH 1.0 con HCl concentrado la fase acuosa que contenía los ácidos grasos como jabones y extrajimos 4 veces sucesivas los ácidos grasos con éter de petróleo. Evaporamos el disolvente con nitrógeno, pesamos el extracto seco, ajustamos su concentración a 10 mg/ml en cloroformo, lo distribuimos a frascos con tapón de rosca en volúmenes de 1 ml. y lo almacenamos en atmósfera de nitrógeno a -70°C.

K. Cuantificación de la actividad fosfolipásica de P30

A tiempos variables de incubación a 37 °C (entre 0 y 45 min.), determinamos la radiactividad presente en las manchas de las cromatoplasmas

eluidas correspondientes a los productos de hidrólisis ($[^3\text{H}]\text{LFC}$, $[^3\text{H}]\text{GFC}$, AGL y RI) y del sustrato no hidrolizado $[^3\text{H}]\text{FC}$, después de parar la mezcla de ensayo (adicionada con 4 μCi de $[^3\text{H}]\text{FC}$ y 368 μg de proteína total de P30 ó SAB como control) con 25 μl de la mezcla para parar la reacción. Hicimos la cuantificación de la radiactividad como en el inciso G.

L. Determinación de la actividad fosfolipásica de P30 en mezclas de ensayo con pH, calcio o EDTA variables

pH

Determinamos la actividad fosfolipásica de P30 añadiendo a la mezcla de ensayo 4 μCi de $[^3\text{H}]\text{FC}$ y 368 μg de proteína total de P30 y ajustandola a pH de 1.5, 2.0, 3.0, 3.5 con amortiguador de glicina II-HCl, pH 4.0 y 5.0 con ácido acético glacial a pH 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 con glicina, ácido glutámico, histidina, Tris-HCl.

Ca⁺⁺

Incubamos por 45 min. las mezclas de ensayo adicionadas con 4 μCi de $[^3\text{H}]\text{FC}$ y 368 μg de proteína total de P30 ó SAB -como control negativo- y 0, 1.0, 2.0, 4.8, 7.2, 9.6, 12, 15, 19.2 mM de CaCl_2 .

EDTA

Añadimos a las mezclas de ensayo 4 μCi de $[^3\text{H}]\text{FC}$ y 368 μg de proteína total de P30 ó SAB como control y EDTA 0, 2.0, 4.8, 9.6, 14.4, 19.2, 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 hidrólisis como explicamos en los incisos F a H.

M. Determinación de actividades lisofosfolipásicas

Determinamos actividad lisofosfolipásica de P30 y de una preparación comercial de veneno de abeja incubando cantidades variables de estas muestras en mezclas de ensayo adicionadas con 4 μCi de [^{14}C]LFC, usamos como testigo negativos mezclas de ensayo que contenían SAB en vez de fuentes de lisofosfolipasa. Las condiciones de incubación y análisis fueron las mismas que las que utilizamos para determinar la actividad fosfolipásica (inciso F a H).

N. Análisis estadísticos

a) Para conocer la significancia estadística entre la cantidad de [^{14}C]AGL y de [^3H]GFC. Tabla No. 1 analizamos los picomoles de cada punto, tomando como base la radiactividad específica de los mismos después normalizamos los valores y los analizamos mediante la prueba de T de Student. Empleamos en el análisis 21 datos independientes de cada serie.

b) Para comprobar la significancia estadística entre las cantidades fosfolipásicas de P30 detectada con cada concentración de calcio (inciso L) usamos la prueba de Barlette (35).

O. Efecto de inhibidores específicos sobre la actividad fosfolipásica de P30

Determinamos la actividad fosfolipásica de P30 y fosfolipasa A2 de veneno de abeja en una mezcla de ensayo adicionada con 21 mM de inhibidor de Rosenthal o de COO-FC, con 4 μCi de [^{14}C]FC y 368 μg de proteína total de P30. Después de 45 min. de incubación a 37°C cuantificamos la radiactividad de los productos de hidrólisis como se indica en los incisos F a H.

IV. RESULTADOS

I. Adaptación de un micrométodo para cuantificar actividad fosfolipásica

En la fracción vesicular P30 residen hemolisinas y citolisinas amebianas capaces de producir lesiones en la membrana plasmática de eritrocitos (27) y células de la línea CHO (35). En trabajos previos, se encontró que esta última actividad depende de la concentración de ácidos grasos libres que son generados probablemente por una fosfolipasa A (18). En vista de ello decidimos adaptar un método de ensayo que nos permitiera evaluar con precisión y reproducibilidad la actividad fosfolipásica de P30 para después identificar a la o a las enzimas responsables. El primer paso consistió en el desarrollo de un micrométodo basado en el descrito por Fred R. Opperdes y col. (16) en el que usamos como modelo fosfolipasa A2 de veneno de abeja, cuyas propiedades son ampliamente conocidas. Las mezclas de ensayo contenían Tris-HCl, como regulador de pH, FC fría, calcio 1 mM, Tritón X100, 4 µCi de [³H]FC y cantidades variables de fosfolipasa A2 de veneno de abeja.

Encontramos que las dpm correspondientes a [³H]FC, usado como sustrato, disminuyó con respecto a la cantidad de enzima añadida y se incrementaron proporcionalmente las dpm correspondientes a [³H]LFC, producido por la hidrólisis del fosfolípido radiactivo. Cuando añadimos cantidades variables de SAB, como fuente de proteína equivalente a la de la fosfolipasa de abeja, no observamos incremento en la concentración de los productos de hidrólisis, como era predecible (Fig. 4).

II. Determinación de la actividad fosfolipásica de P30

Una vez desarrollado y probado el modelo para cuantificar la actividad fosfolipásica intentamos detectar y cuantificar la de P30.

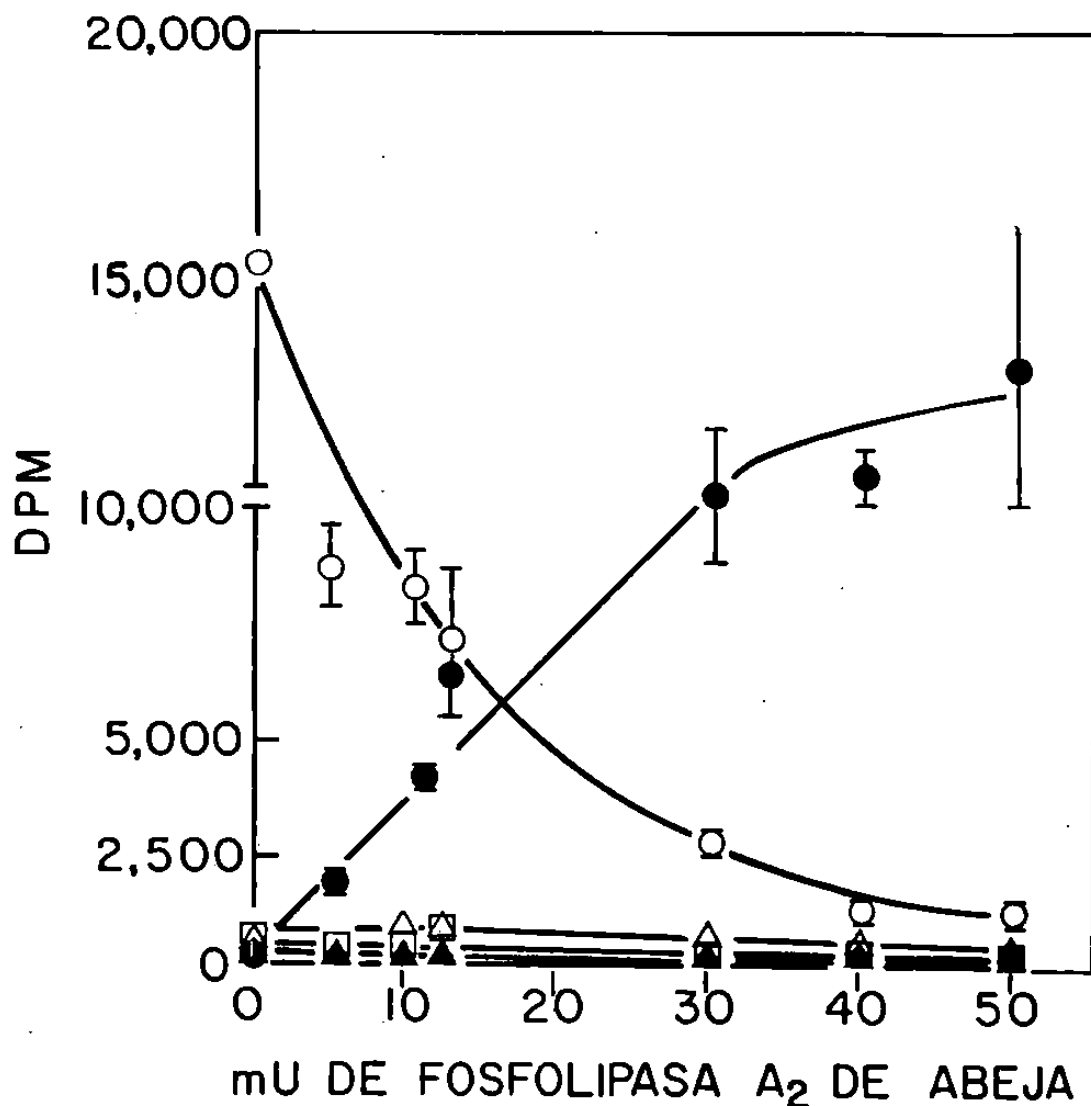


Fig. 4. Relación entre la cantidad de mU de fosfolipasa A2 de veneno de abeja y la liberación del monoacil-gliceril-fosforil-[³H]colina. Incubamos por 45 min. a 37°C cantidades variables de fosfolipasa A2 de veneno de abeja o de SAB en 65 μ l de una mezcla de ensayo para fosfolipasa, ajustada a pH 8.0 y adicionada con 4 μ Ci de [³H]FC y calcio 1mM. Analizamos mediante cromatografía en placa fina el contenido en cada muestra de [³H]LFC (●); [³H]FC (○); [³H]GFC; AGL; y en los espacios libres de las cromatoplacas (□). Los símbolos corresponden al promedio y desviación estándar de 24 determinaciones y 8 experimentos independientes. Cuando analizamos el modelo sustituyendo a la fosfolipasa de abeja por cantidades equivalentes de SAB sólo encontramos radiactividad en la mezcla correspondiente a [³H]FC (○).

Al incubar a 37°C por tiempos variables con 368 µg de proteínas totales de P30, encontramos que la liberación [³H]LFC se incrementó linealmente en función del tiempo de incubación, entre 0 y 45 min. Lo que sugirió que la actividad de P30 podía corresponder a una fosfolipasa A1 o A2 (Fig. 5). También encontramos un pequeño incremento de radiactividad en las manchas cuyo Rf correspondió a GFC, lo cual podría deberse a la actividad de una lisofosfolipasa. No detectamos radiactividad en las manchas correspondientes a AGL y RI (Fig. 5).

Efecto del pH, calcio y EDTA sobre la actividad fosfolipásica de P30.

Identificación preliminar

Una vez que cuantificamos la actividad fosfolipásica de P30, investigamos como le afectan el pH o concentraciones variables de calcio o EDTA.

En mezclas de ensayo incubadas por 45 min. a 37°C con 368 µg de proteína totales de P30 y 4 µCi de [³H]FC, encontramos que la actividad de P30 tenía dos picos, una a pH 3.5 y otra a 8.0 (Fig. 6).

Quando analizamos el efecto del calcio encontramos una actividad máxima entre 8.0 y 12.0 mM. Concentraciones menores resultaron en una disminución de la actividad del 40%, mientras que con mayores concentraciones (20 mM) detectamos actividad 20% menor, con respecto a la de las mezclas con calcio 10 mM (Fig. 7). Cuando añadimos SAB en las mezclas de ensayo no observamos un incremento significativo en la concentración de los productos de hidrólisis (Fig. 7). Como la actividad fosfolipásica en las mezclas sin calcio añadido era notablemente alta, pensamos que podría haber una fosfolipasa ambiana que no requiere el catión. Por ello, analizamos los productos de hidrólisis de las mezclas de ensayo sin calcio añadido y concentraciones variables de EDTA: Encontramos un incremento del producto de hidrólisis de una actividad

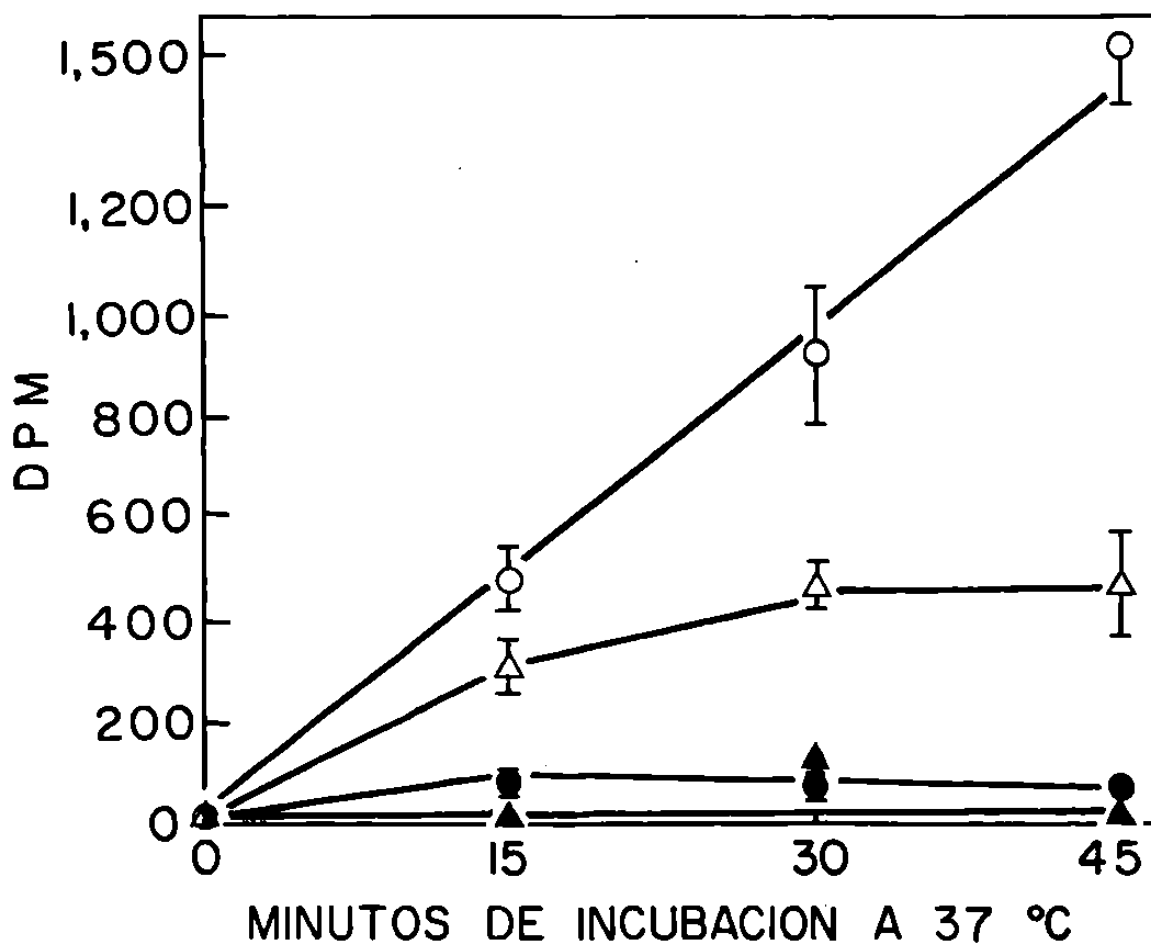


Fig. 5. Relación temporal de la actividad fosfolipásica de P30. A tiempos variables de incubación a 37°C determinamos la actividad fosfolipásica de P30 en una mezcla de ensayo con 4 μ Ci de [³H]FC y 368 μ g de proteínas totales de P30, suspendidas en Tris-HCl. Después de la incubación separamos los productos de hidrólisis mediante cromatografía en placa fina y las cuantificamos en un contador de centelleo líquido. Los símbolos corresponden a [³H]LFC (○); [³H]GFC (△); AGL y los espacios vacíos de las cromatoplasas entre las manchas lipídicas (●). Los puntos corresponden al promedio y desviación estandar de 9 determinaciones y 3 experimentos independientes. Cuando incubamos SAB con la mezcla de ensayo, como testigo negativo, no observamos cambios con respecto al tiempo de incubación en la cantidad de ninguno de los lípidos analizados(▲).

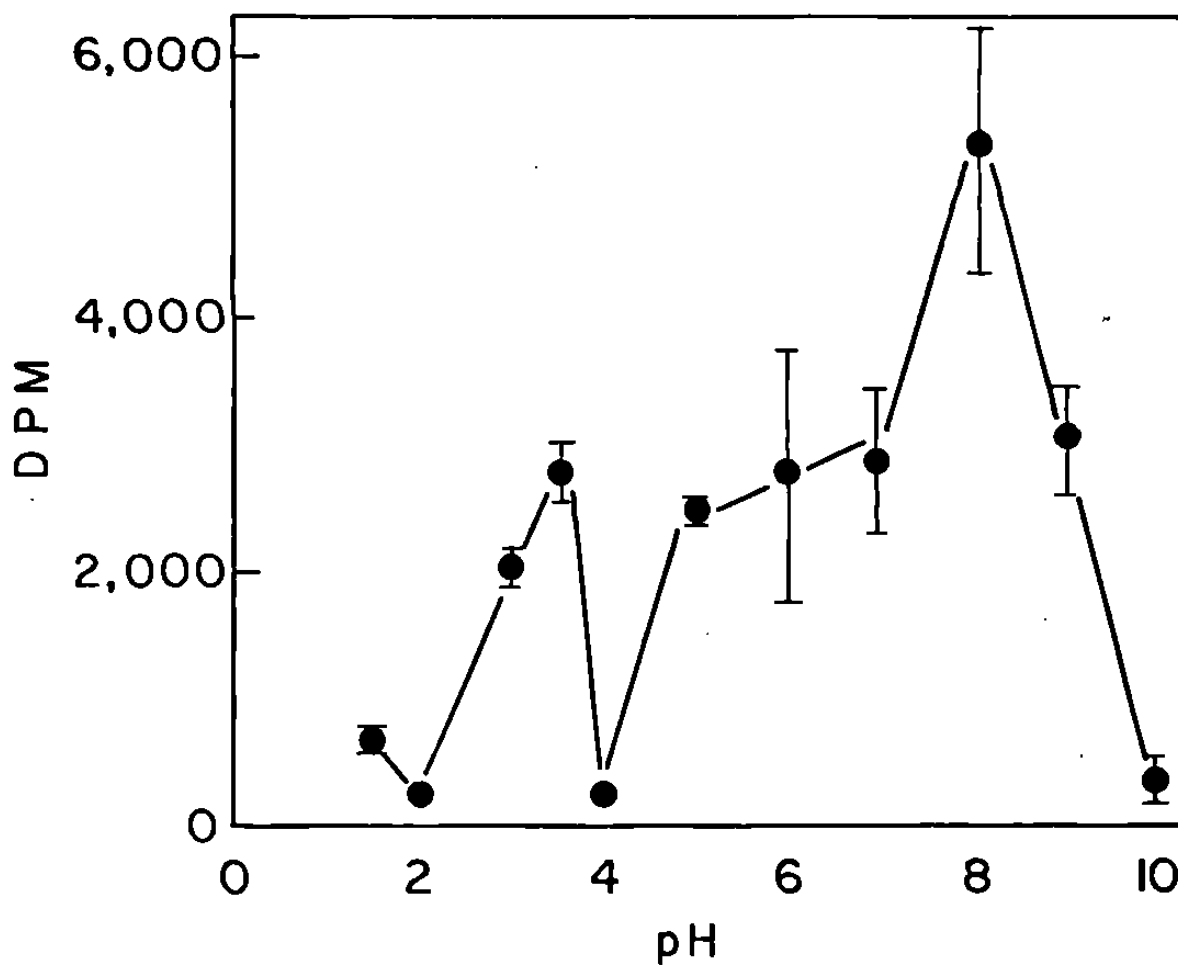


Fig. 6. Efecto del pH sobre la actividad fosfolipásica de P30. Determinamos la actividad fosfolipásica de P30 en mezclas de ensayo ajustadas a diferentes valores de pH y adicionadas con 4 μ Ci de [3 H]FC y 368 μ g de proteínas totales de P30, suspendidas en Tris-HCl. Los símbolos representan el promedio y desviación estándar del contenido de [3 H]LFC en las mezclas de ensayo en 7 determinaciones.

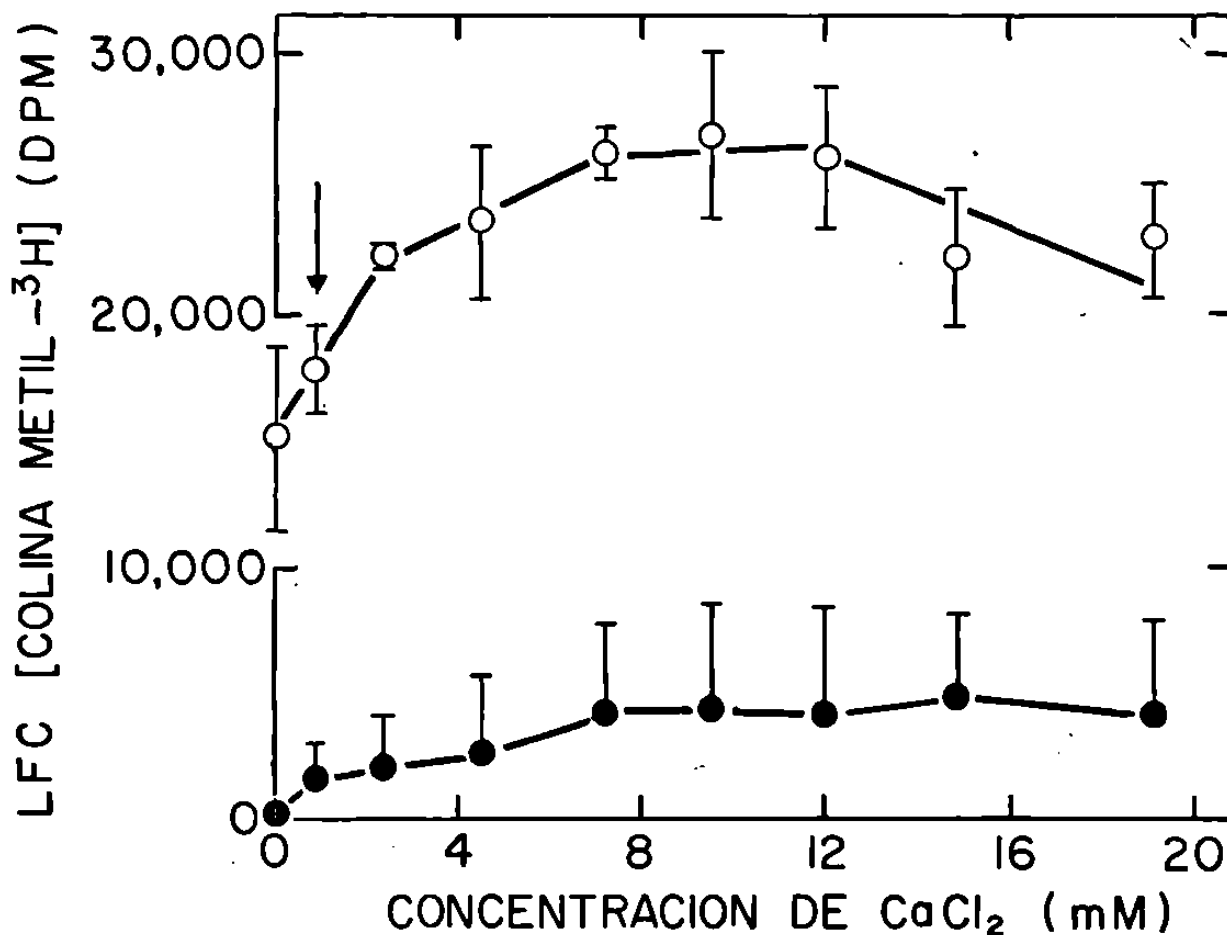


Fig. 7. Efecto de la concentración de cloruro de calcio y la actividad fosfolipásica de P30. Determinamos la actividad fosfolipásica de P30 en una mezcla de ensayo adicionada con cantidades variables de cloruro de calcio, 4 μ Ci de [³H]FC, y 368 μ g de proteínas totales de P30 (○) ó SAB (●) ó A2 de abeja (↓). Después de 45 min. de incubación a 37°C cuantificamos la radiactividad correspondiente a [³H]LFC. Los símbolos corresponden al promedio y desviación estándar de 15 determinaciones y 5 experimentos independientes. La probabilidad de que los promedios de la actividad fosfolipásica con diferentes concentraciones de calcio son diferentes entre sí resultó estadísticamente significativa ($P > 0.05$; prueba de Barlette).

fosfolipásica A, con respecto a la concentración del quelante (Fig. 8), cuando usamos SAB no detectamos radiactividad en las manchas correspondientes a los productos de hidrólisis.

Los resultados anteriores sugerían fuertemente la existencia en P30 de cuando menos dos fosfolipasas A: una con actividad máxima a pH 8.0 y otra a 3.5; una dependiente de calcio y la otra no.

Detección en P30 de una fosfolipasa A1 y A2

Una vez conocidas las características generales de la actividad fosfolipásica A de P30, intentamos definir si se trataba de una fosfolipasa A1 ó A2, por ello usamos como sustrato en las mezclas de ensayo [^{14}C]FC (marcado en el carbón 1 del ácido palmítico esterificado en la posición 2 del glicerol) y concentraciones variables de proteínas totales de P30, encontramos que las dpm correspondientes a [^{14}C]LFC como las dpm de los [^{14}C]AGL se incrementaron con respecto a la cantidad de P30: la radiactividad de las manchas correspondientes a [^{14}C]LFC fue dos veces mayor que la de el ácido [^{14}C]palmítico, lo cual sugirió fuertemente la presencia de una fosfolipasa A1 y de una A2 y/o una lisofosfolipasa (Fig. 9). Cuando usamos SAB en vez de P30 no encontramos radiactividad en las manchas correspondientes a LFC ni AGL (Fig. 9), lo que avala la confiabilidad de los resultados.

Confirmación de la existencia de actividad de lisofosfolipasa en P30

Como los resultados anteriores presentados en las Fig. 5 y 9 sugerían la presencia de una actividad de lisofosfolipasa en P30, decidimos utilizar una mezcla de ensayo que contuviese [^{14}C]LFC como sustrato radiactivo y cantidades variables de proteínas totales de P30 como posible fuente de lisofosfolipasa en cuestión. Encontramos un incremento claro de radiactividad

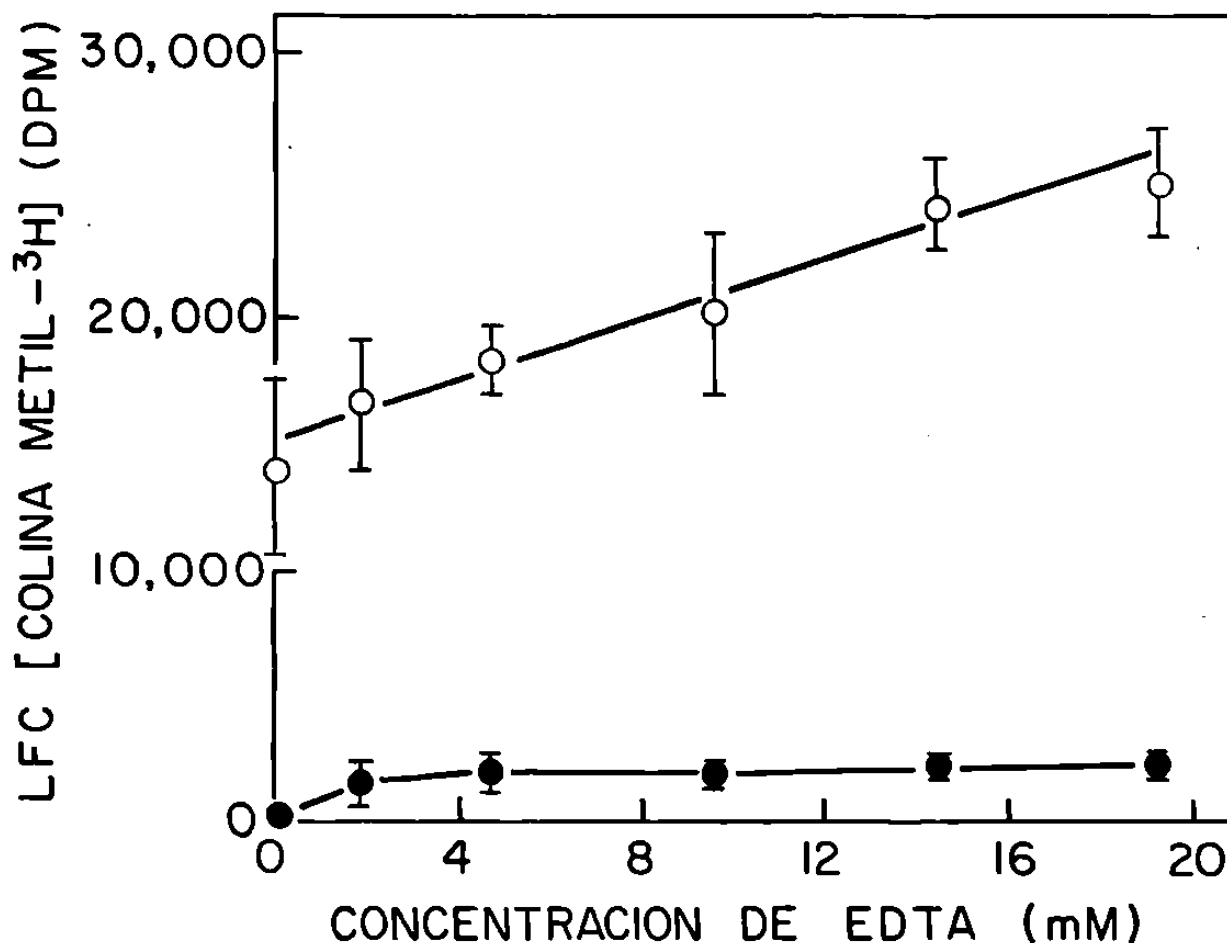


Fig. 8. Incremento de una actividad fosfolipásica de P30 en función de la concentración de EDTA. Determinamos la actividad fosfolipásica de P30 en mezclas de ensayo con [³H]FC con cantidades variables de EDTA y 368 µg de proteínas totales de P30 (○) ó SAB como testigo negativo (●). Después de 45 min. de incubación a 37 °C. cuantificamos la radiactividad correspondiente a [³H]LFC. Los símbolos corresponden al promedio y desviación estándar de 15 determinaciones y 5 experimentos independientes.

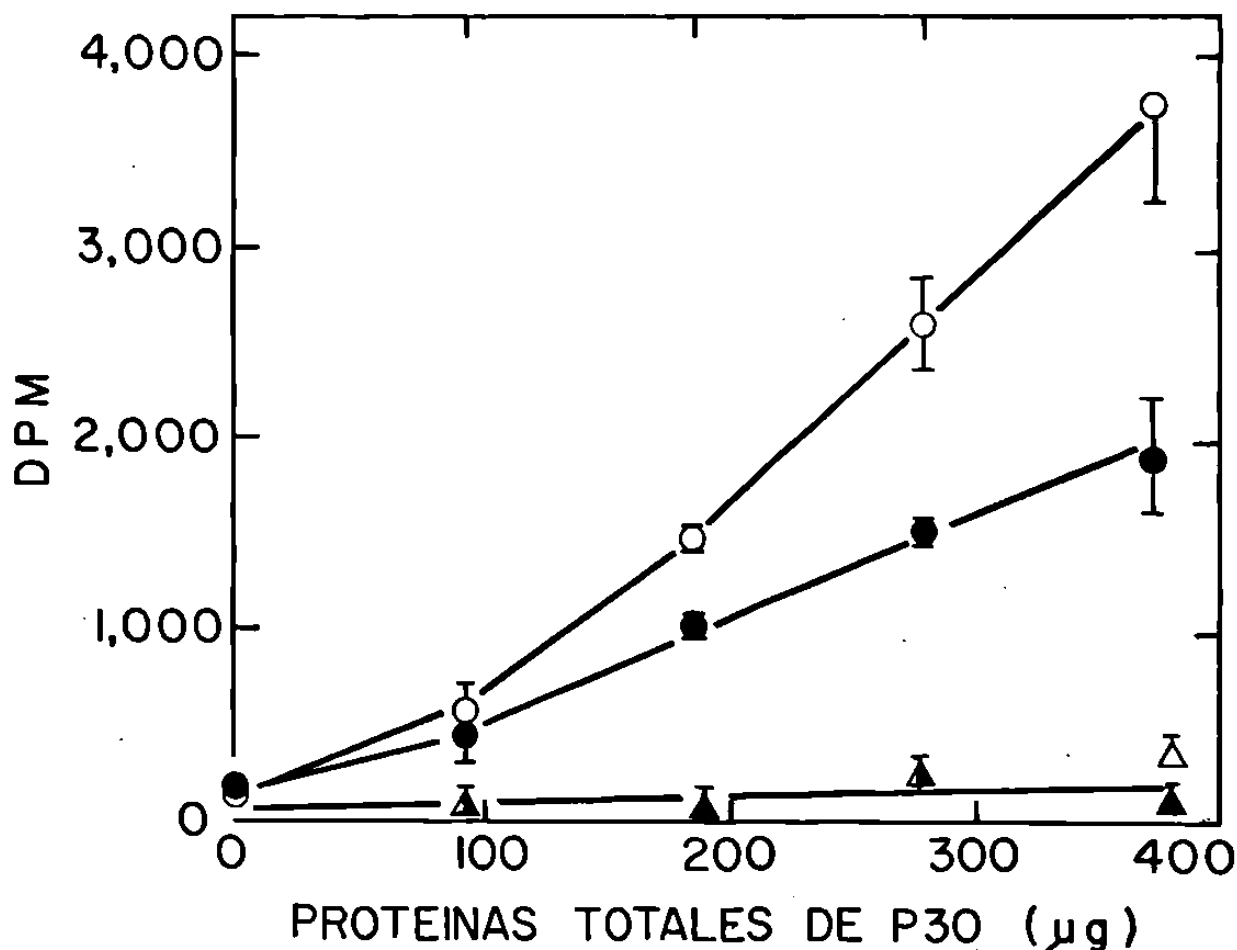


Fig. 9. Relación entre la cantidad de proteínas totales de P30 y la liberación del monoacil-[¹⁴C]gliceril-fosforilcolina y el ác. [1-¹⁴C]palmitico. Determinamos el tipo de fosfolipasa A que pertenece la actividad fosfolipásica de la fracción P30 usando una mezcla de ensayo con 4 µCi de [¹⁴C]FC y concentraciones variables de proteínas totales de P30 ó SAB -esta última como testigo negativo-. Después de 45 min. de incubación a 37°C. determinamos la radiactividad correspondiente a [¹⁴C]LFC (○) y [¹⁴C]AGL (●), producidos por la enzima ambiente ó a la radiactividad detectada en las porciones equivalentes a [¹⁴C]LFC (○) ó ác. [¹⁴C]palmitico después de separar estos productos mediante cromatografía en placa fina. Los símbolos corresponden al promedio y desviación estándar de 9 determinaciones y 3 experimentos independientes.

en las manchas correspondientes a ácido [14 C]palmítico con respecto a la cantidad de P30 (Fig. 10). Cuando usamos fosfolipasa A2 de veneno de abeja, la cual habitualmente esta contaminada con una lisofosfolipasa, encontramos resultados similares. En cambio en las mezclas que sólo contenían SAB como fuente de proteína no detectamos radiactividad en las manchas correspondientes a los productos de actividad lisofosfolipásica (Fig. 10).

Efecto de inhibidores específicos sobre la actividad fosfolipásica de P30

Como el objetivo final de este trabajo era determinar las características de la principal fosfolipasa ambiental para después intentar su purificación mediante cromatografía de afinidad en una columna de Sepharosa acoplada a un inhibidor específico de fosfolipasa (13,14), analizamos el efecto de dos análogos de FC conocidos como inhibidores de fosfolipasas A. Probamos estos con una concentración fija en la mezcla de ensayo de 21 μ M y 368 μ g de proteínas totales de P30. Incluimos como testigo en éstos experimentos fosfolipasa A2 de veneno de abeja, la cual era predeciblemente inhibible (39).

Cuando probamos ambos análogos de FC, el inhibidor de Rosenthal (28) ó el 1(11 carboxinonil)-2-hexadecilglicero-3-fosfatidilcolina (13,14), encontramos que la actividad fosfolipásica total de P30 disminuyó 91 y 78% respectivamente (Tabla 2). La potencia inhibitoria de ambos reactivos sobre la fosfolipasa A2 de abeja fue equivalente al 87 y 94% respectivamente, con respecto a las mezclas no tratadas (Tabla 2).

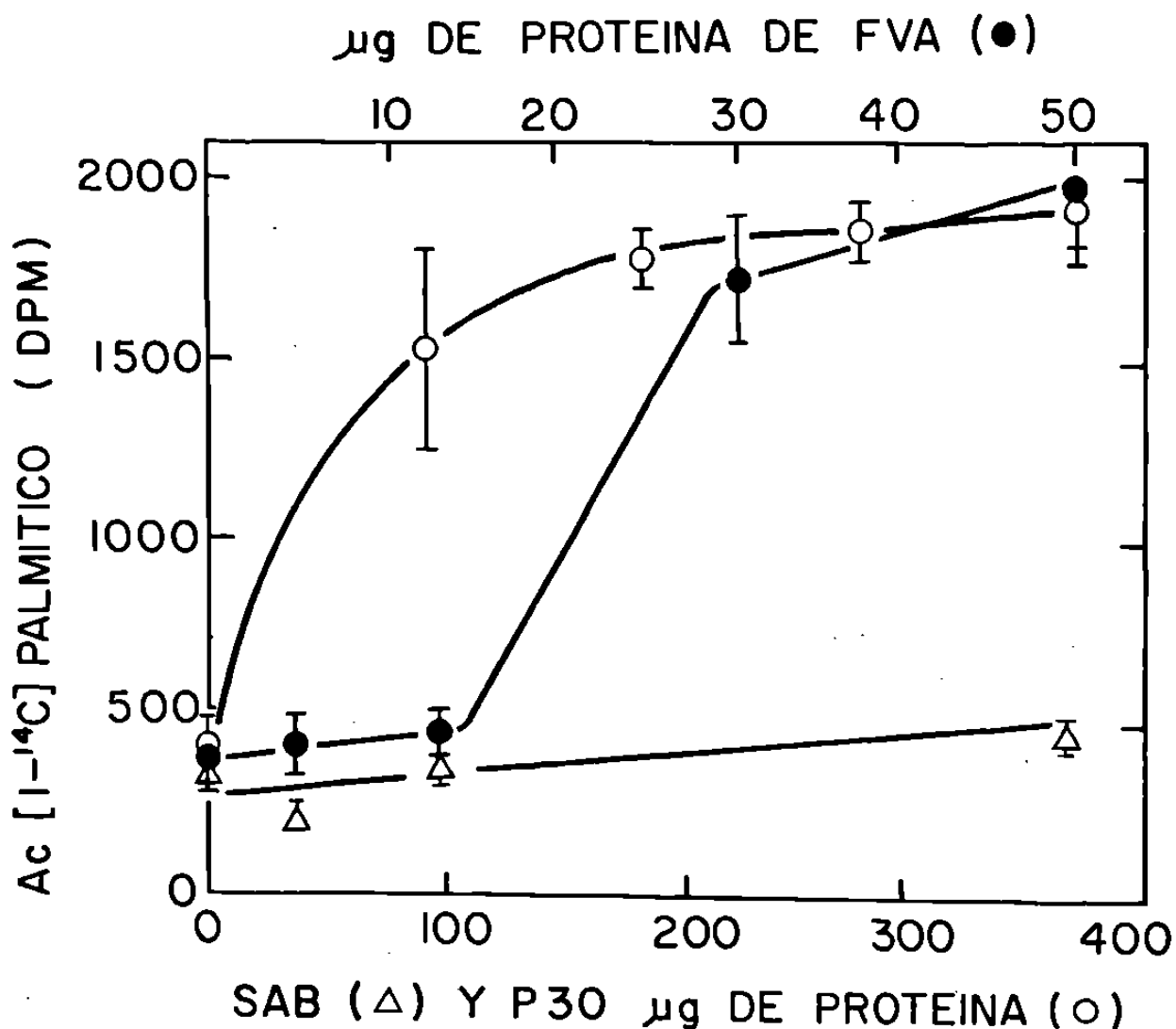


Fig. 10. Actividad de lisofosfolipasa en P30 y en una preparación comercial de fosfolipasa A2 de veneno de abeja. Incubamos mezclas de ensayo con 4 μCi de [^{14}C]LFC y concentraciones variables de P30 (○) y de una preparación de fosfolipasa de veneno de abeja (●; FVA) ó de SAB (Δ). Después de 45 min. de incubación a 37 °C determinamos la radiactividad del ác. [^{14}C]palmítico producido en cada reacción. Los símbolos corresponden al promedio y desviación estándar de 9 determinaciones y 3 experimentos independientes.

TABLA 2

 INHIBICION ESPECIFICA DE LAS FOSFOLIPASAS AMIBIANAS Y DE VENENO DE ABEJA

<u>FOSFOLIPASAS</u>	<u>INHIBIDORES ADICIONADO A LAS MEZCLAS DE ENSAYO</u>				
	<u>AMIBIANAS</u>	<u>NINGUNO</u>	<u>IR^a</u>	<u>COO-FC^b</u>	
		DPM	DPM %INHIBICION ^c	DPM	%INHIBICION
A1 ^d	16861+200	1808+696	<u>89.2+0.4</u>	4634+1117	<u>72.5+6.6</u>
A2 ^e	8000+2471	623+332	<u>92.2+4.1</u>	1246+166	<u>84.4+2.0</u>
<u>DE VENENO</u>					
<u>DE ABEJA</u>					
A2 ^e	9068+1088	1156+353	<u>87.2+3.89</u>	480+92	<u>94.7+1.0</u>

^a Inhibidor de Rosenthal

^b 1(11 carboxi)-undecil-2-hexadecil-glicero-3-fosfatidilcolina

^c Con respecto a las DPM de las mezclas testigos no tratadas

^d Radiactividad detectada en las manchas cromatográficas correspondientes a [¹⁴C]LFC. Producto de la hidrólisis de 2-[1-¹⁴C]palmitil-FC.

^e Radiactividad detectada en la mancha correspondiente al ácido [1-¹⁴C]palmitico, usando como sustrato [¹⁴C]FC.

Los datos corresponden a los promedios y desviaciones estándar de 21 determinaciones y 6 experimentos independientes.

V. DISCUSION.

La virulencia de E. histolytica -cuyos mecanismos patogénicos se desconocen en gran parte-, parece depender esencialmente de la capacidad de estos parásitos para proliferar y destruir los tejidos del huésped (36). En los últimos años se han podido identificar y caracterizar varias actividades biológicas que podrían estar íntimamente relacionadas con esta propiedad amibiana, mejor conocida como "invasividad". Tales son: la unión específica de las amibas a las células blanco, por medio de adhesinas; las cuales están situadas en la superficie de los trofozoítos (37); la fagocitosis (21,22,38); varios efectos citotóxicos (39), entre ellos uno enterotóxico (40); la evasión de la respuesta inmune (41,42) y la citólisis (25,26,38,43,44). Nuestro grupo ha estudiado esta propiedad lítica durante los últimos diez años (18,19,27,35).

En 1980 Said-Fernández y López-Revilla (27) describieron y caracterizaron una actividad hemolítica en extractos libres de trofozoítos de E. histolytica (19). Después, Prasad et. al. confirmaron y ampliaron estas observaciones (45). En los trabajos iniciales se había encontrado que los extractos amibianos eran capaces de lisar células nucleadas de mamífero (27) y posteriormente nosotros confirmamos estas observaciones mediante un método cuantitativo de citólisis, el cual permite analizar sistemáticamente esta propiedad amibiana sobre células CHO (35). El efecto hemolítico de los trofozoítos de E. histolytica se localiza mayoritariamente en una fracción vesicular llamada "P30" (19). Es máxima en presencia de calcio 1mM a pH 8.0 y su potencia se incrementa hasta cien veces después de 36h de incubación a 36 °C (19). Este efecto se debe a dos componentes: uno termoestable y el otro termolábil (18). El primero está constituido por ácidos grasos libres;

posiblemente generados por una fosfolipasa A, la cual probablemente actúa directamente sobre la membrana plasmática de las células blanco, dicha enzima puede ser el factor hemolítico termolábil (18).

En este trabajo nosotros hemos caracterizado la principal actividad fosfolipásica de los trofozoítos, dada su presunta importancia como un factor de virulencia de E. histolytica. Con tal propósito desarrollamos un modelo de ensayo in vitro con el que confirmamos la existencia de dicha actividad y la cuantificamos con precisión y reproducibilidad. Para lo cual nos basamos en un método descrito por Fred R. Opperdoes y col., con el que caracterizaron una enzima similar de Trypanosoma brucei (16). Para incrementar la factibilidad de nuestro proyecto, tomamos en cuenta toda la experiencia previa sobre la actividad hemolítica amibiana. Especialmente la referente a la obtención y manejo de la fracción P30; donde residen ambas actividades, la hemolítica y la fosfolipásica (18). Las principales precauciones tomadas fueron las siguientes: a) obtuvimos los extractos totales de los trofozoítos mediante homogenización mecánica, para preservar en lo posible la compartimentalización subcelular; otros investigadores rutinariamente homogenizan los trofozoítos mediante sonicación o ciclos repetidos de congelación-descongelación; con lo que posiblemente se desnaturalizan las presuntas citolisinas. Ello explicaría la falta de éxito en múltiples intentos para detectar la actividad citolítica en los extractos amibianos (44,46,47,). b) como la fracción amibiana con mayor actividad citolítica y fosfolipásica es una fracción asociada a membranas (19), en nuestro modelo adaptamos todas las condiciones analíticas para manejar la enzima en forma de suspensión, la cual representó una dificultad extra, en vista de que este tipo de enzimas se inactivan con facilidad al tratar de solubilizarlas en medios hidrofílicos (cfr. ref. 6-10) y las mezclas son complejas, insolubles

y turbias.

Por otro lado hicimos al método original una reforma importante: Analizamos la actividad fosfolipásica en un modelo experimental donde el volumen final de la mezcla de reacción no excedía a 45 μ l en vez de 65 μ l. Lo cual confirió tres ventajas a nuestro método: la posibilidad de i) analizar sincrónicamente un mayor número de muestras, ya que se requiere menos radiactividad que con otros métodos, incluyendo el que usamos inicialmente como marca de referencia (16); ii) realizar los ensayos en mucho menos tiempo que los métodos tradicionales y iii) ahorrar una considerable cantidad de reactivo. Esta última ventaja es especialmente importante en nuestro país, donde los compuestos radiactivos resultan extremadamente costosos.

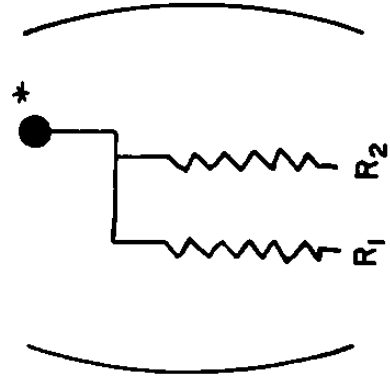
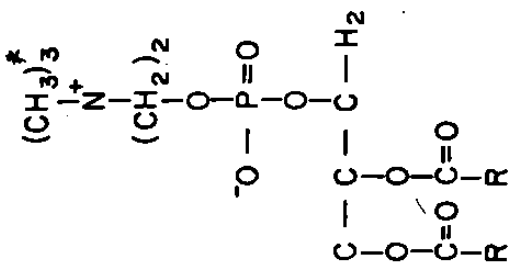
Elejimos a la cepa HK9 de E. histolytica para desarrollar este trabajo por ser una de las cepas que producen mayor rendimiento en los cultivos (27); y por que en ella se detectaron y caracterizaron los efectos hemolíticos (19,27) y citolíticos (35) amibianos.

El desarrollo de nuestro modelo experimental consistió primero en analizar los efectos de una fosfolipasa bien caracterizada: la A2 de veneno de abeja (3), cuyos resultados eran predecibles. Con esta enzima conseguimos reproducir una curva dosis-respuesta típica (Fig.4), lo cual confirió a nuestro método solidez y confiabilidad. Usamos esta misma fosfolipasa durante el desarrollo de nuestro trabajo como testigo interno.

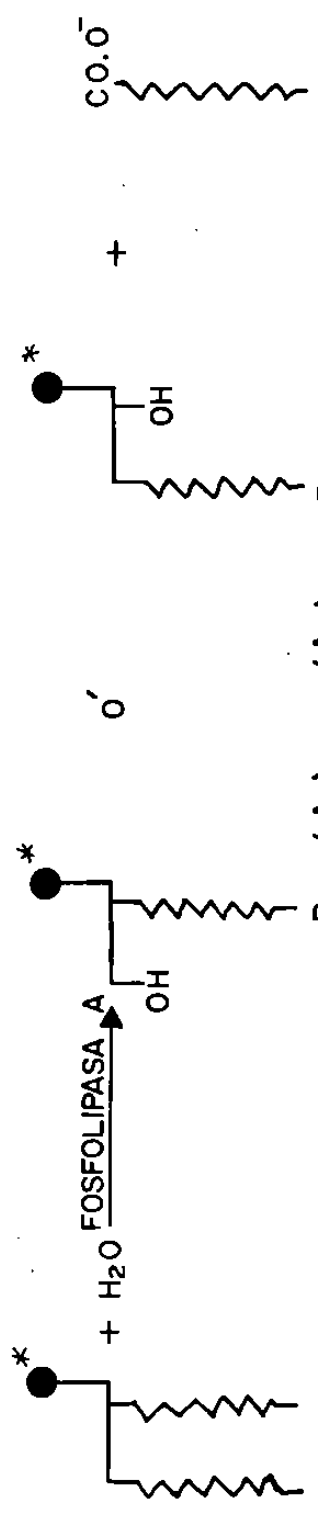
Una vez adaptado y probado el modelo experimental, analizamos la actividad fosfolipásica de los extractos amibianos: pudimos confirmar, en primera instancia, las observaciones iniciales de Said-Fernández y López-Revilla (18) sobre la existencia de actividad fosfolipásica en P30.

Los fundamentos experimentales de este nuevo método fueron las siguientes: después de incubar los tubos de reacción con dosis variables de P30, adicionados con [^3H]FC y reguladores de pH y de osmolaridad, separamos los productos de hidrólisis mediante cromatografía en placa fina (31). Con ello observamos que la radiactividad en las manchas cromatográficas correspondientes a [^3H]LFC se incrementó con respecto al tiempo de incubación (Fig. 5). Lo que nos sugirió que la actividad de P30 podría ser una fosfolipasa del tipo A1 o A2 (Fig. 11), confirmando lo sugerido en trabajos previos (18). Como además encontramos radiactividad significativa en las manchas cuyo Rf correspondía a GFC, la cual también se incrementó con respecto a la cantidad de P30 añadida a las mezclas de ensayo, pensamos que esta fracción amibiana podría contener también una lisofosfolipasa (Fig. 12). La ausencia de radiactividad en las manchas cromatográficas correspondientes a AGL y en las zonas donde no había lípidos -lo cual era predecible- sustentan esta conclusión (Fig. 5).

Durante la caracterización de la actividad hemolítica de P30, Saiz-Fernández y López-Revilla encontraron que su máximo efecto ocurría a pH 8.0 (19), y como la actividad fosfolipásica podría corresponder a este fenómeno, nosotros determinamos el efecto del pH sobre esta última actividad. Encontramos que P30 tiene dos picos de actividad fosfolipásica; una a pH 3.5 y otra a pH 8.0. Esta última era dos veces mayor que la detectada a pH 3.5 (Fig. 6); se deduce de aquí que P30 posiblemente tiene dos actividades fosfolipásicas. Por otro lado, como a pH 8.0 se manifiesta tanto el máximo efecto hemolítico como la mayor actividad fosfolipásica de P30, es muy probable que exista una identidad entre la hemolisina termolábil, descubierta en trabajos previos (18) y la actividad fosfolipásica. Las evidencias que presentamos mas adelante apoyan aun mas esta suposición.



FC, L- α -DIPALMITOIL - [COLINA - METIL - ^3H] - (FC [^3H])



FC [^3H] LFC-2- [^3H] LFC-1- [^3H] AC.PAL.

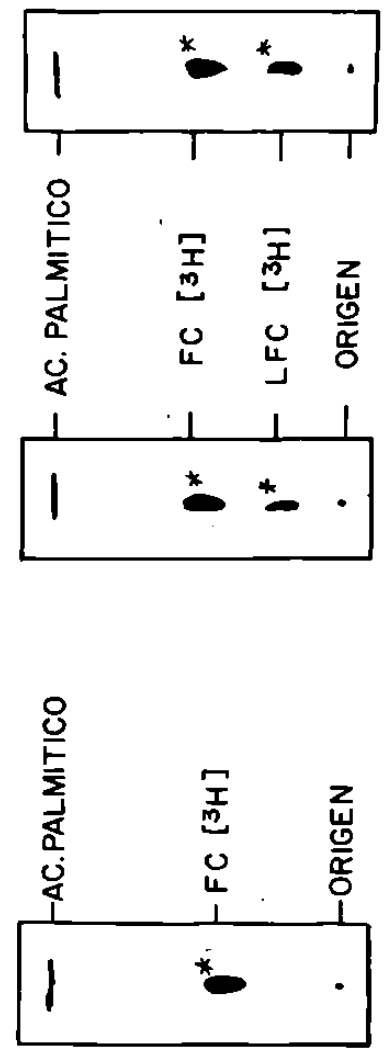


Fig. 11

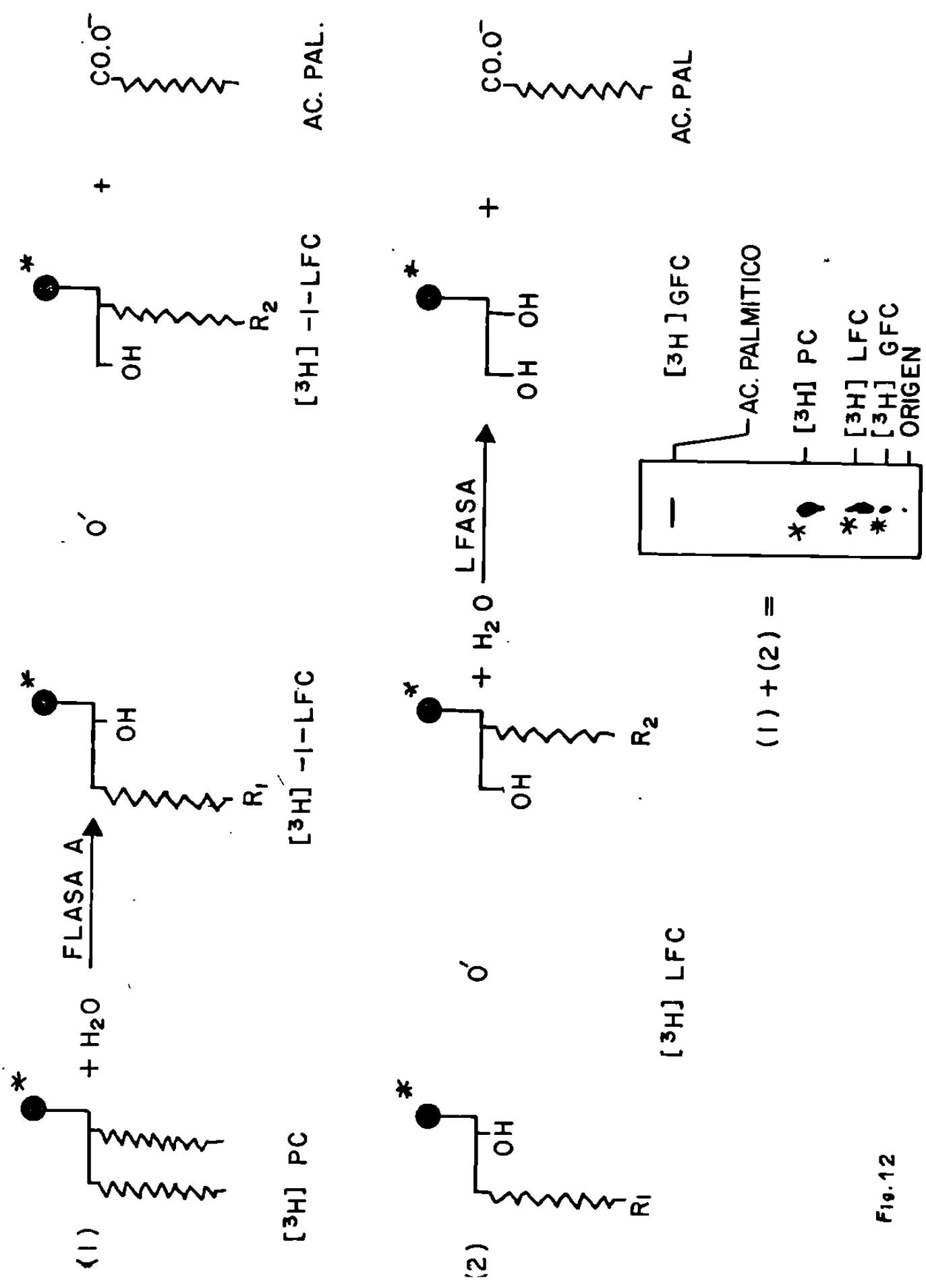
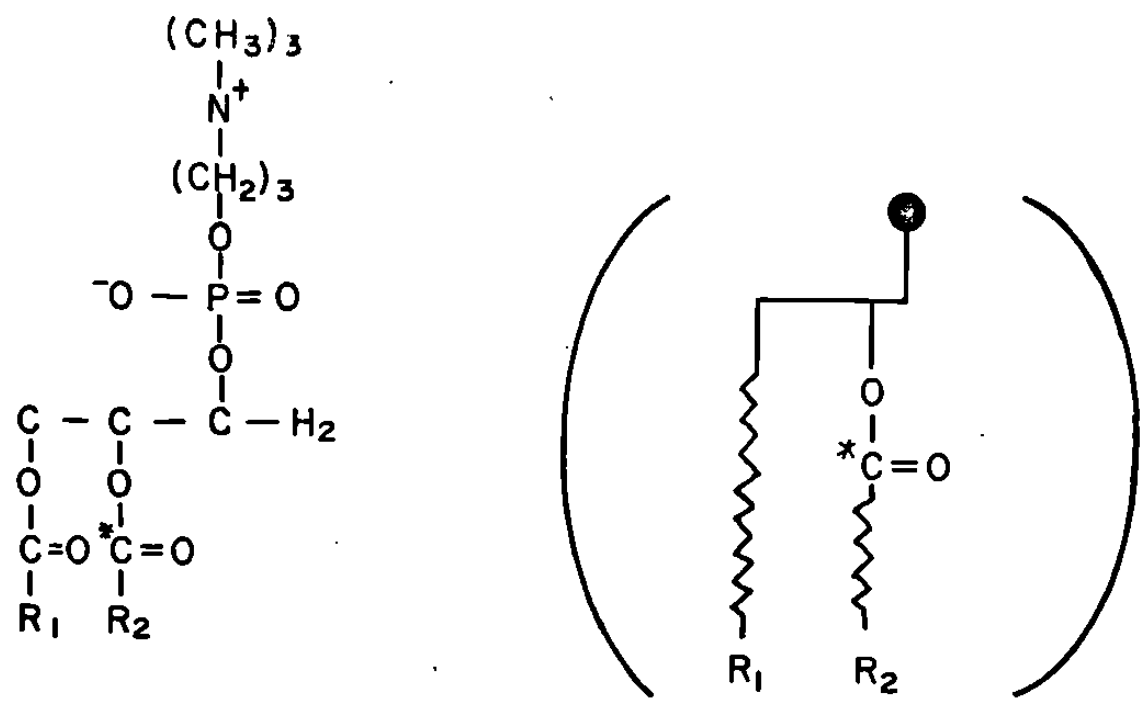


Fig. 12

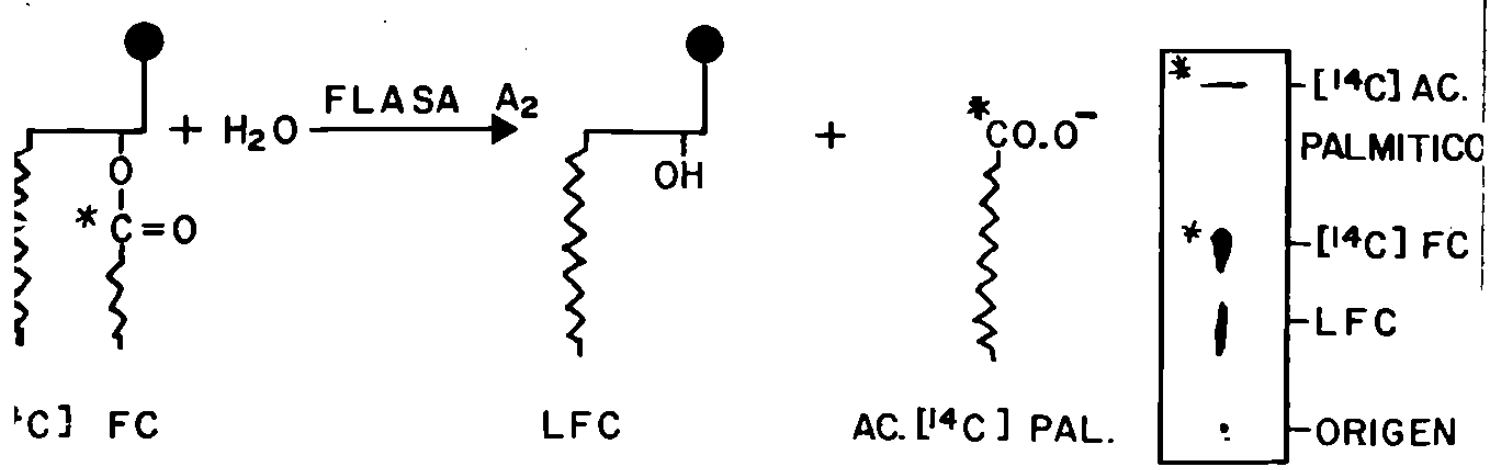
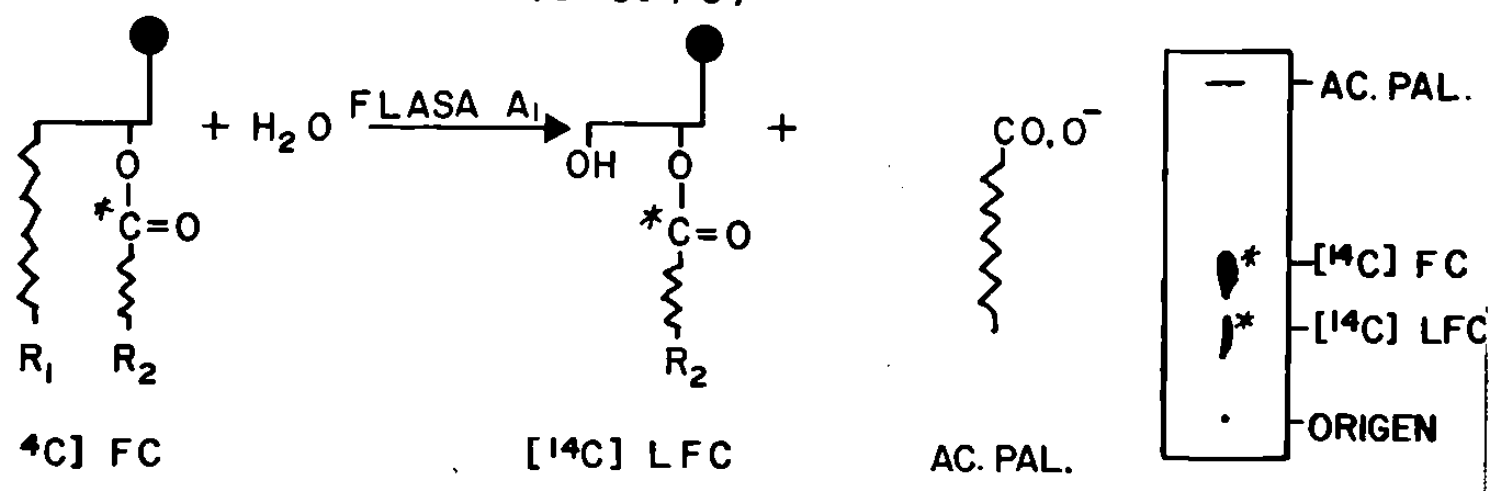
La existencia en P30 de cuando menos dos actividades fosfolipásicas se confirmó cuando detectamos una notable actividad en las mezclas de ensayo, a las cuales no añadimos calcio (Fig. 7). Como esta actividad se incrementó linealmente en función de la concentración de EDTA, hasta 20 mM (Fig. 8), nosotros concluimos que una de las fosfolipasas de P30 no requiere calcio. Lo más probable es que dicha enzima sea la acídica, con un máximo a pH 3.5 y la hemolisina termolábil sea la básica. Esto último considerando i) que la fosfolipasa que actúa maximamente a pH 8.0 coincide en esta condición con el máximo efecto hemolítico y ii) se requiere calcio para que ocurran ambos efectos biológicos a pH 8.0: hemólisis e hidrólisis de fosfolípidos.

La fosfolipasa acídica, independiente de calcio podría ser un factor potenciador de la hemolisina, o no intervenir directamente en el mecanismo citolítico de E. histolytica, sino en el metabolismo normal de los fosfolípidos de estos parásitos (3,48).

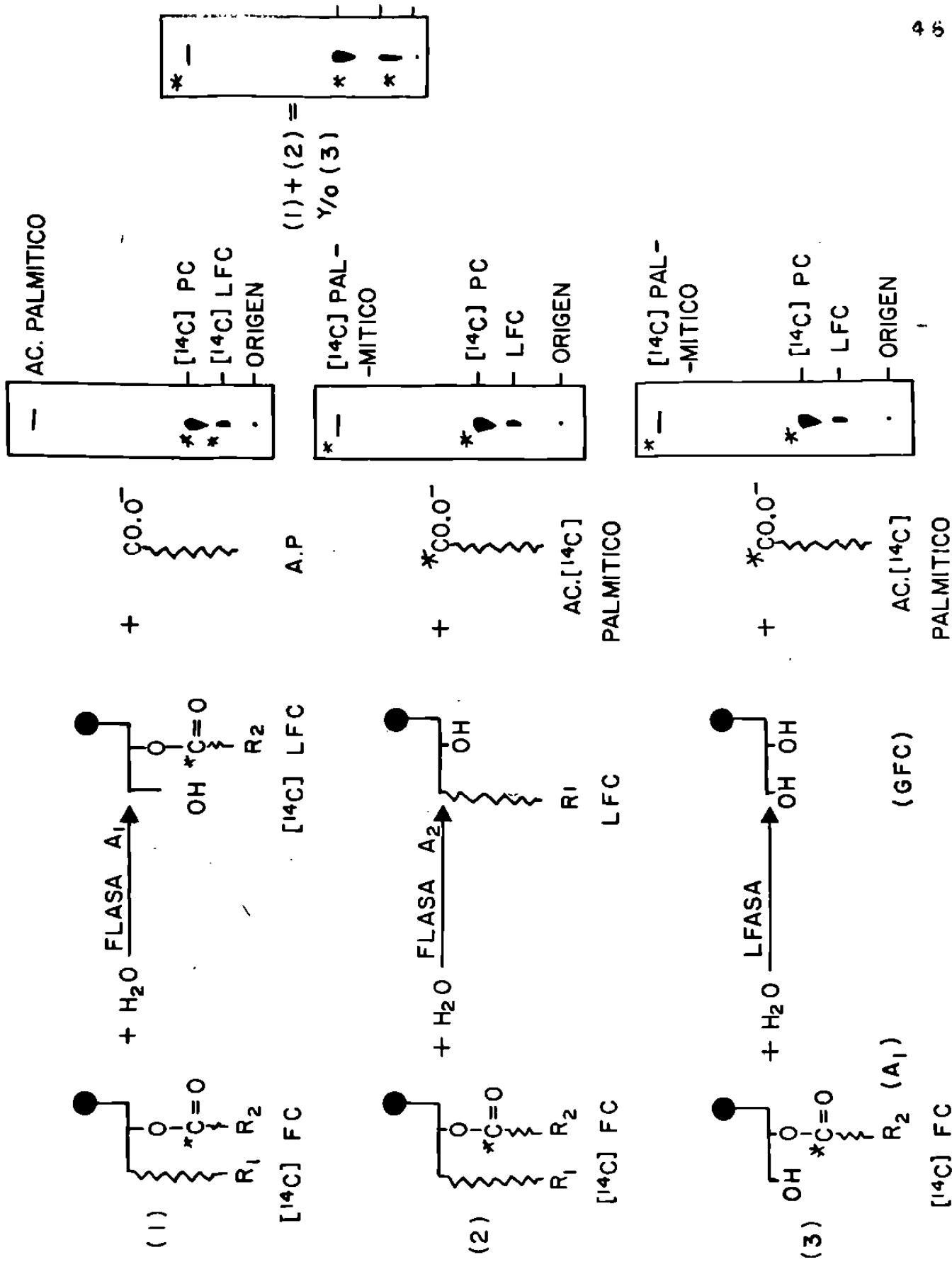
Para continuar la caracterización de las fosfolipasas amibianas, investigamos si estas correspondían a los tipos A1 o A2. Elegimos como sustrato [¹⁴C]FC, marcado en el carbon 1 del ácido palmítico esterificado en la posición 2 del glicerol (ver Fig. 13), considerando que si después de la incubación con P30 la radiactividad se localizaba en la mancha cromatográfica correspondiente a [¹⁴C]LFC, pero no en la del ácido [¹⁴C]palmítico, las enzimas serían fosfolipasas A1. En el caso contrario estas corresponderían a fosfolipasas A2 (Fig. 13). Como encontramos un incremento de radiactividad tanto en las manchas correspondientes al ácido [¹⁴C]palmítico, como en las del [¹⁴C]LFC, dedujimos que en P30 residen ambos tipos de fosfolipasas y una lisofosfolipasa, previamente detectada (ver Fig. 10), ó únicamente una fosfolipasa A1 y la lisofosfolipasa. Hicimos éstas consideraciones porque el

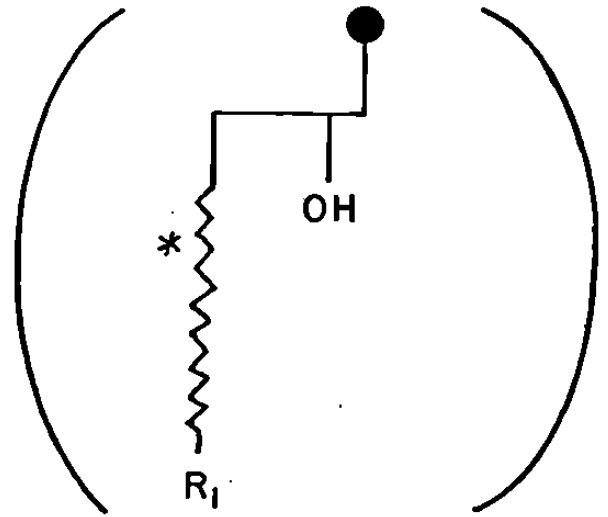
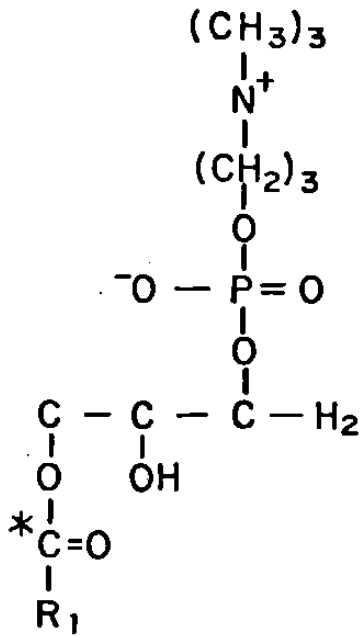


FOSFATIDILCOLINA, L- α -DIPALMITOIL - [2-PALMITOIL-1¹⁴C] ([¹⁴C] PC)



ácido [^{14}C]palmitico, generado a partir de la [^{14}C]FC utilizado como sustrato, pudo haberse producido tanto por el efecto de una lisofosfolipasa como por una fosfolipasa A2 (Fig. 14). Por ello fué necesario confirmar primero la presencia en P30 de la lisofosfolipasa y después analizar detenidamente los resultados obtenidos para tratar de determinar si en P30 existía además una fosfolipasa A2. Con este propósito seleccionamos un sustrato específico para lisofosfolipasas: el [^{14}C]LFC (ver Fig. 15). Como encontramos un claro incremento en la radiactividad correspondiente al ácido [^{14}C]palmitico, concluimos que efectivamente P30 contiene una actividad de lisofosfolipasa (Fig. 10). Los resultados encontrados en las mezclas incubadas con la lisofosfolipasa de veneno de abeja, similares a los obtenidos con P30, apoyan fuertemente esta conclusión. No había duda entonces de que P30 posee una fosfolipasa A1 y una lisofosfolipasa, pero aún no confirmábamos la presencia de una fosfolipasa A2. Para ello, normalizamos primero las dpm de los productos de hidrólisis tanto de [^3H]GFC como con el ácido [^{14}C]palmitico y encontramos que cuando utilizabamos [^3H]FC como sustrato, la mayor parte de la radiactividad (75%) se localizaba en la mancha correspondiente a [^3H]LFC. La cual es el producto típico de una fosfolipasa de tipo A1 ó A2 (Fig. 11) y un (25%) en [^3H]GFC, producto de una lisofosfolipasa la cual se había confirmado con el sustrato específico [^{14}C]LFC ([^{14}C]AGL-100%) (Fig. 10). Por otro lado cuando usamos el sustrato [^{14}C]FC detectamos un 62% en las manchas correspondientes a [^{14}C]LFC el cual es el producto de una fosfolipasa A1 (Fig. 13) y un 37% en [^{14}C]AGL producido por una fosfolipasa A2 y/o una lisofosfolipasa (Fig. 14) para saber si además de la fosfolipasa A1 y la lisofosfolipasa podría existir una fosfolipasa A2, comparamos mediante la prueba de T de Student, los valores normalizados de [^3H]GFC (25%) que es producto de una lisofosfolipasa y del ácido





LISOFOFATIDILCOLINA, L- ∞ - PALMITOIL - [1 - PALMITOIL - I ^{14}C :
 ([^{14}C] LFC).

Fig. 15

[¹⁴C]palmitico (37%), liberado tanto por una lisofosfolipasa como por una fosfolipasa A2 (Fig. 14). Como encontramos que la diferencia entre ambos valores era estadísticamente significativa (P<0.0005), y la cantidad del ácido [¹⁴C]palmitico producido era mayor que la del [³H]GFC, dedujimos que el primero pudo haberse acumulado en las mezclas de ensayo por el efecto de ambos tipos de enzimas: una lisofosfolipasa y una fosfolipasa A2 (ver Fig. 14 y Tabla 1). Concluimos por lo tanto que en P30 residen una actividad fosfolipásica A1, una A2 y una lisofosfolipasa, y que los productos de hidrólisis encontrados corresponden al 62.5%, 27.5% y 10% respectivamente. Dedujimos estos valores haciendo las siguientes consideraciones:

PRODUCTOS NORMALISADOS

dpm detectadas con [³H]FC

dpm detectadas con [¹⁴C]FC

lisofosfolipasa =10%

fosfolipasa A1 = 62.5%

fosfolipasa A1 + A2 = 90%

A2 + lisofosfolipasa = 37.5%

$$\textcircled{1} [A1 [^3\text{H}] + A2 [^3\text{H}]] + \text{lisofosfolipasa } [^3\text{H}] = 100\%$$

$$\textcircled{2} [A2 [^{14}\text{C}] + \text{lisofosfolipasa } [^{14}\text{C}]] + A1 [^{14}\text{C}] = 100\%$$

Como las enzimas son las mismas, usando los valores encontrados en ambos experimentos pudimos deducir la contribución de A2 en la actividad fosfolipásica de P30, que era la única incógnita. Despejamos ésta sabiendo que A1 =62.5% y lisofosfolipasa =10%

Como el término $\textcircled{3} [A1 + A2] = 90\%$, entonces $90 = 62.5 + A2$ por lo tanto

$$\textcircled{4} A2 = 90 - 62.5 = 27.5\%$$

Por otro lado:

Si con [¹⁴C]FC sabíamos que $[A2 + \text{lisofosfolipasa}] = 37.5\%$ y por los experimentos con tritio encontramos que la contribución de lisofosfolipasa era del = 10%, entonces $A2 + 10\% = 37.5\%$; $\textcircled{5} A2 = 37.5 - 10\% = 27.5\%$, lo cual coincide con $\textcircled{4}$

T A B L A 1

PRODUCTOS DE HIDROLISIS DE LA ACTIVIDAD FOSFOLIPASICA
Y LISOFOSFOLIPASICA DE P30

SUSTRATOS	PRODUCTOS RADIOACTIVOS					
	LFC		GFC		AP	
	pmoles	Fracción porcentual ^a	pmoles	Fracción porcentual ^a	pmoles	Fracción porcentual ^a
³ H-metil FC	0.100	75%	0.033	25%	0	0%
¹⁴ C-2-pal m FC	43	62%	0	0%	26	37%
¹⁴ C-1-Pal m LFC	0	0%	0	0%	15.4	100%

^a Con respecto a la suma de los productos

Como el objetivo final de este trabajo era determinar las características de la principal fosfolipasa ambiental, para después intentar su purificación mediante cromatografía en una columna de Sepharosa acoplada a un inhibidor específico de fosfolipasa, analizamos el efecto de dos de los análogos de fosfatidilcolina más conocidos como inhibidores de la actividad de esta enzima: i) el de Rosenthal (28); ii) el rac 1(11-carboxinonil)-2-hexadecilglicero-3-fosfatidilcolina. Estos análogos inhibieron ambas actividades fosfolipásicas entre el 91 y el 78% respectivamente, abriendo la posibilidad de aislar estas enzimas para después determinar su contribución específica en la virulencia de E. histolytica

Descartamos la presencia de microorganismos antes y después de obtener y preincubar los extractos ambientales mediante observaciones directas en un microscopio de contraste de fase de los cultivos ambientales o de P30. Nos cercioramos del buen estado de las amibas mediante: a) el examen al microscopio directo y b) la determinación de los parámetros de crecimiento.

Conclusiones

1) Desarrollamos un método confiable para cuantificar actividad fosfolipásica en muestras particuladas y complejas.

2) Confirmamos la existencia en P30 de un efecto hidrolítico sobre fosfolípidos.

3) Encontramos que por los requerimientos de calcio y las condiciones de pH en las que se manifiesta la hidrólisis de FC, la actividad se debe en realidad al efecto de dos tipos de fosfolipasas, una cuya actividad máxima se detecta a pH 3.5 y no requiere calcio y la otra que sí requiere calcio y es máxima a pH 8.0.

4) Como las condiciones de esta última coinciden con los de la hemolisina caracterizada por Said-Fernández y López-Revilla (27) lo más probable es que la fosfolipasa básica, dependiente de calcio sea el factor hemolítico termolábil, que a su vez genera al factor hemolítico termoestable (ácidos grasos libres) (18).

5) P30 posee en realidad dos tipos de fosfolipasas, una A1 y otra A2, además de una lisofosfolipasa. En este trabajo no determinamos a cual de las dos corresponde la hemolisina termolábil.

6) Ambas fosfolipasas son inhibibles por los análogos de FC probados, lo que abre la posibilidad inmediata de intentar la purificación de las fosfolipasas amibianas.

Perspectivas

Las fosfolipasas detectadas in vitro en los extractos amibianos, en este trabajo, pueden jugar un importante papel en las lesiones producidas por las amibas, ya que éstas se caracterizan por la producción de zonas necróticas, circunscritas a los sitios invadidos por las amibas, en donde la destrucción tisular podría deberse a que los trofozoítos liberasen citolisinas activas o precursoras de ellas, mediante exocitosis o autólisis. La liberación de las fosfolipasas por estos mecanismos traería como consecuencia que éstas puedan generar por autohidrólisis de los fosfolípidos en la membrana plasmática amibiana productos citolíticos como ácidos grasos libres y lisoderivados, los cuales a su vez podrían: 1) potenciar o estimular a las fosfolipasas tanto de amibas como las de células blanco, provocando la autólisis de estas o 2) actuar directamente, intercalándose en la membrana plasmática de las células blanco y provocando la desestabilización y finalmente la lisis. Estas suposiciones son compatibles con las observaciones por Tsutsumi et al (49),

con la presencia de abundantes linfocitos PMN en las primeras horas de la infección hepática, donde los trofozoítos son rodeados por estas células; en contraste con la destrucción masiva de tejidos y la ausencia de linfocitos, así como el escaso número de amibas en los abscesos hepáticos ya establecidos. Estos trabajos se realizaron en autopsias de hígado de hamster infectados experimentalmente.

Por otro lado las fosfolipasas amibianas podrían tener actividad citolítica directa al hidrolizar los fosfolípidos de la membrana plasmática de las células blanco, como sucede con otras fosfolipasas conocidas, (1,17,21).

Los modelos in vitro como el que acabamos de describir constituyen un avance en el proceso de identificación de los posibles factores patogénicos amibianos. Nuestro método experimental y la información que obtuvimos de él abren la posibilidad inmediata de purificar las fosflipasas de P30 para finalmente analizar su contribución en la virulencia amibiana.

VI. REFERENCIAS.

- 1.- Shier, W.T. 1979. Activation of high levels of endogenous phospholipase A2 in cultured cells. Proc. Natl. Acad. Sci USA. 76: 195-199.
- 2.- Lehninger, A.L. 1979. Bioquímica. pp. 296-299. Edición Omega. S.A. Barcelona.
- 3.- Van Den Bosch, H. 1974. Phosphoglyceride metabolism. Ann. Rev. Biochem. 43: 243-277.
- 4.- Zwaal, R.F. Fluckiger, R. Monser, S. y Zahler, P. 1974. Lecithinase activities at the external surface of ruminant erythrocyte membranes. Biochim Biophys. Acta. 373: 416-424.
- 5.- Kramer, R. Jung, I.B. Zahler, P. 1974. Some characteristics of a phospholipase A2 from sheep red cell membranes. Biochim. Biophys. Acta. 373: 404-415.
- 6.- Zurini, M. Hubentobler, B. y Bazzotti, P. 1981. Activity of phospholipase A2 in the inner membrane of rat-liver mitochondria. Europ. J. Biochem. 119: 517-521.
- 7.- Nishijima, M. Akamatsu, Y. y Nojima, S. 1974. Purification and properties of a membrane bound phospholipase A from Mycobacterium phlei. J. Biol. Chem. 249: 5658-5667.
- 8.- Wells, M.A. 1972. A kinetic Study of the phospholipase A2 (Crotalus adamanteus) catalyzed hydrolysis of 1,2, dibutyryl-sn-glycero-3-phosphorylcholine. Biochemistry 11: 1030-1041.
- 9.- Waite, W. y Sisson, P. 1971, Partial purification and characterization of the phospholipase A2 from rat liver mitochondria. Biochemistry. 10: 2377-2383.
- 10.- Rosenberg, P. 1976. Toxins. Animal, Plant and Micobial. En 5th

International Symposium on Animal, Plant Microbial Toxins, San José Costa Rica, pp. 1-1134. P. Rosenberg (ed.). Pergamon Press Ltd. Headigton Hill Hall.

- 11.- Roch, O.C. y Snyder, F. 1975. Rapid purification of phospholipase A2 from Crotalus adamanteus venom by affinity chromatography. J. Biol. Chem. 250: 6565-6566.
- 12.- Ormand, W.E. y Vankatesan, S. 1982. Similarities of lipid metabolism in mammalian and protozoan cells: an evolutionary hypothesis for the prevalence of atheroma. Microbiol. Rev. 46: 296-307.
- 13.- Suzuki, T. Sadasivan, R. Saito-Taki, T. Stechschulte, J.D. y Balentine, L. 1980. Studies of Fc receptors of human B lymphocytes: phospholipase A2 activity of Fc receptors. Biochemistry 19: 6037-6044.
- 14.- King, T.P. Alagon, A.C. Kuan, J. Sobotoka, A.K. y Lichenstem, L.M. Immunochemical studies of yellow-jacket venom proteins. Mol. Immun. (en prensa).
- 15.- Shiloah, J. Kiblanisky, C. De Vries, A. y Berger, A. 1973. Phospholipase B activity of a purified phospholipase A from Vipera palestinae venom. J. Lipid. Res. 14: 267-278.
- 16.- Opperdoes, F.R. y Van Roy, J. 1982. The phospholipases of Trypanosoma brucei bloodstream forms and cultured procyclics. Mol. Biochem. Parasitol. 5: 309-319.
- 17.- Lowenstein, J.M. (ed.) 1959. Methods in Enzymology, Vol. 14, pp. 131-211. Academic Press, New York.
- 18.- Said-Fernández, S. y López-Revilla, R. 1984. Free fatty acids generated from endogenous phospholipids are the major heat-stable hemolytic factor of Entamoeba histolytica. (en prensa).
- 19.- Said-Fernández, S. y López-Revilla, R. Subcellular distribution and

- stability of the major cytolytic activity of Entamoeba histolytica trophozoites. Zeitschrift für Parasitenkunde. Parasitology Research 67: 249-259.
- 20.- Thelestam, M. y Möllby, R. 1979. Classification of microbial, plant and animal cytolisins based on their membrane damaging effects on human fibroblasts. Biochim. Biophys. Acta. 557: 156-169.
- 21.- Tizard, I. Nielsen, K.H. Seed, J.R. y Hall, J.E. 1978. Biologically active products from african trypanosomes. Microbial. Rev. pp. 661-681.
- 22.- Griffin, J.L. 1972. Humman amebic dysentery. Electron microscopy of Entamoeba histolytica contacting, ingesting and digesting inflammatory cells. Am. J. Trop. Med. Hyg. 21: 895-906.
- 23.- Trissl, D. Martínez-Palomo, A. De la Torre, M. De la Hoz, R. y Juárez, E.P. 1978. Fagocitosis de eritrocitos humanos por Entamoeba histolytica. Estudio cuantitativo. Arch. Invest. Med. 9 (Sept. 1): 219-222.
- 24.- Jarumilinta, R. y Kradolfer, F. 1964. The toxic effect of Entamoeba histolytica on leucocytes. Ann. Trop. Med. Parasitol. 58: 375-381.
- 25.- Bos, H.J. Leifendekker, W.J. y Van Der Ei JK A.A. 1980. Entamoeba histolytica: Cytopathogenicity including serum effects on contact-dependent and toxin-induced lysis of hamster kidney cell monolayers Exp. Parasitol. 50: 342-348.
- 26.- McCaul, T.F. Poston, R.N. y Bird, R.G. 1977. Entamoeba histolytica and Entamoeba invadens: Chromium release from labeled human liver cells in culture. Exp. Parasitol. 43: 342-352.
- 27.- López-Revilla, R. y Said-Fernández, S. 1980. Cytopathogenicity of Entamoeba histolytica: hemolytic activity of trophozoite homogenates.

- American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 29: 209-212.
- 28.- Rosenthal, A.F. y Geyer, R.P. Asynthetic inhibitor of venom lecithinase
A.J. Biol. Chem. 235: 2202-2206.
- 29.- López-Revilla, R. y Rodríguez-Báez, J. 1981. Manual para el cultivo
axénico de Entamoeba histolytica. Editorial Ciencia y Desarrollo,
México.
- 30.- Lowry, O.H., Rosebrough, N.S., Farr, A.L. y Randall, R.J. 1951. Protein
measurement with the folin phenol reagent. Journal of Biological
Chemistry 183: 265-275.
- 31.- 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.
- 32.- Chien, K.R. Curtis, S.S. Mitnacht, S. y Farber, J.L. 1980. Microsomal
membrane structure and function subsequent to calcium activation of an
endogenous phospholipase. Archives of Biochemistry and Biophysics. 205:
614-622.
- 33.- Franson, R. Dobrow, R. Weiss, J. Elsbach, P. y Weglicki, B. 1978.
Isolation and characterization of a phospholipase A2 from an
inflammatory exudate. Journal of Lipid Research 19: 18-23.
- 34.- Zar, J.H. 1974. Bioestatistical Analysis. Prentice Hall. pp. 130-135.
- 35.- Vargas-Villarreal, J., Saíd-Fernández, S., 1984. Entamoeba histolytica:
Cytolytic activity of cell-free trophozoite extract upon CHO cells.
Arch. Invest. Med. 15: 1-12.
- 36.- Mattern, C.F.T. Keister, D.B. y Natovitz, P.C. 1980.
Entamoeba histolytica "Toxin": fetuin neutralizable and lectin-like.
American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 29: 26-30.
- 37.- López-Revilla, R. Cano-Mancera, R. 1982. Adhesion of

- Entamoeba histolytica trophozoites to human erythrocytes. Infect. Immun. 37: 281-285.
- 38.- Takeuchi, A. y Phillips, P.B. 1975. Electron microscope studies of experimental intestinal epithelium by trophozoites. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 24: 34-38.
- 39.- Said-Fernández, S. y López-Revilla, R. 1981. Cytopathogenicity of Entamoeba histolytica: Trophozoite homogenates modulate DNA synthesis in a mammalian cell line. 2. Parasitenkunde pp. 1-7.
- 40.- Lushbaugh, W.B. Kairalla, A.B. Cantey, J.P. Hofbauer y Pittman, F.E. 1979. Isolation of a cytotoxin-enterotoxin from Entamoeba histolytica. Journal of infectious diseases 139: 9-17.
- 41.- Gold, D. Norman, L.G. Maddison, S.E. y Kagan I.G. 1978. Immunologic studies on hamsters infected with Entamoeba histolytica. J. Parasitol. 64: 866-873.
- 42.- Trissl, D. 1982. Immunology of Entamoeba histolytica in human and animal hosts. Reviews of Infectious Diseases. 4: 1154-1184.
- 43.- Mattern, C.F.T. Keister, D.B. y Caspar, P.A. 1978. Experimental amebiasis III. A rapid in vitro assay for virulence of Entamoeba histolytica. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 27: 882-887.
- 44.- Ravdin, J.I. Croft, B.Y. y Guerrant, R.L. 1980. Cytopathogenic mechanisms of Entamoeba histolytica: Journal of Experimental Medicine 152: 377-390.
- 45.- Prasad, A.K. Das, S.R. Sagar. P. 1982. Haemolysis: an in vitro model to investigate tissue necrotic activity of Entamoeba histolytica. Ind. J. Exptl. Biol. 20: 721-725.
- 46.- Eaton, R.D.P. Meerouitch, E. y Costerton, J.W. 1970. The functional

- morphology of pathogenicity in Entamoeba histolytica. Annals of Tropical Medicine and Parasitology. 64: 299-304.
- 47.- Moncada, S. y Vane, J.R. 1978. Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A2 and prostacyclin. Pharmacological Reviews. 30: 293-331.
- 48.- Bos, H.J. 1979. Entamoeba histolytica: Cytopathogenicity of intact amebae and cell-free extracts; isolation and characterization of an intracellular toxin. Experimental Parasitology. 47: 369-377.
- 49.- Tsutsumi, I.V. Mena, R.L. Anaya, V.F. y Martinez, P.A. 1984. Cellular bases of experimental amebic liver abscess formation. American Journal Parasitology. 117: 81-91.

