

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**“CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE LA PRINCIPAL
ACTIVIDAD FOSFOLIPASA TIPO A₁ Y A₂ EN
SUBFRACCIONES DE *Trichomonas tenax*”**

Por

Q.F.B. EDNA MARBELLA GARCÍA MUÑOZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS
CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA

Julio, 2019

**CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE LA PRINCIPAL
ACTIVIDAD FOSFOLIPASA A₁ Y A₂ EN
SUBFRACCIONES DE *Trichomonas tenax*.**

Comité de Tesis

Dr. Carlos Eduardo Hernández Luna
Director de Tesis

Dra. Licet Villarreal Treviño
Secretario

Dr. Juan Francisco Contreras Cordero
1er. Vocal

Dr. José Santos García Alvarado
2do. Vocal

Dr. Javier Vargas Villarreal
3er. Vocal

**CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE LA PRINCIPAL
ACTIVIDAD FOSFOLIPASA A₁ Y A₂ EN
SUBFRACCIONES DE *Trichomonas tenax*.**

Dirección de Tesis

Dr. Carlos Eduardo Hernández Luna
Director Interno de Tesis
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad Autónoma de Nuevo León

Dr. Javier Vargas Villarreal
Director Externo de Tesis
Centro de Investigaciones Biomédicas del Noreste
Instituto Mexicano del Seguro Social

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por guiarme durante todo mi camino y darme fuerzas para superar los obstáculos y las dificultades que se me presentaron a lo largo de toda mi vida.

A mis Padres, José Luis García Alanis y Miriam Isela Muñoz Dávila, mis Hermanos, Miriam, Mayela, Mayra y José Luis; que en todo este tiempo me han apoyado en cada una de las locas decisiones que he tomado, por acompañarme durante todo este camino y estar conmigo en las buenas y no tan buenas.

A mis amigos, Fernanda, Edgar y Alex, por su apoyo durante todo el tiempo que tenemos en conocernos.

A mis Asesores, por su enseñanza, asesoría, observaciones, su valioso apoyo brindado en la realización de este trabajo de tesis.

Al Dr. Javier Vargas Villarreal, por todo el apoyo y las palabras de aliento que me brindó antes y durante de esta tesis.

A la Dra. Magda Elizabeth Hernández García, por siempre escucharme y guiarme en este nuevo mundo.

A mis amigos y compañeros de generación, gracias por ayudarme y confiar en mí.

Gracias a todas las personas que ayudaron directa e indirectamente en la realización de este proyecto.

DEDICATORIAS

A mi familia, especialmente mis papás:

José Luis y Miriam Isela

Por estar para mí siempre, en mis victorias y sobre todo en mis derrotas.

A mis hermanos:

Miriam, Mayela, Mayra y José Luis.

A mis Abuela:

Arcelia Dávila

Por nunca dejarme sola y alentarme a salir adelante.

Al Dr. Benito David Mata Cárdenas (QEPD)

Por introducirme al mundo de la investigación y la parasitología.

Un saludo al cielo.

A mi novio

Alejandro Villagran

Por acompañarme durante mis estudios de maestría, sin ti hubiera sido muy difícil
continuar y concluir mis estudios.

A mis maestros, colegas y amigos.

Con cariño,

Marbella García

El desarrollo experimental para la elaboración de esta tesis se llevó a cabo en el Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León; así como en el Laboratorio de Biología y Fisiología Celular del Centro de Investigación Biomédica del Noreste, Instituto Mexicano del Seguro Social.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS	IX
ÍNDICE DE FIGURAS.....	X
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	XI
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
ANTECEDENTES	4
Clasificación	5
Morfología	5
Ciclo de vida	6
Virulencia y Epidemiología de <i>T. tenax</i>	7
Características de las Fosfolipasas del Tipo A ₁ y A ₂	9
Clasificación de las Fosfolipasas.....	10
JUSTIFICACIÓN.....	13
HIPÓTESIS.....	14
OBJETIVOS.....	15
Objetivo General	15
Objetivos Específicos	15
MATERIAL Y MÉTODOS.....	16
RESULTADOS	29
Cultivos de <i>T. tenax</i>	30
Resiembra y cosecha	30
Cultivos masivos.....	30

Curva de crecimiento.....	31
Obtención del Extracto total (ET), sobrenadante a 30,000 g (S30) y precipitado (P30) a 30,000 g.....	32
Cuantificación de proteínas	32
Determinación de los productos de hidrólisis (AGL, LFC y FC).....	33
Determinación de la actividad fosfolipasa del tipo A	34
Curva temporal de la actividad fosfolipasa del tipo A	34
Curva dosis-respuesta de la actividad fosfolipasa del tipo A.....	36
Determinación del pH óptimo de actividad	39
Determinación de la dependencia de Calcio	40
DISCUSIÓN	42
CONCLUSIONES	48
PERSPECTIVAS	49
BIBLIOGRAFÍA.....	50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición del medio TYI-S-33 (Diamond, 1978)	17
--	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Trichomonas spp.	6
Figura 2. Vía de transmisión (saliva) y ciclo biológico de <i>T. tenax</i>	7
Figura 3. Clasificación de las fosfatidil-acil-hidrolasas, de acuerdo con la posición en la molécula del éster que hidrolizan.	10
Figura 4. Diagrama de obtención de las subfracciones celulares de <i>T. tenax</i> . .	24
Figura 5. Curva de calibración de proteínas por método de Lowry.	26
Figura 6. Relación temporal del crecimiento de <i>T. tenax</i>	32
Figura 7. Curva de calibración de proteínas por método de Lowry.	33
Figura 8. Relación temporal de la actividad fosfolipasa (PLA) en el extracto total (ET).....	35
Figura 9. Relación temporal de la actividad fosfolipasa (PLA) en la subfracción P30.	35
Figura 10. Relación temporal de la actividad fosfolipasa (PLA) en la subfracción S30.	36
Figura 11. Curva dosis-respuesta de la actividad fosfolipasa (PLA) en el extracto total (ET).....	37
Figura 12. Curva dosis-respuesta de la actividad fosfolipasa (PLA) en la subfracción P30.	38
Figura 13. Curva dosis-respuesta de la actividad fosfolipasa (PLA) en la subfracción S30.	38
Figura 14. Evaluación del pH óptimo de la actividad fosfolipasa tipo A ₁ (PLA ₁)	39
Figura 15. Evaluación del pH óptimo de la actividad fosfolipasa tipo A ₂ (PLA ₂)	40
Figura 16. Evaluación de la dependencia de Calcio de la fosfolipasa tipo A ₁ (PLA ₁).....	41
Figura 17. Evaluación del pH óptimo de la actividad fosfolipasa tipo A ₂ (PLA ₂).	41

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

μCi	MicroCuries
μg	Microgramos
μl	Microlitros
μm	Micrómetros
$\%$	Porciento
AGL	Ácidos Grasos Libres
ANCOVA	Análisis de covarianza para pendientes e interseptos
B	Número de organismos al comienzo del intervalo de tiempo
b	Número de organismos al final del intervalo de tiempo
cm	Centímetros
DO	Densidad Óptica
ET	Extracto Total
FC	Fosfatidilcolina
g	Gramos
g	Gramos
G	Tiempo de generación
h	Hora
L	Litro
LFC	Lisofosfatidil colina
mg	Miligramos
min	Minutos
ml	Mililitros
mm	Milímetros
mM	Concentración milimolar
mol	Concentración molar
mOsm	Milosmoles
N	Concentración Normal
nm	Nanómetros

°C	Grados Celsius
P30	Precipitado a 30,000 g
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
pH	Potencial de Hidrógeno
PLA	Actividad fosfolipaa
PLA ₁	Actividad fosfolipasa A ₁
PLA ₂	Actividad fosfolipasa A ₂
psi	Libras por pulgada cuadrada, por sus siglas en inglés
r ²	Coeficiente de correlación de la recta
rpm	Revoluciones por minuto
S30	Sobrenadante a 30,000 g
SAB	Seroalbúmina bovina
SSB	Solución Salina de Hank
t	Intervalo de tiempo de la fase exponencial
td	Tiempo de duplicación
X	Concentración con respecto a la solución de trabajo

RESUMEN

Se tenía la seguridad de que solo las bacterias formaban los cálculos dentales en la boca de las personas con enfermedades periodontales. En la actualidad, se han demostrado la presencia hongos, micoplasmas, amebas y *Trichomonas tenax*. Existen evidencias científicas suficientes para implicar a *T. tenax* en diversos procesos infecciosos que se llevan a cabo fuera de los límites de la cavidad bucal como en: a) absceso pulmonar o bronconeumonía, b) relacionado con cáncer pulmonar, c) líquido cerebroespinal, d) en pus de absceso sub-hepático, e) fibrosis quística en seno.

Hasta la fecha solo se ha descrito actividad enzimática de cisteína-proteasas en *T. tenax*. Hasta ahora no se han caracterizado actividades fosfolipasas de tipo A₁ y A₂ en *T. tenax*. Estas enzimas se les ha involucrado estrechamente en diferentes procesos fisiológicos para la destrucción celular como: I) recambio de fosfolípidos en las biomembranas, II) digestión en los fagosomas, III) neurotoxicidad y citotoxicidad en venenos muy activos de hongos, celenterados, insectos, arácnidos y reptiles y IV) en procesos inflamatorios.

El objetivo del presente trabajo fue encontrar y caracterizar parcialmente la actividad de fosfolipasas tipo A₁ y A₂ en subfracciones celulares (S30 y P30), así como en extracto total de *T. tenax*. Para cumplir dicho objetivo realizamos cinéticas de crecimiento en donde determinamos el tiempo de generación (12h 37 min) y el tiempo de duplicación (8h 44 min) de la cepa de *T. tenax* ATCC-30207, cultivada en medio TYI-S-33. Obtuvimos el extracto total y las subfracciones, S30 y P30, a partir de un cultivo masivo. Una vez obtenidas y cuantificado las proteínas de las subfracciones P30 y S30, junto con el extracto total se determinó la actividad fosfolipasa del tipo A₁ y A₂ por el método de radioensayo, en donde encontramos que ambas actividades fosfolipasa, cuyo pH óptimo es de 8 (PLA₁) y 6 (PLA₂), ambas dependientes del tiempo, la dosis y la concentración de Calcio. Nuestro grupo ha identificado la presencia por primera vez de la actividad fosfolipasa A₁ y A₂ en *T. tenax*. Con estos resultados demostramos que la actividad fosfolipasa se debe a una actividad enzimática, ya que fue dependiente tanto del tiempo de incubación, así como de la dosis-respuesta. Con estos resultados también identificamos el tipo de fosfolipasa A₁ y A₂ de *T. tenax*.

ABSTRACT

Lately, we were convinced that only bacteria formed dental calculus in the mouths of people with periodontal diseases. At present, the presence of fungi, mycoplasmas, amoebae and *Trichomonas tenax* have been demonstrated. There is sufficient scientific evidence to implicate *T. tenax* in various infectious processes that take place outside the limits of the oral cavity as in: a) lung abscess or bronchopneumonia, b) related to lung cancer, c) cerebrospinal fluid, d) in pus of sub-hepatic abscess, e) cystic fibrosis in breast.

To date, only enzymatic activity of cysteine proteases has been described in *T. tenax*. Until now, phospholipase activities of type A₁ and A₂ in *T. tenax* have not been characterized. These enzymes have been closely involved in different physiological processes that are important for cell destruction, such as: I) phospholipid replacement in bio-membranes, II) digestion in phagosomes, III) high levels of neurotoxicity and cytotoxicity in poison of mushroom, coelenterates, insects, arachnids and reptiles and IV) in inflammatory processes.

The aim of the present work is to find and characterize partially the activity of phospholipases type A₁ and A₂ in cellular subfractions (S30 and P30), as well as in the total extract of *T. tenax*. To achieve this, we performed growth kinetics and we determined the generation time (12h 37 min) and doubling time (8h 44 min) of the strain of *T. tenax* ATCC-30207, cultivated in TYI-S-33 medium. We obtained the total extract and the subfractions, S30 and P30, from a mass culture. Once the proteins of the P30 and S30 subfractions were obtained and quantified, together with the total extract, the phospholipase activity of type A₁ and A₂ was determined by the radioassay method, where we found that both phospholipase activities, whose optimal pH is 8 (PLA₁) and 6 (PLA₂), both dependent on time, dose and concentration of Calcium. Our team has identified the presence for the first time of the phospholipase activity A₁ and A₂ in *T. tenax*. With these results we showed that the phospholipase activity is due to an enzymatic activity, since it was dependent on both the incubation time and the dose-response. With these results we also identified the type of phospholipase A₁ and A₂ present in *T. tenax*.

INTRODUCCIÓN

Trichomonas tenax es un protozoario que vive en el cálculo dental y forma parte de la microbiota que conforma la placa dental subgingival (Pardi *et al.*, 2002). Este protozoario presenta una distribución mundial, encontrado especialmente en pacientes con una mala higiene bucal y enfermedad periodontal (Honigberg y Burgess, 1994).

Trichomonas tenax se considera un organismo comensal (Hersh, 1985), pero ha sido identificado en el tracto respiratorio humano responsable de enfermedades respiratorias (Ribeiro *et al.*, 2015).

Pese a que *T. tenax* puede estar como comensal en la cavidad bucal de algunos individuos, está claramente demostrado el papel que juega esta especie como microorganismo patógeno, implicado en distintos procesos patológicos que suscitan tanto dentro como fuera de los límites de la boca, constituyendo ésta un foco de infección (Pardi *et al.*, 2002).

Aun cuando la patogénesis y virulencia en la tricomoniasis no están completamente entendidas, ya se han identificado posibles moléculas de este parásito que pueden causar daño a las células y tejidos del hospedero (Schwebke y Burgess, 2004).

Las fosfolipasas pertenecen al grupo de las hidrolasas y son conocidas con el nombre genérico de esterasas (Dennis, 1983), ya que actúan sobre los enlaces éster de los fosfolípidos (Dennis, 1983). Las fosfolipasas A se localizan principalmente en las membranas plasmáticas y en los lisosomas de todas las células estudiadas hasta ahora (Shier, 1979), pero también pueden encontrarse en forma soluble, principalmente formando parte de venenos de hongos y de animales o de toxinas de microorganismos (Rosenberg, 1976; Roch y Snyden, 1975).

La siguiente investigación tiene por motivo caracterizar parcialmente la actividad de fosfolipasas de tipo A₁ y A₂, tanto en extracto total, como en las fracciones P30 y S30 de *T. tenax*, puesto que estas enzimas se han propuesto, en estudios previos, como un factor de virulencia en otros microorganismos.

ANTECEDENTES

Hasta hace poco tiempo, se tenía la seguridad que los microorganismos que conforman la placa dental en la boca de las personas sin higiene y principalmente con enfermedades periodontales, eran solo las bacterias (de allí el nombre de placa bacteriana), también se sabía que estas mismas bacterias son las responsables de la formación del cálculo dental (Pardi *et al.*, 2002). En la actualidad, se sabe que estos microorganismos, aun cuando su gran mayoría son bacterias, no son las únicas, ya que se han encontrado algunas especies de hongos, micoplasmas y amebas de vida libre (*Entamoeba gingivalis*), además una especie muy característica de *T. tenax*, lo cual ha llamado mucho su atención.

Existen hasta la actualidad tres especies distintas del género *Trichomonas* que son hospederos del hombre: *T. vaginalis*, (se encuentra principalmente en aparato genitourinario), *T. hominis* (que se hospeda en el intestino) y *T. tenax* (que invade la cavidad bucal). Las tres *Trichomonas* son morfológica, serológica, epidemiológica y culturalmente diferentes entre sí (Hersh, 1985).

Trichomonas tenax es un parásito de la cavidad oral humana, aunque ya existen reportes que además se encuentra también en otras especies como: primates, perros, gatos y caballos principalmente; sin embargo, no queda claro si *T. tenax* es específico solo para los humanos. (Honigberg, 1978; Dybicz *et al.*, 2018). *T. tenax* presenta una distribución mundial encontrado especialmente en pacientes con una mala higiene bucal y enfermedad periodontal (Honigberg y Burgess, 1994). Su prevalencia oscila entre 4 al 53% en la boca de pacientes con esas prácticas de higiene (Honigberg y Burgess, 1994). La forma de transmisión más frecuente es a través de saliva, gotitas de saliva y los besos. Además, se ha determinado que los platos contaminados y agua potable también son forma de contaminación de este protozoario (Hersh, 1985).

Trichomonas tenax es un protozoario que vive en el cálculo dental y forma parte de la microbiota que conforma la placa dental subgingival, alrededor de los dientes que se encuentran en la cavidad bucal humana. También es posible encontrarlo en las células de la mucosa necrótica de los márgenes gingivales de las encías, en los abscesos

purulentos de las amígdalas y puede sobrevivir durante varias horas en el agua para beber (Pardi *et al.*, 2002). *Trichomonas tenax* asimismo se ha encontrado en otros órganos y tejidos, como ganglios linfáticos, glándulas submaxilares, amígdalas, bronquios, pulmones, glándula mamaria e hígado (Dybicz *et al.*, 2018).

Clasificación

T. tenax por su morfología se le ha designado la siguiente caracterización filogenética:

Phylum: *Protozoa*
Subphylum: *Sarcomastigophora*
Superclase: *Mastigophora*
Clase: *Zoomastigophorea*
Familia: *Trichomonadidae*
Género: *Trichomonas*
Especie: *tenax.*

Morfología

Trichomonas tenax, presenta una estructura o forma ovoide o elipsoidal con un tamaño de entre 4 y 13 μm y de anchura es de 2 y 9 μm . Este protozoario presenta cuatro flagelos anteriores libres y un flagelo posterior o recurrente que se encuentra pegado a una membrana ondulante, carece de mitocondrias, posee un aparato de Golgi denominado para-basal (Poirier *et al.*, 1990) y hasta ahora no se le conoce más que solo un tipo de forma de vida que es el trofozoíto, no produce quistes y este protozoario se multiplica principalmente en forma asexual por división binaria longitudinal (Faust *et al.*, 1974).

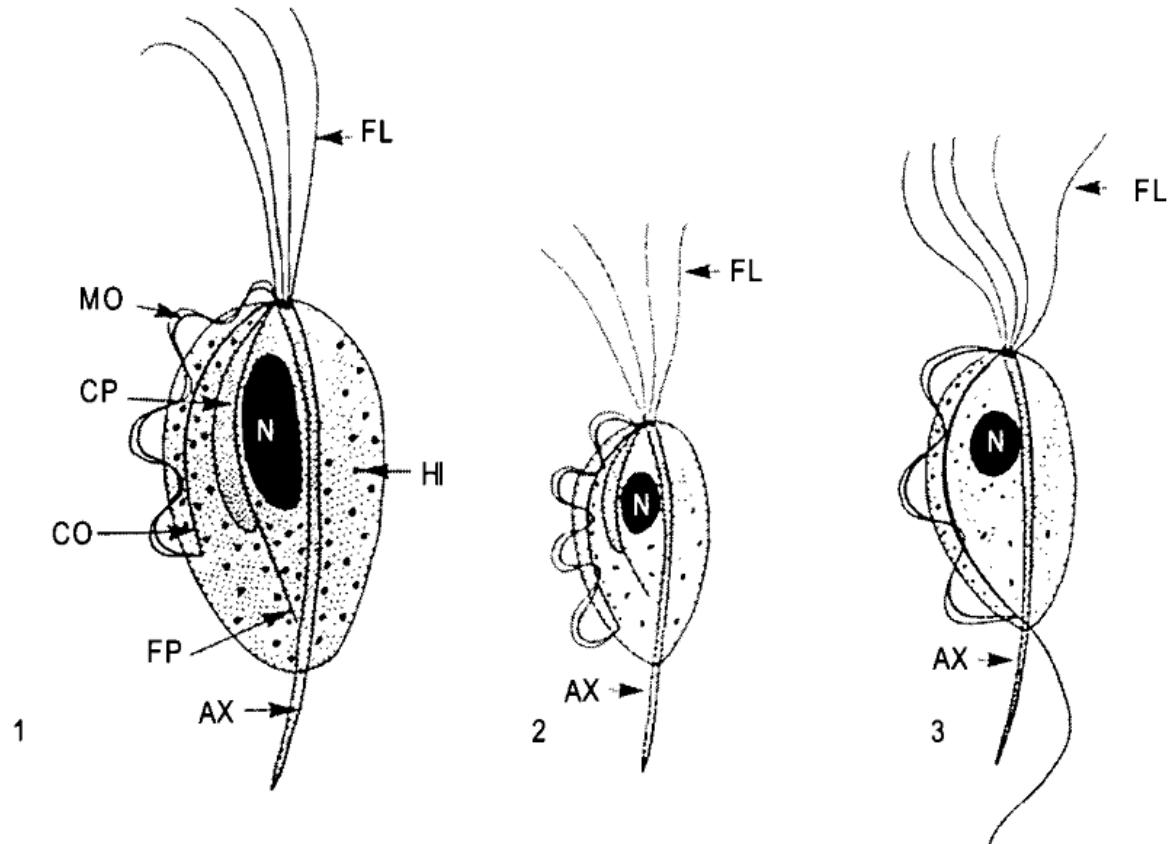


Figura 1. *Trichomonas* spp. 1=*Trichomonas vaginalis*; 2=*Trichomonas tenax*; 3=*Trichomonas hominis*. FA=Flagelo Anterior; MO=Membrana Ondulante; CP=Cuerpo Parabasal y Aparato de Golgi (se ven juntos); CO=Costa; N=Núcleo; FP=Filamento Parabasal; AX=Axóstilo; H=Hidrogenosomas.

Ciclo de vida

Trichomonas tenax vive exclusivamente en la cavidad bucal de los seres humanos, perros y gatos, disperso entre los dientes, las encías, la lengua y la saliva del hospedador. Los trofozoítos, al no presentar estado de quiste, son infectantes en todo momento. La vía de transmisión es la saliva y la infección puede producirse de forma directa, a través de un beso, o de forma indirecta, a través del contacto con un vaso, cubierto o cualquier cosa que pueda tener restos de saliva infectada. Una vez establecidos en el nuevo hospedador los trofozoítos se dividen y se extienden por toda la cavidad bucal.

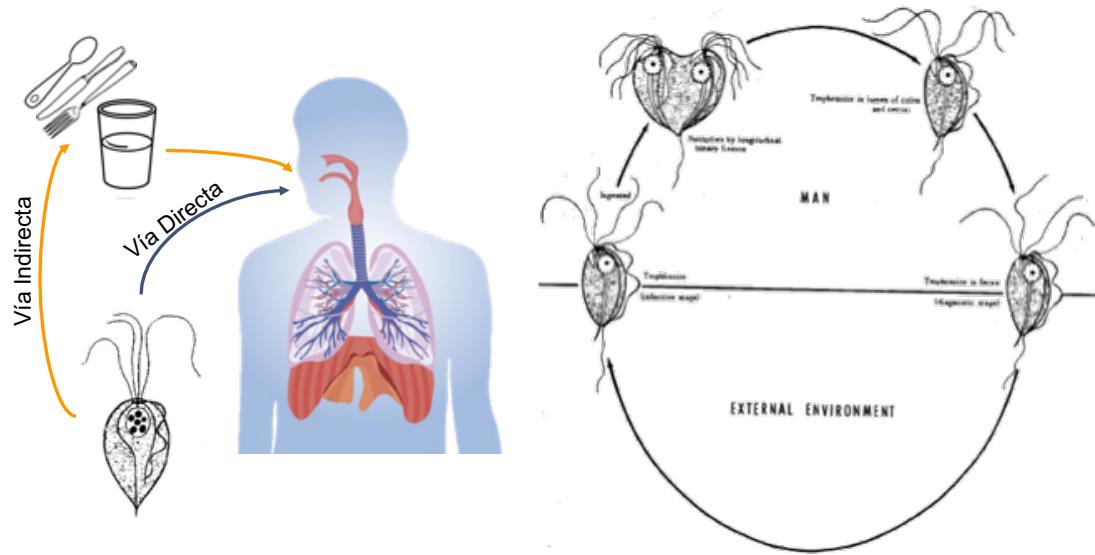


Figura 2. Vía de transmisión (saliva) y ciclo biológico de *T. tenax* (Pardi *et al.*, 2002).

Virulencia y Epidemiología de *T. tenax*.

Una característica específica del género *Trichomonas* es que ni *T. tenax*, ni *T. hominis*, ni *T. vaginalis* presentan estadios de quistes.

El desarrollo de una enfermedad generalmente es un proceso multifactorial, donde la virulencia de los microorganismos puede no estar determinada por la acción de un solo componente celular. Los factores de virulencia de los microorganismos son moléculas que generalmente intervienen dañando al hospedero o manipulando el sistema inmunológico del mismo.

La virulencia de la mayoría de los microorganismos es un fenómeno muy complejo que depende de dos propiedades generales: a) invasividad o capacidad de los agentes patogénicos para multiplicarse y causar destrucción localizada de los tejidos invadidos por ellos y b) toxigenicidad o capacidad de los agentes patogénicos para producir y liberar sustancias que pueden causar lesiones a distancia (Rosenberg, 1976).

La virulencia de *T. tenax*, cuyos mecanismos patogénicos se desconocen en gran parte, parece depender fundamentalmente de los trofozoítos y su propiedad de invasividad, aunque todavía no se ha documentado científicamente su toxicidad.

Aun cuando la patogénesis y virulencia en la tricomoniasis no están completamente entendidas, ya se han identificado posibles moléculas de este parásito que pueden causar daño a las células y tejidos del hospedero (Schwebke y Burgess, 2004).

Dentro de las actividades enzimáticas, una variedad de hidrolasas ha sido descritas en *T. tenax*, siendo las cisteín-proteasas particularmente prevalentes.

La actividad proteolítica de *T. tenax* viene mediada por la presencia de proteinasas de la cisteína o cisteinasas las cuales son responsables de hidrolizar distintos tipos de colágeno (Tipos I, III, IV y V), presentes todos en los tejidos periodontales (Bozner y Demes, 1991), así como por la presencia de endopeptidasas. Por otra parte, se ha demostrado que *T. tenax* posee actividad lítica sobre los glóbulos rojos de humanos, caballos, conejos y ovejas. Esto se debe a que este protozoario sintetiza dos tipos distintos de hemolisinas, una de estas es de naturaleza proteica, termolábil y puede ser inhibida por varios inhibidores de la cisteinasas, en tanto que la otra es de naturaleza lipídica, termoestable y su actividad no se afecta por inhibidores ni activadores de proteinasas (Nagao *et al.*, 2000).

Existen muchas evidencias científicas donde se ha aislado *T. tenax* de muestras de cálculo dental y placa dental subgingival de pacientes con problemas periodontales (principalmente Gingivitis y Periodontitis Marginal Crónica), por lo que su incidencia en este tipo de patologías ha sido claramente demostrada (Pardi *et al.*, 2002). También se ha podido detectar a este protozoario en pacientes con gingivitis ulcerativa aguda (Blake, 1968; Gottlieb *et al.*, 1968).

Existen evidencias científicas suficientes para implicar a *T. tenax* en diversos procesos infecciosos que se llevan a cabo fuera de los límites de la cavidad bucal. Tales evidencias, se han reportado en varios casos de tricomoniasis pulmonar donde se ha

encontrado la presencia de numerosos trofozoítos del protozoario en muestras tomadas de exudados purulentos de la pleura y del esputo de los pacientes implicados, además se ha observado un incremento del porcentaje de eosinófilos en fluidos bronco-alveolares de pacientes infectados con este parásito (Pardi *et al.*, 2002).

También se ha reportado un caso de un paciente el cual se aisló *T. tenax* a partir de muestras tomadas del líquido cerebroespinal de un paciente (Mazur y Hook, 1976). *T. tenax*, también se localizó en muestras de pus provenientes de un absceso sub-hepático en un paciente alcohólico (Jakobsen *et al.*, 1987). De igual forma, se identificó a *T. tenax* en muestras provenientes de 3 pacientes con Fibrosis Quística en seno (Krvavac, 1998).

En 2008 un estudio realizado en México por Fuentes-Cuevas *et al.* en el cual estudiaron a 150 niños de 3 a 14 años, encontrando una prevalencia de 8.7% positiva para *E. gingivalis*, 12.7% positiva para *T. tenax* y 1.3% positiva para ambos; encontrando una prevalencia global de 22.7%, en donde se encontró una asociación con la edad y con enfermedad periodontal pero no con el género.

Desde hace algunos años se ha propuesto que la presencia de actividades biológicas asociadas a membrana o liberadas al medio de cultivo, podrían estar involucradas en los mecanismos líticos usados por los parásitos del género de *Trichomonas* (Lubick y Burgess, 2003).

Trichomonas tenax todavía se considera un comensal, aunque su alta actividad proteolítica, y especialmente la actividad colagenolítica de este flagelado, explica su efecto destructivo sobre las membranas mucosas y los tejidos (Dybcz *et al.*, 2018).

Características de las Fosfolipasas del Tipo A₁ y A₂.

A las fosfolipasas se les ha encontrado tanto dentro como fuera de las células, es por ello por lo que se les ha denominado enzimas muy ubicuas (Van Den Bosch, 1980). La mayoría de éstas forman parte esencial de diversos procesos fisiológicos como: I) recambio de fosfolípidos en las biomembranas, II) digestión en los fagosomas, III)

neurotoxicidad y citotoxicidad en venenos muy activos de hongos, celenterados, insectos, arácnidos y reptiles, IV) en procesos inflamatorios, V) producción de ácidos grasos libres, a partir de los cuales, las ciclooxygenasas sintetizan prostaglandinas, las cuales intervienen en muy diversos mecanismos de regulación celular (Van Den Bosch, 1980; Hawthorne y Ansell, 1982).

Clasificación de las Fosfolipasas

Las fosfolipasas pertenecen al grupo de las hidrolasas y son conocidas con el nombre genérico de esterasas (Dennis, 1983), ya que actúan sobre los enlaces éster de los fosfolípidos (Dennis, 1983). Estas enzimas se dividen en: A₁, A₂, B, C y D, de acuerdo con la posición del éster que hidrolizan preferentemente (Figura 3). (Dennis, 1983; Van Den Bosch, 1980; Hawthorne y Ansell, 1982).

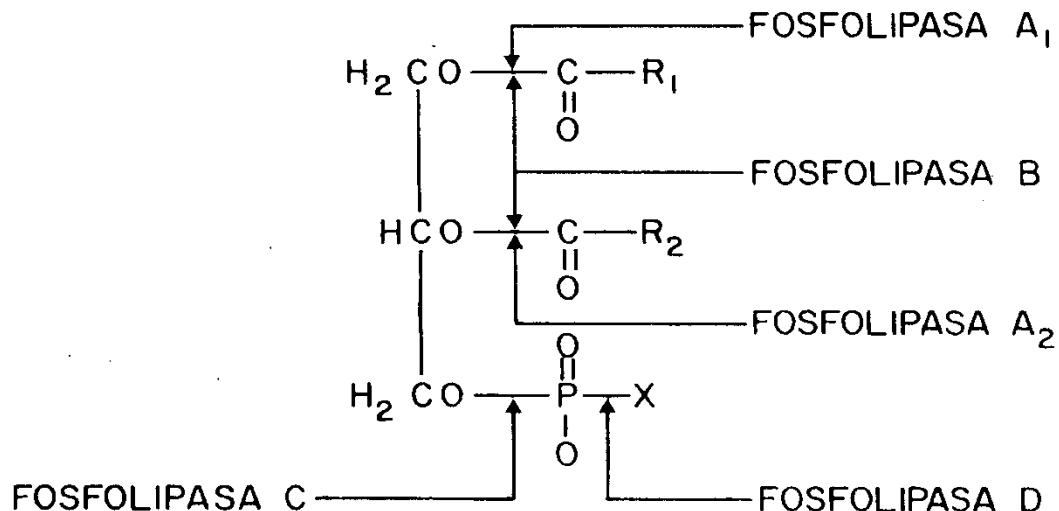


Figura 3. Clasificación de las fosfatidil-acil-hidrolasas, de acuerdo con la posición en la molécula del éster que hidrolizan.

- I) **Tipo A₁ (EC 3.1.1.32);** son aquellas enzimas que hidrolizan la posición sn-1-fosfoglicérido, liberando el ácido graso de la posición 1 y un monoacil-2-

glicerofosfátilo, en forma equimolar. Estas enzimas se han encontrado en células procarióticas y eucarióticas. En general, son independientes de calcio y requieren un pH ácido o ligeramente neutro para su funcionamiento (Dennis, 1983; Van Den Bosch, 1980).

- II) Tipo A₂ (EC 3.1.1.4);** son enzimas lipolíticas que hidrolizan el acilo de la posición 2 de un fosfoglicérido, produciendo un ácido graso y un monoacil-1-glicerofosfátilo, en forma equimolar (Dennis, 1983). Se han aislado aproximadamente 50 de estas fosfolipasas. Principalmente de páncreas de mamíferos, veneno de serpientes, abejas y diversos microorganismos (Dennis, 1983). Se les ha localizado extracelularmente en forma insoluble, asociadas a membranas plasmáticas o lisosomales, o solubles en lisosomas y citosol.
- III) Tipo B.** Se conocen a este tipo de enzimas como enzimas que rompen simultáneamente los dos ácidos grasos, quedando un gliceril-fosforilcolina. Se les ha encontrado en levaduras, bacterias y hongos. Su pH óptimo es generalmente alcalino (Dennis, 1983; Van Den Bosch, 1980).
- IV) Tipo C (EC 3.1.4.3);** catalizan la desacilación de diacilglicero-fosfolípidos en 1,2-diacilglicero y fosforilcolina. Son producidas por ciertas bacterias o están asociadas a membrana en células vegetales, algas y levaduras (Dennis, 1983; Van Den Bosch, 1980).
- V) Tipo D (EC 3.1.4.4);** catalizan la hidrólisis del enlace éster arriba del fosfato, produciendo una molécula de colina y un 1,2-diacilgliceril-fosfátilo. Este tipo de enzimas se han encontrado principalmente en plantas, levaduras y bacterias (Dennis, 1983; Van Den Bosch, 1980).

El papel de las actividades de las fosfolipasas del tipo A, en los mecanismos patogénicos de *T. tenax* permanece sin ser definido. Estas enzimas ya se han propuesto como un factor de virulencia en otros microorganismos como *Clostridium perfringens*

(Flores *et al.*, 2004), *Giardia lamblia* (Vargas-Villarreal *et al.*, 2007) y *Entamoeba histolytica* (Vargas-Villarreal, 1995).

Debido a lo anterior creemos que la búsqueda y caracterización de las fosfolipasas tipo A₁ y A₂ en *T. tenax* es un prerequisito para establecer su papel en el mecanismo patogénico de este parásito e intentar su purificación más adelante usando una columna de afinidad específica para esta enzima.

JUSTIFICACIÓN

Trichomonas tenax es un protozoario que vive y se multiplica en las cavidades periodontales de la boca de los hospederos con mala higiene bucal de las personas infectadas. Actualmente se ha encontrado a *T. tenax* en pulmones y senos de mujeres con cáncer, principalmente. Los factores de virulencia involucrados en la sobrevivencia y los efectos patogénicos de este parásito todavía se desconocen porque todos lo han asociado a solo ser simbiosis con el hospedero. En este protozoario solo se han caracterizado dos actividades proteolíticas del tipo cisteín-proteasas, se presupone que estas actividades podrían estar involucradas en su mecanismo de patogenicidad.

Por otro lado, desde hace algunos años se ha estudiado intensamente a las fosfolipasas del tipo A de los más diversos orígenes, ya que su importancia radicada en su capacidad para hidrolizar fosfolípidos y producir ácidos grasos libres y lisofosfatidilcolina, ambos productos se acumulan como consecuencia de una misma reacción, pero sus efectos son muy variados dependiendo el origen, localización y mecanismo de regulación de las fosfolipasas (Van Den Bosch, 1980). Además, se ha observado, que las PLA de un gran número de microorganismos patógenos son potentes citolisinás. A muchos de los parásitos que se han caracterizado por destruir tejidos, como parte de sus venenos muy activos como: especies elápides de serpientes, venenos de abejas, algunas hormigas, protozoarios, hongos y bacterias principalmente, la cual está fuertemente implicada en la lisis celular y por consiguiente se les ha propuesto mecanismo patogénico respectivo.

Hasta la fecha no se han encontrado evidencias que apoyen o demuestren la presencia de actividad fosfolipasa del tipo A₁ o A₂ en *T. tenax*. La caracterización parcial de esta enzima en *T. tenax* es un prerequisito indispensable para investigar si esta enzima juega un papel relevante en la virulencia de este microorganismo. La cual nos daría un ideal confiable de cómo manejar mejor a estas enzimas, para posteriormente intentar su purificación, ya que una vez puras se podría investigar la participación y contribución real de cada enzima en el mecanismo patogénico de *T. tenax* o en su metabolismo respectivo de lípidos.

HIPÓTESIS

El extracto total y las fracciones sub-celulares de *T. tenax* presentan actividad de fosfolipasas tipo A₁ y A₂.

OBJETIVOS

Objetivo General

Encontrar y caracterizar parcialmente la actividad de fosfolipasas tipo A₁ y A₂ en el extracto total y fracciones P30 y S30 de *T. tenax*.

Objetivos Específicos

- I. Obtener los parámetros de crecimiento de *T. tenax* para obtenerlo en fase logarítmica y las mejores condiciones de crecimiento y obtener: a) tiempo de duplicación, b) tiempo de generación, c) intercepto al origen, d) r^2 , mediante cinéticas de crecimiento.
- II. Obtener el extracto celular y las subfracciones mediante el uso del homogeneizador del tipo Elvehjem-Potter.
- III. Determinar la actividad de fosfolipasa tipo A₁ y A₂ en extractos celulares de *T. tenax* utilizando el método de radioensayo con el sustrato específico, [N-2-ácido graso del 2 del glicerol ¹⁴C]-fosfatidilcolina.
- IV. Caracterizar fisicoquímicamente las actividades de fosfolipasas tipo A₁ y A₂ en *T. tenax*. En todas las actividades obtendremos: a) la curva temporal, b) curva dosis respuesta, c) pH óptimo de actividad y d) dependencia de calcio utilizando el método de radioensayo.
- V. Identificar el tipo de fosfolipasa tipo A, si es A₁ o A₂.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material

Origen de los reactivos

De las siguientes compañías obtuvimos cada uno de los reactivos utilizados en la presente tesis:

- **Bioxón (Becton Dickinson de México S.A. de C.V.):** Peptona de caseína, dextrosa.
- **Control Técnico y Representaciones, S.A. de C.V. (Monterrey, N. L. México):** Fosfato de potasio monobásico, fosfato de potasio dibásico, ácido acético glacial, cloroformo, cloruro de sodio.
- **DIFCO Laboratories (Detroit, Michigan, E.U.A.):** Extracto de levadura.
- **Merck México, S. A.:** Placas de cromatografía capa fina, 2,5-difeniloxazole (PPO).
- **New England Nuclear (Boston Mass. EUA):** substratos radiactivos L-1-lisopalmitoil-L-1-[palmitoil-1-¹⁴C]-Fosfatidilcolina; L- α -dipalmitoil-[2-palmitoil-1-¹⁴C]-Fosfatidil-colina; L-dipalmitoil-[colina-metil-3H]-Fosfatidilcolina.
- **Productos Químicos Monterrey, S. A.:** Carbonato de sodio, ácido clorhídrico, cloruro de calcio, hidróxido de sodio, yodo resublimado, citrato férrico amónico, tartrato de sodio y potasio, sulfato de cobre pentahidratado, formaldehído, nitrato de plata, dicromato de potasio.
- **RELABY, S.A. de C.V. (México, D. F.):** Metanol.
- **Sigma Chemical Company (Saint Louis, Missouri, E.U.A.):** L-cisteína hidroclorada monohidratada, ácido ascórbico, fosfato de potasio monobásico, seroalbúmina bovina (fracción V), lauril sulfato de sodio, tris-HCl, tris-base, fosfatidilcolina, lisofosfatidilcolina, formalina, carbonato de sodio.

Material Biológico

Cepa *T. tenax* (ATCC-30207).

Esta cepa fue obtenida del ATCC (American Type Culture Collection), proveniente del espacio subgingival de una mujer adulta en el año de 1959. Esta cepa se tiene en el Laboratorio de Biología y Fisiología Celular del CIBIN, IMSS desde el año 2015.

Preparación del medio de cultivo TYI-S-33

Se mezclaron todos los componentes (descritos en la Tabla 1), y se disolvieron en 1 L de agua desionizada con agitación continua y a temperatura ambiente. Una vez disuelto medimos y se ajustamos a pH 7.0 con NaOH 10 N, utilizando un potenciómetro (HANNA Instruments®). Después se realizaron alícuotas de 5 ml en tubos de borosilicato de 13x100 mm con tapón de rosca, y se procedió a esterilizar por calor húmedo a 121°C/15 psi/15 min, se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se les realizó una prueba de esterilidad a 36.5 °C/24 h. Una vez realizada la prueba de esterilidad, los tubos se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

Tabla 1. Composición del medio TYI-S-33 (Diamond, 1978)

Componentes	Concentración (g/L)
Peptona de caseína	20.00
Extracto de levadura	10.00
NaCl	3.30
D-glucosa anhidra	10.00
L-cisteína	2.00
Ácido ascórbico	1.00
K ₂ HPO ₄	1.00
KH ₂ PO ₄	0.60
Citrato férrico amónico	0.028

Obtención del suero bovino

El suero bovino se obtuvo de sangre bovina colectada del rastro municipal en la ciudad de Monterrey, Nuevo León, México. La sangre se dejó coagular a 37 °C por 12 h y se separó el coágulo del suero por centrifugación a 2,000 rpm durante 15 min. Transcurrido este tiempo, el suero fue esterilizado utilizando papel Whatman No. 1, seguido de un sistema de filtros diferentes (desde 8 hasta 0.22 µm de tamaño de poro) (Millipore, Concord Road, Billerica, MA, EUA).

El suero estéril se descomplementó por calentamiento a 56 °C durante 30 min (agitando cada 5 min). Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se le adicionaron 25 ml de la mezcla vitamínica 107 de Diamond (JRH Biosciences, Lenexa, KS) por cada litro de suero. Se realizaron alícuotas de 100 ml, manteniendo la esterilidad durante el proceso, y, por último, se almacenaron en frascos ámbar con tapón de rosca de 125 mL a -20 °C hasta su uso.

Medio Completo (TYI-S-33)

Añadimos asépticamente el 10% de suero bovino estéril, descrito anteriormente, al medio basal TYI-S-33, justo antes de sembrar los trofozoítos.

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 6 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 3.90 g

Disolvimos el componente en 15 ml de agua bidestilada estéril, ajustamos a pH 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 6.50 g; K₂HPO₄ 2.80 g; KH₂PO₄ 0.50 g

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

Solución Salina de Hank 10X (SSB)

CaCl₂ 0.07 g; Glucosa 1.00 g; NaCl 7.00 g; KCl 0.40 g; MgSO₄ 0.20 g; Trizma Base 0.20 g.

Mezclamos y disolvimos todos los componentes en 950 ml de agua bidestilada. Ajustamos el pH a 7.4 con NAOH 10 N y/o HCl 1 N. Aforamos a 1 L y se ajustó la osmolaridad a 300 mOsm con NaCl. Posteriormente se esterilizó por filtración (0.22 µm) y se realizaron alícuotas de 100 ml en botellas con tapón de rosca. Finalmente se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

Soluciones para método de Lowry

Solución A

Pesamos 2 g de Carbonato de Sodio (Na_2CO_3) y disolvimos en 100 ml de NaOH 0.1 N. Preparamos al momento de usar.

Solución B₁

Pesamos 2 g de Tartrato de Sodio y Potasio y disolvimos en 100 ml de agua destilada. Guardamos a temperatura ambiente.

Solución B₂

Pesamos 1 g de Sulfato de Cobre y disolvimos en 100 ml de agua destilada. Guardamos a temperatura ambiente.

Solución C

Esta solución se preparó inmediatamente antes de usar:

Solución A: 49.0 ml

Solución B₁: 0.5 ml

Solución B₂: 0.5 ml

Solución E

Diluimos el Reactivo de Folin 1:1 con HCl 1 N. Preparamos antes de usar.

Solución estándar de proteínas

Pesamos 10 mg de sero-albúmina bovina y disolvimos en 10 ml de agua destilada. Obtuvimos una concentración final de 1 mg/ml.

$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O 10X.}$

$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 36.80 mg.

Disolvemos 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

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

Solución de cloroformo:metanol (2:1)

Cloroformo 300 ml; metanol 150 ml.

Mezclamos los componentes y almacenamos a temperatura ambiente.

Mezcla de ensayo 2X

Mezclamos los siguientes componentes: 200 μ l de Tris-HCl (10X); 200 μ l de CaCl₂ (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°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 °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.

MÉTODOS

Material biológico

Se utilizaron cultivos axénicos de *T. tenax*, cepa ATCC-30207, proveniente del ATCC (American Type Culture Collection) obtenida desde el año 2015.

Resiembra y cosecha

El medio inoculado con *T. tenax* se mantuvo en incubación a $36.5 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ en medio TYI-S-33. Antes de cada resiembra se observaron los cultivos en un microscopio invertido en el que se comprobó un buen aspecto morfológico y la movilidad de los trofozoitos de *T. tenax*. Posteriormente se sumergieron los tubos con el cultivo de *T. tenax* en agua-hielo durante 10 min; se agitaron suavemente y se determinó la concentración celular con un hematocitómetro.

Mantuvimos a los trofozoítos en el medio TYI-S-33, resembrando éstos, en cada medio a 3 tubos a la vez; del mejor se inoculó 1×10^5 trofozoítos/ml a cada uno de los tres nuevos tubos con medio TYI-S-33 fresco. Conservamos los de la penúltima resiembra hasta comprobar el crecimiento de los trofozoítos y la ausencia de contaminación en los cultivos recién sembrados.

Detección de parámetros de crecimiento de trofozoítos de *T. tenax* cultivados en TYI-S-33

Para determinar los parámetros de crecimiento realizamos curvas de crecimiento, donde resembramos 21 tubos conteniendo 5 ml de medio TYI-S-33, 0.5 ml de suero bovino, 1×10^5 trofozoítos/ml y 125 μl de vitaminas 107 de Diamond. Los tubos los incubamos a $36.5 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ y cada 24 h tomamos 3 tubos de cada grupo, los colocamos en agua-hielo por 10 min y con un hematocitómetro determinamos la concentración de trofozoítos por ml, esto lo hicimos por 7 días.

Los datos obtenidos los procesamos por regresión lineal, para obtener los parámetros de crecimiento como: tiempo de duplicación, tiempo de generación y velocidad de crecimiento. La regresión lineal se realizó a partir de la distribución del número de trofozoítos (variable dependiente) y con respecto al número de días (variable independiente) entre 0 a 7 días, donde obtuvimos 3 fases de la curva de crecimiento (fase logarítmica, fase estacionaria y fase de muerte). De la fase logarítmica en proporción lineal se aplicó el análisis estadístico de regresión lineal para determinar los parámetros de crecimiento antes mencionados.

Cultivo masivo de *T. tenax* en medio TYI-S-33

En Spinners con capacidad de 1 L que contenían 672 mL de medio TYI-S-33 se inocularon 5×10^5 trofozoítos/ml a partir de tubos de resiembra. Los Spinners se agitaron suavemente durante 5 min y se incubaron a 36.5 °C durante 72 h. Una vez pasado este tiempo se colocaron en agua-hielo durante 30 min y en agitación suave. Se vació el total del medio con células a botes con tapa de rosca de 1 L para centrífuga refrigerada (Centrifuge Bottles, Polypropylene, Nalgene) y se centrifugó a 4 °C durante 20 min a 4,000 x g. Se eliminó el medio sobrenadante con ayuda de un extractor al vacío y se dejó un volumen mínimo en el cual se resuspendieron los sedimentos celulares. Se pasó esta suspensión a tubos cónicos de 50 mL que se centrifugaron a 4 °C, a 4,000 x g durante 20 min. Realizamos 2 lavados con un volumen de amortiguador (Tris-HCl pH 7.0) y eliminamos el medio sobrenadante con extracción al vacío.

Obtención del Extracto total (ET), sobrenadante a 30,000 g (S30) y precipitado a 30,000 g (P30)

Obtuvimos las fracciones subcelulares, de la siguiente forma: resuspendimos los trofozoítos provenientes de cada Spinner con medio de cultivo y las lavamos con dos volúmenes de amortiguador SSB, agitamos suavemente con pipeta Pasteur y homogeneizamos con 100 golpes de un homogeneizador tipo Elvehjem-Potter de borosilicato con émbolo de teflón (Bellco, Glass Inc., N. Y., EUA) activado con un motor eléctrico a 1000 rpm. Después de este tratamiento centrifugamos el extracto total

a 135 x g por 15 min en donde obtuvimos un sedimento, la fracción nuclear y el sobrenadante correspondiente, a este último lo centrifugamos a 30,000 x g por 30 min. El sedimento correspondió a la fracción P30, la cual re-suspendimos con un volumen de amortiguador de SSB y se conservó a -70°C hasta su uso. El sobrenadante correspondió a la fracción S30, la cual fue conservada a -70°C hasta su uso. Durante este proceso, manipulamos todas las muestras a 4 °C.

En la Figura 4 esquematizamos el método de sedimentación fraccionada que utilizamos para obtener los extractos subcelulares de los trofozoítos de *T. tenax*.

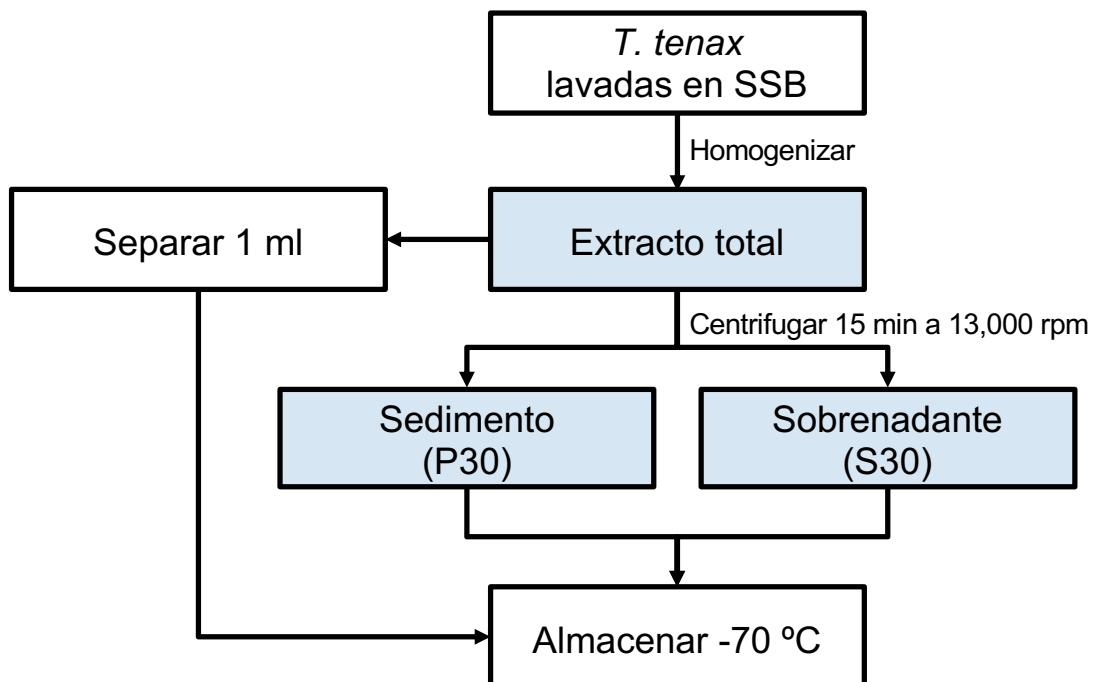


Figura 4. Diagrama de obtención de las subfracciones celulares de *T. tenax*.

Cuantificación de proteínas

Determinamos la concentración de proteínas en la fracción ET, S30 y P30 (muestras particuladas) mediante el método de Lowry y cols. (1951). 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%, diluido 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 Folin-Ciocalteau 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. Calculamos la masa de proteínas de las muestras provenientes de *T. tenax* con la ecuación que determinamos al analizar, por regresión lineal, la relación de la DO 750 con respecto a cantidades variables de seroalbúmina bovina. Obtuvimos esta ecuación por cada una de las determinaciones realizadas.

Método de Lowry

Realizamos una curva de calibración, para la cual añadimos 5, 10, 20, 40, 60 y 80 μ l de la solución estándar de proteínas y aforamos con agua bidestilada a 200 μ l. Añadimos a cada muestra 1 ml de reactivo C, el cual se menciona en la sección de materiales, y mezclamos bien. Se dejó incubando por 10 min a temperatura ambiente. Despues añadimos 0.1 ml de reactivo de Folin-Cicalteau:HCl 1N (1:1) (solución E) y mezclamos. Se dejó incubar a temperatura ambiente por 30 minutos y, finalmente, se procedió a leer a 750 nm en un espectrofotómetro.

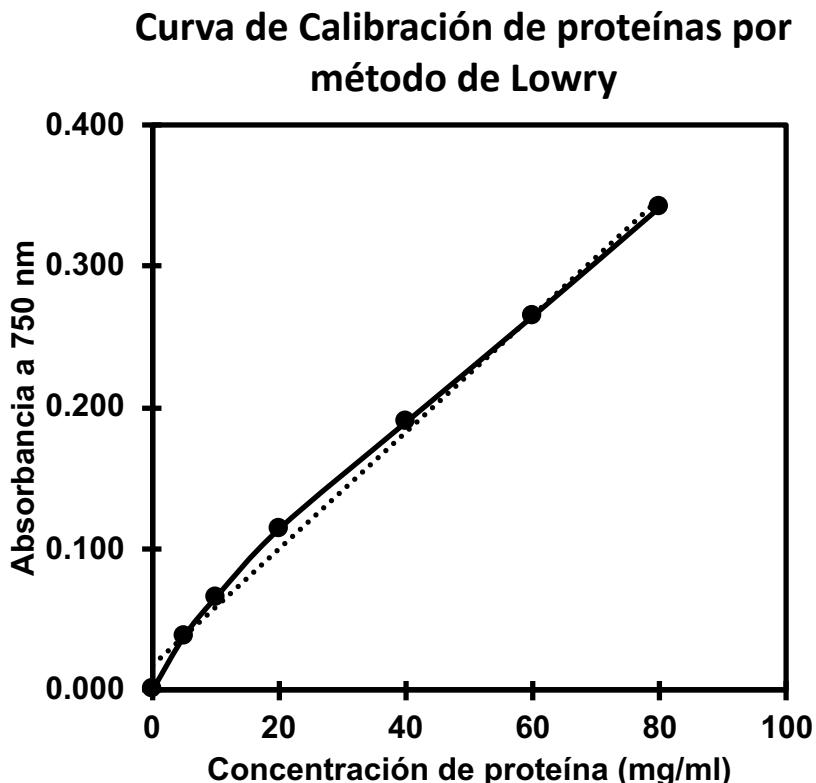


Figura 5. Curva de calibración de proteínas por método de Lowry. El coeficiente de correlación de la recta (r^2) = 0.993; con una $p < 0.001$.

Cromatografía en capa fina

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

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 1 cm del borde inferior de las cromatoplacas 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 cromatoplacas dentro de las cámaras presaturadas; cerramos herméticamente las cámaras, dejamos ascender la fase líquida sobre las cromatoplacas hasta 1 cm antes del borde superior y evaporamos los disolventes de las placas con aire caliente por 15 min.

Revelación e identificación de lípidos

Revelamos las manchas de fosfatidilcolina y sus lisoderivados colocando las cromatoplacas 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.

Método de ensayo para cuantificar y determinar actividad de fosfolipasas tipo A

El método que se usa con mayor frecuencia para la cuantificación de la actividad fosfolipasa es 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. Se cuantificó la radioactividad en las manchas lipídicas correspondientes de los productos de hidrólisis, la cual fue proporcional a la actividad fosfolipasa expresada como nanomoles de fosfolípido hidrolizado por minuto (Vargas-Villarreal *et al.*, 1995). 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 (Vargas-Villarreal *et al.*, 1995).

Método para determinar la actividad fosfolipasa del tipo A.

Determinamos la actividad fosfolipasa del tipo A₂, basándonos en el método descrito por Vargas-Villarreal y cols. (1995), que consistió en: determinar los productos de hidrólisis [ácidos grasos libres (AGL) y lisofosfatidilcolina (LFC)] del 2-palmitoil-[2-palmitoil ¹⁴C]-fosfatidilcolina ([¹⁴C]-FC). Este sustrato está marcado en el carbono 1 del ácido palmítico esterificado en la posición 2 del glicerol, considerando

que sí la radioactividad se localiza en las manchas cromatográficas correspondientes a [¹⁴C]-LFC, pero no en las de [¹⁴C]-AGL, la enzima sería del tipo A₁. En el caso contrario estas corresponderían a una fosfolipasa del tipo A₂.

Los lípidos marcados fueron diluidos con fosfatidilcolina (FC) de yema de huevo a una concentración específica de 1800 μ Ci/mol y solubilizadas en presencia de 0.4% de Tritón X 100. Estas mezclas fueron diluidas 1:1 con la fracción ET, S30 o P30. El ensayo final (0.02 ml) contuvo: 100 mM de Tris-HCL, pH 8.0, 0.138 mM de FC, 0.2% de Tritón X 100, 1 mM de calcio y la muestra. Después de tiempos variables de incubación o concentraciones diferentes de proteínas, la reacción fue parada con 25 μ l de una mezcla de FC (0.75 mg/ml), AGL (1 mg/ml), 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 (Vargas-Villarreal *et al.*, 1995). Aplicamos 25 μ l en placas cromatográficas de sílica gel; separamos los lípidos utilizando un disolvente para lípidos no polares como son el Cloroformo:Metanol:Ácido acético:Agua (170:40:16:8). Después colocamos las placas en una cámara saturada con vapores de yodo, con lo cual las manchas lipídicas se revelaron como puntos amarillos o cafés sobre el fondo blanco (Skipsky y Barclay, 1969). 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, modelo Tri-Carb 1600 TR Packard A camberra Company) (Vargas-Villarreal *et al.*, 1995).

Análisis estadístico

Analizamos estadísticamente, los resultados obtenidos en las secciones anteriores, utilizando pruebas paramétricas como: Regresión lineal, ANCOVA ($p < 0.05$) y T de Student (para comparar medias) ($p < 0.05$). De las pruebas no paramétricas usamos la Prueba exacta de Fisher's. (Dawson y Trapp, 2005).

RESULTADOS

Desde hace algunos años se ha propuesto que *T. tenax* expresa actividad de proteasas tipo cisteína proteasas, las cuales hidrolizan colágeno tipo I, II, IV y V principalmente (Bozner y Demes, 1991). Además, se ha demostrado que *T. tenax*, presenta actividad hemolítica con dos formas de actividad lítica, una termolábil y la otra termoestable, esta última podría ser una actividad no dependiente de cisteína proteasas, ya que inhibidores de este tipo de proteasas no inhiben dicha actividad (Nagao *et. al.*, 2000).

Con estos antecedentes *T. tenax*, se confirma que no es un protozoario exclusivo de las áreas bucales de los hombres y mujeres infectadas, por lo que esta actividad hemolítica termoestable se ha presentado en otros protozoarios como en *Entamoeba histolytica* (Said-Fernández y López-Revilla, 1986) y *T. vaginalis* (Vargas-Villarreal *et al.*, 1995). Esta actividad se descubrió después que crea una fosfolipasa la responsable de dicha actividad (Vargas-Villarreal *et al.*, 1995).

En todos los bancos de datos de artículos científicos no se ha demostrado actividad de fosfolipasa en este protozoario, por lo que nuestro grupo está muy interesado en cuantificar y caracterizar las actividades de fosfolipasas tipo A₁ Y A₂ en este protozoario.

Por lo anterior decidimos explorar la posibilidad de identificar y caracterizar parcialmente la actividad de fosfolipasas presentes en extractos totales y subfracciones celulares de *T. tenax*.

Para lograr la caracterización de la actividad de fosfolipasa, donde el primer paso fue determinar los parámetros de crecimiento de trofozoítos de *T. tenax* cultivadas en TYI-S-33. Para esto, realizamos los experimentos necesarios para obtener los parámetros de crecimiento de *T. tenax* partiendo de una concentración de 100,000 trofozoítos/ml en medio basal TYI-S-33 adicionado con suero bovino al 10%; donde se obtuvieron el tiempo de generación y el tiempo de duplicación.

Cultivos de *T. tenax*

Resiembra y cosecha

La cepa de *T. tenax* ATCC-30207 se mantuvo a $36.5 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ en una incubadora (Water Jacketed CO₂ Incubator, Series 8000 WJ, Thermo Fisher Scientific, EUA). Antes de cada resiembra se revisaron los tubos en un microscopio invertido (Biovert, Reichert, Austria) para comprobar el buen aspecto morfológico y la movilidad de los trofozoítos. Despues, los tubos se sumergieron en agua-hielo por 10 min, se agitaron suavemente y se determinó la concentración de trofozoítos, al diluir 0.1 ml del medio con 0.9 ml de formalina al 10% (Sigma, Saint Luis, Missouri, EUA) y se contaron los trofozoítos en cámara de Neubauer (American Optical Scientific Instruments Div.). A partir de los tubos de resiembra se inoculó un número conocido de *T. tenax* en tubos que contenían medio TYI-S-33 complementado con suero bovino al 10%.

Cultivos masivos

En Spinners con capacidad de 1 L que contenían 672 ml de medio TYI-S-33 se inocularon 5×10^5 trofozoítos/ml a partir de tubos de resiembra. Los Spinners se agitaron suavemente durante 5 min y se incubaron a 36.5°C durante 72 h, se colocaron en agua-hielo durante 30 min y se mantuvieron con agitación suave. Se vació el total del medio con células a botes con tapa de rosca de 1 L para centrífuga refrigerada (Centrifuge Bottles, Polypropylene. Nalgene) y se centrifugó a 4°C durante 20 min a 4,000 x g. Se eliminó el medio sobrenadante con ayuda de un extractor al vacío y se dejó un volumen mínimo en el cual se re-suspendieron los sedimentos celulares. Se pasó esta suspensión a tubos cónicos de 50 ml que se centrifugaron a 4°C , a 4,000 x g durante 20 min. Realizamos 2 lavados con un volumen de amortiguador (Tris-HCl pH 7.0) y eliminamos el medio sobrenadante con extracción al vacío.

Curva de crecimiento

Se realizaron tres experimentos independientes por triplicado, incubándose a 36.5 \pm 5 °C durante 120 h, determinando el número de trofozoítos cada 24 h, evaluándose sus parámetros de crecimiento en el medio.

Se determinó el tiempo de generación mediante la siguiente ecuación:

$$G = \frac{t}{3.3} \log \frac{b}{B}$$

G = Tiempo de generación

t = Intervalo de tiempo de la fase exponencial

B = Número de organismos al comienzo del intervalo de tiempo

b = Número de organismos al final del intervalo de tiempo

Para el parámetro del tiempo de duplicación se determinó utilizando la siguiente ecuación:

$$Td = 0.693 G$$

Los tiempos de generación y duplicación obtenidos fueron de 12 h 37 min y 8 h 44 min respectivamente. Se observa que la fase exponencial de *T. tenax* se extiende hasta las 96 h en medio TYI-S-33 adicionado con suero bovino (Figura 6).

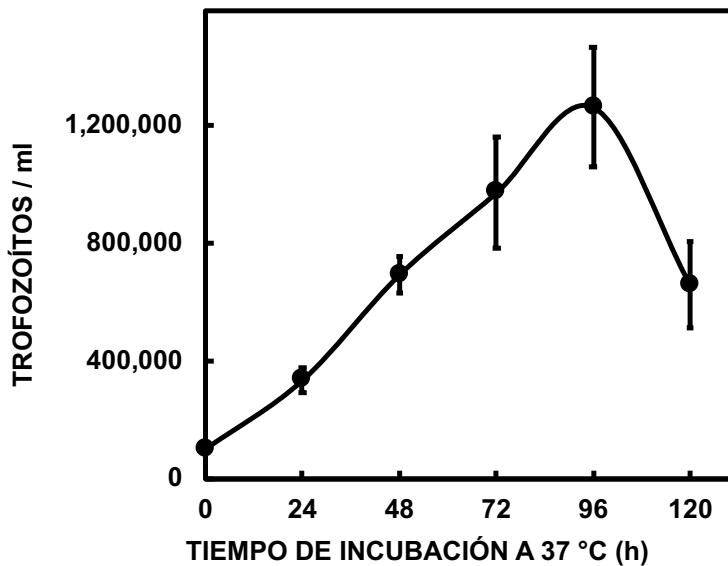


Figura 6. Relación temporal del crecimiento de *T. tenax*. Inoculamos por triplicado 100,000 trofozoítos por ml en tubos de 5.5 ml de TYI-S-33. Después de diferentes tiempos de incubación a 36.5 °C, determinamos la densidad de los cultivos con un hemacitómetro. Cada punto corresponde a tres determinaciones independientes. El coeficiente de correlación de la recta (r^2) = 0.997; con una $p < 0.001$.

Obtención del Extracto total (ET), sobrenadante a 30,000 g (S30) y precipitado (P30) a 30,000 g.

Realizamos cultivos masivos de *T. tenax* en Spinners de 726 ml de medio de cultivo TYI-S-33 adicionado con suero bovino, los cuales incubamos hasta 72 h y una vez pasado este tiempo, separamos el medio de cultivo usado y las células de *T. tenax* para obtener el extracto total (ET), así como las subfracciones P30 y S30.

Cuantificación de proteínas

Una vez obtenidas las fracciones ET, P30 y S30, procedimos a realizar la cuantificación de las proteínas presentes por el método de Lowry, previamente descrito, comparando los resultados con una curva de calibración (Figura 7), en la que utilizamos distintas concentraciones de seroalbúmina bovina. Las concentraciones obtenidas para

dichas fracciones fueron de 15.40 mg/ml para el extracto total, 18.33 mg/ml para la subfracción P30 y 14.92 mg/ml para la subfracción S30.

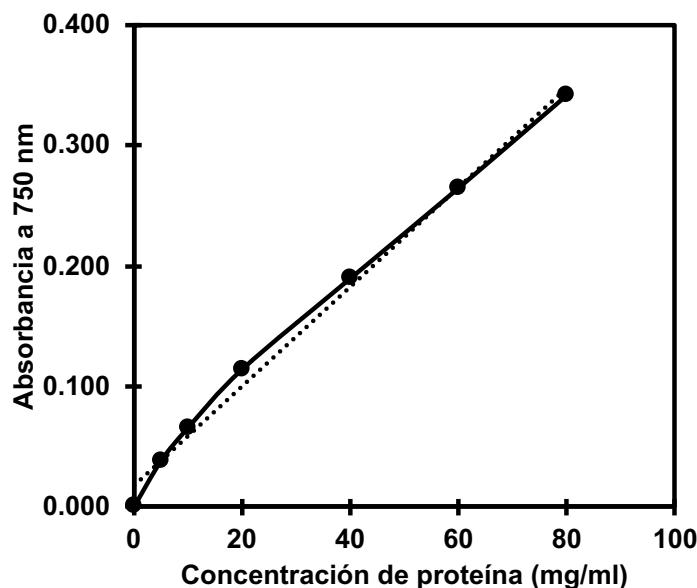


Figura 7. Curva de calibración de proteínas por método de Lowry. El coeficiente de correlación de la recta (r^2) = 0.993; con una $p < 0.001$.

Determinación de los productos de hidrólisis (AGL, LFC y FC)

Una vez obtenidas y cuantificado las proteínas de las subfracciones P30 y S30, junto con el extracto total, se tomaron 10 μ l de la mezcla de reacción (Fosfatidilcolina-[¹⁴C], fosfatidilcolina, tritón X-100, amortiguador pH 8.0, cloruro de calcio y agua), previamente elaborada, y se mezclaron con 10 μ l de muestra (ET, P30 o S30), se dejaron incubar por determinado tiempo, según el ensayo a hacer (curva temporal, curva dosis-respuesta, pH óptimo de actividad o dependencia de calcio), para después detener la reacción con 25 ml de TCA-butanol. Finalmente se realizó una cromatografía en capa fina, utilizando solventes para lípidos polares, en donde se colocaron 25 μ l del producto obtenido anteriormente en la placa cromatográfica. Se revelaron las marcas

con ayuda de una cámara saturada con vapores de yodo, en donde los productos de hidrólisis (AGL, LFC, y FC) se observaron de un color entre café y amarillo.

Determinación de la actividad fosfolipasa del tipo A

Determinamos la actividad fosfolipasa del tipo A₂, basándonos en el método descrito por Vargas-Villarreal y cols. (Vargas-Villarreal *et al.*, 1995), que consistió en determinar los productos de hidrólisis AGL y LFC del 2-palmitoil-[2-palmitoil ¹⁴C]-fosfatidilcolina ([¹⁴C]-FC).

Las manchas obtenidas de la cromatografía en capa fina fueron raspadas y colocadas en un vial de borosilicato con capacidad de 20 ml, a los cuales se agregaron 5 ml de mezcla para centelleo líquido y se cuantificaron los productos de hidrólisis con ayuda de un contador de centelleo líquido.

Curva temporal de la actividad fosfolipasa del tipo A

Determinamos la actividad fosfolipasa del extracto total, así como de las subfracciones P30 y S30 a tiempos variables de incubación (0, 0.5, 1, 1.5 y 2 h) a 37°C en una mezcla de reacción, detallada anteriormente. Después de la incubación separamos los productos de hidrólisis mediante cromatografía en capa fina y las cuantificamos con un contador de centelleo líquido. Los resultados muestran que la PLA₁ está presente en mayor proporción a la PLA₂ en el extracto total, como en la subfracción S30, mientras que en la P30 es lo contrario a esto. Además, se puede observar que a los 120 min hay un descenso en la actividad fosfolipasa, tanto A₁ como A₂. Por último, se puede observar que a los 90 min es cuando la actividad fosfolipasa está en sus puntos más altos para las subfracciones P30 y S30, pero, para el ET la actividad fosfolipasa alcanza sus puntos más altos a los 120 min (Figuras 8, 9 y 10).

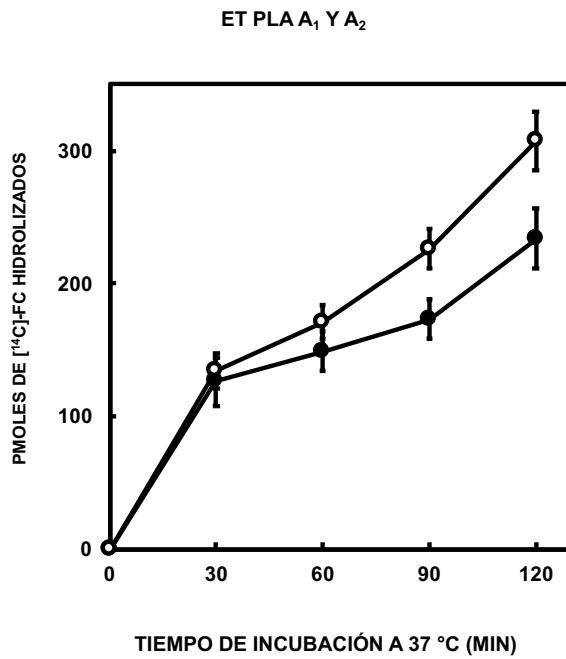


Figura 8. Relación temporal de la actividad fosfolipasa (PLA) en el extracto total (ET). Los símbolos corresponden a las fosfolipasas A₁ (○) y A₂ (●).

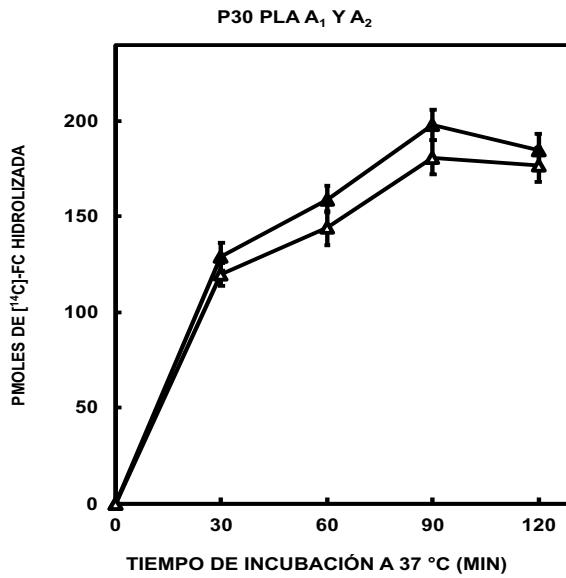


Figura 9. Relación temporal de la actividad fosfolipasa (PLA) en la subfracción P30. Los símbolos corresponden a las fosfolipasas A₁ (△) y A₂ (▲).

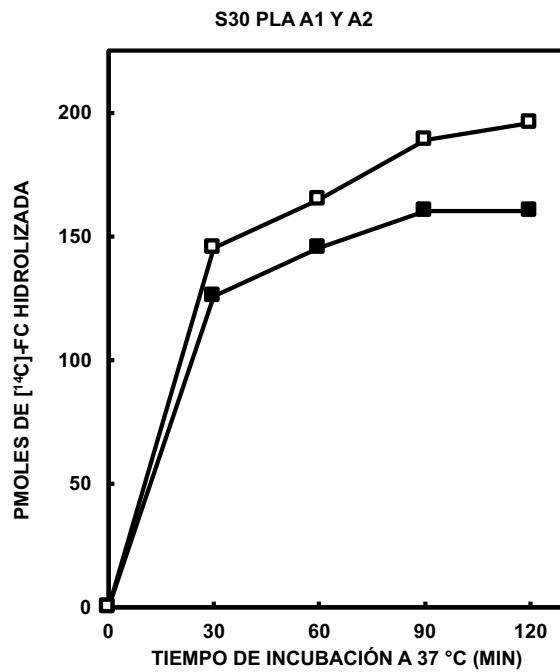


Figura 10. Relación temporal de la actividad fosfolipasa (PLA) en la subfracción S30. Los símbolos corresponden a las fosfolipasas A₁ (□) y A₂ (■).

Curva dosis-respuesta de la actividad fosfolipasa del tipo A

Proseguimos a determinar la actividad fosfolipasa en ambas subfracciones (P30 y S30), junto con el extracto total (ET) a distintas concentraciones para evaluar la respuesta de las PLA a 0, 50, 100, 150 y 200 µg/ml de la mezcla de ensayo anterior. Incubamos durante 45 min a 37 °C cantidades variables de PLA de una mezcla de ensayo para fosfolipasa, ajustada a un pH 8.0. Analizamos mediante cromatografía en capa fina el contenido en cada muestra de [¹⁴C]LFC, [¹⁴C]FC y [¹⁴C]AGL y las cuantificamos con ayuda de un contador de centelleo líquido. Nuestros resultados muestran un aumento de la PLA₁ en ambas subfracciones (P30 y S30) y en el ET. La PLA₂ aumenta conforme aumenta la concentración, pero en la subfracción P30 se ve una disminución de la actividad fosfolipasa a 200 µg/ml de proteína, también se puede apreciar que en el extracto total alcanza una estabilidad a partir de 150 µg/ml de proteína, lo cual no ocurre con la PLA₁. En las dos subfracciones y en el extracto se observa la máxima actividad

fosfolipasa a la concentración de 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de proteína, exceptuando la PLA₂ de la subfracción P30 (Figuras 11, 12 y 13).

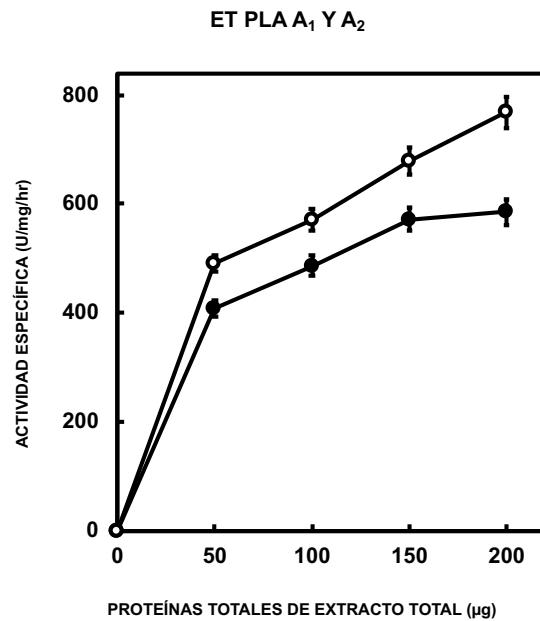


Figura 11. Curva dosis-respuesta de la actividad fosfolipasa (PLA) en el extracto total (ET). Los símbolos corresponden a las fosfolipasas A₁ (○) y A₂ (●).

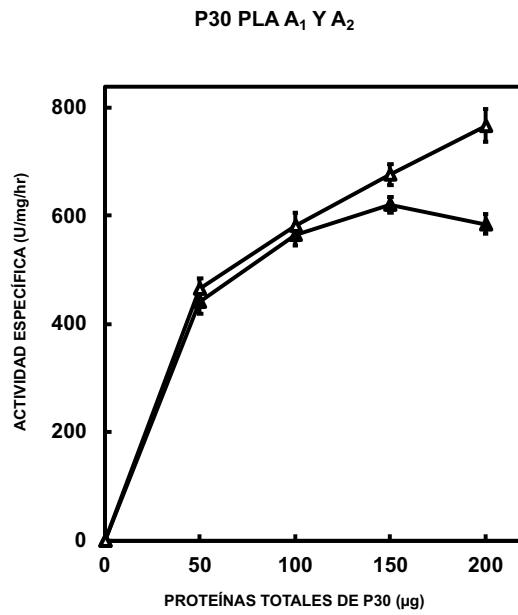


Figura 12. Curva dosis-respuesta de la actividad fosfolipasa (PLA) en la subfracción P30. Los símbolos corresponden a las fosfolipasas A₁ (\triangle) y A₂ (\blacktriangle).

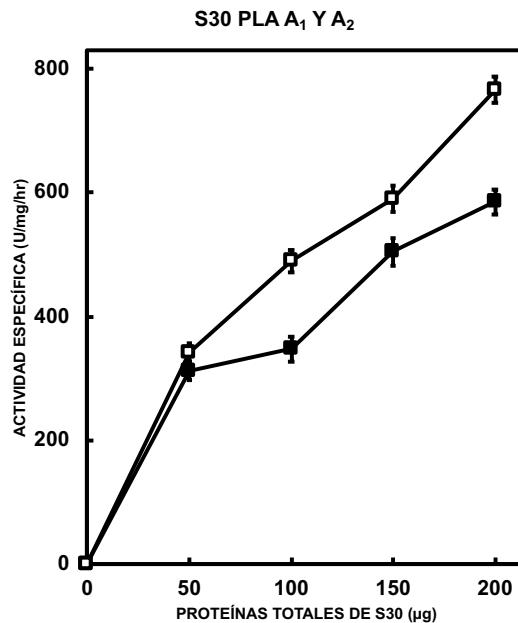


Figura 13. Curva dosis-respuesta de la actividad fosfolipasa (PLA) en la subfracción S30. Los símbolos corresponden a las fosfolipasas A₁ (\square) y A₂ (\blacksquare).

Determinación del pH óptimo de actividad

Evaluamos y determinamos el pH óptimo de la actividad fosfolipasa en ambas subfracciones (P30 y S30) y el extracto total (ET) a distintos valores de pH (4, 6, 8 y 10). Dejamos incubar por 45 min a 37 °C, 200 µg/ml de PLA de una mezcla de ensayo para fosfolipasa, a distintos pH (4, 6, 8 y 10). Analizamos mediante cromatografía en capa fina el contenido en cada muestra de [¹⁴C]LFC, [¹⁴C]FC y [¹⁴C]AGL y las cuantificamos con ayuda de un contador de centelleo líquido. Observamos que a pH 8 se encuentra la mayor actividad fosfolipasa, tanto para la PLA₁ como para la PLA₂ (Figuras 14 y 15).

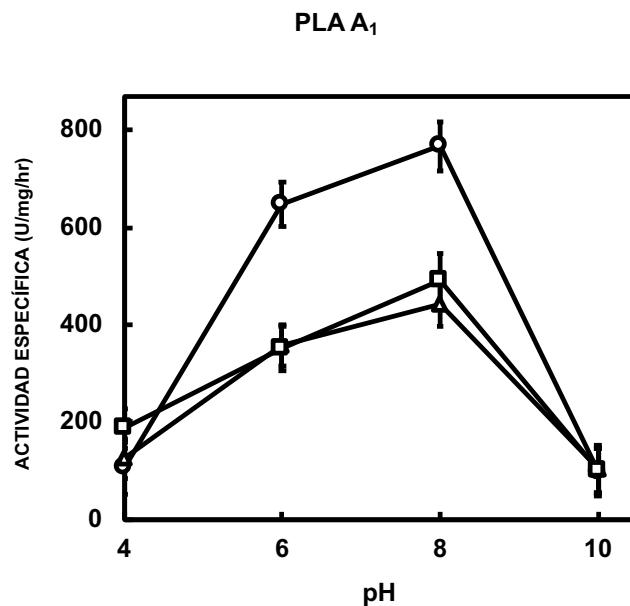


Figura 14. Evaluación del pH óptimo de la actividad fosfolipasa tipo A₁ (PLA₁). Los símbolos corresponden al extracto total (ET) (○), y las subfracciones P30 (△) y S30 (□).

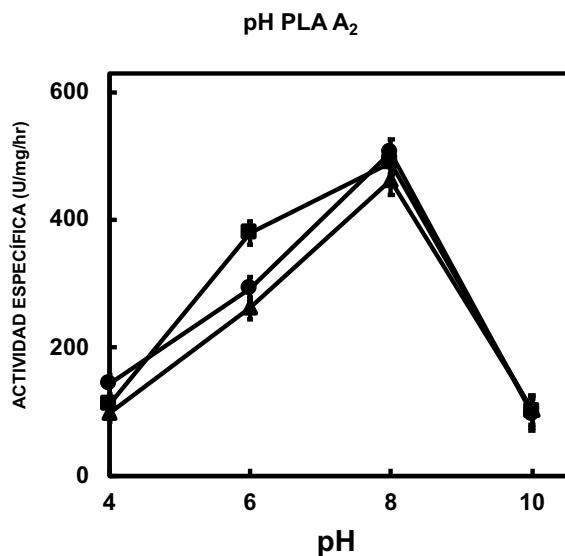


Figura 15. Evaluación del pH óptimo de la actividad fosfolipasa tipo A₂ (PLA₂). Los símbolos corresponden al extracto total (ET) (●), y las subfracciones P30 (▲) y S30 (■).

Determinación de la dependencia de Calcio

Por último, determinamos la dependencia de calcio de la actividad fosfolipasa en ambas subfracciones (P30 y S30) y el extracto total (ET) a pH 8. Dejamos incubar por 45 min a 37 °C, 200 µg/ml de PLA de una mezcla de ensayo para fosfolipasa con distintas concentraciones de Calcio (1 y 2 mM). Analizamos mediante cromatografía en capa fina el contenido en cada muestra de [¹⁴C]LFC, [¹⁴C]FC y [¹⁴C]AGL y las cuantificamos con ayuda de un contador de centelleo líquido. Notamos mayor actividad para la subfracción S30 al adicionar 1mM de Calcio, para ambos tipos de PLA's, pero al adicionar 2mM detectamos una mayor actividad fosfolipasa en el ET para ambas PLA's. Por otra parte, notamos que la actividad fosfolipasa se mantiene constante al adicionar, tanto 1 como 2 mM de Calcio, para la subfracción P30 (Figuras 16 y 17).

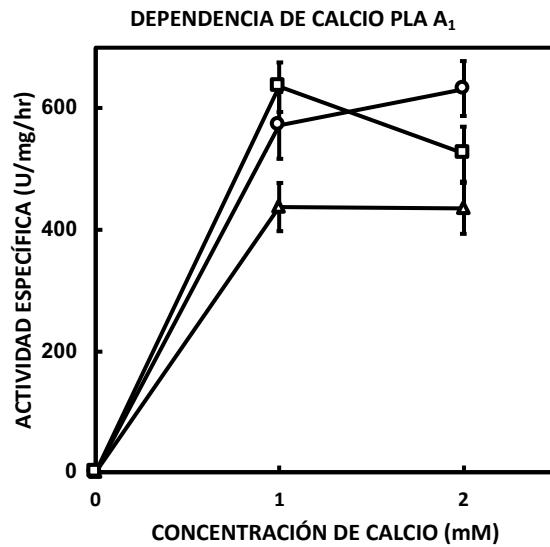


Figura 16. Evaluación de la dependencia de Calcio de la fosfolipasa tipo A₁ (PLA₁). Los símbolos corresponden al extracto total (ET) (○), y las subfracciones P30 (△) y S30 (□).

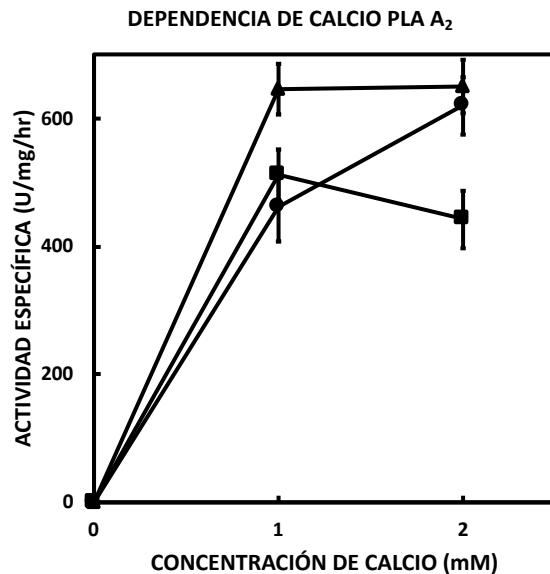


Figura 17. Evaluación del pH óptimo de la actividad fosfolipasa tipo A₂ (PLA₂). Los símbolos corresponden al extracto total (ET) (●), y las subfracciones P30 (▲) y S30 (■).

DISCUSIÓN

Si bien el papel patológico de algunas cepas bacterianas específicas durante las enfermedades periodontales está bien documentado, el impacto de los parásitos en la fisiopatología del periodonto aún está en debate (Marty *et al.*, 2017) tal es el caso de la patogénesis y virulencia de *T. tenax*, las cuales no están completamente entendidas, aunque ya se han identificado posibles moléculas de este parásito que pueden causar daño a las células y tejidos del hospedero (Schwebke y Burgess, 2004). Hasta ahora no se ha encontrado evidencia científica sobre la fisiopatología de la virulencia de *T. tenax* con respecto a las enfermedades periodontales en animales (Marty *et al.*, 2017).

En nuestro grupo estamos interesados en estudiar los posibles factores involucrados en las actividades de fosfolipasas en este parásito, ya que no existe evidencia científica sobre estas actividades. Por otro lado, desde hace algunos años se ha propuesto algunos factores de virulencia en *T. tenax*, con presencia de actividades biológicas asociadas a membrana o liberadas al medio de cultivo que podrían estar involucradas en los mecanismos de adhesión o de citólisis que se han descrito ya en este parásito, tales son: Proteínas similares a la fibronectina, responsables de la adhesión de los tejidos (Bozner y Demes, 1991), también se ha encontrado actividad de proteasas tipo cisteína proteasas, las cuales hidrolizan colágeno tipo I, III y IV (Bozner y Demes, 1991), dos tipos de hemolisinas, una similar a una proteína, la otra similar a los lípidos (Nagao *et al.*, 2000) y actividad de proteinasas de tipo catépsina-B (Yamamoto *et. al.*, 2000). Recientemente Ribeiro *et al.* analizaron la relación *in vitro* de *T. tenax* con células de mamíferos (Ribeiro *et al.*, 2015) en las que confirmaron la capacidad de los flagelos para adherirse a las células epiteliales periodontales, en las que después de solo 6 h, *T. tenax* en el co-cultivo alteró algunas de las células en el tejido, induciendo daño a la membrana y apoptosis de la célula.

Las fosfolipasas extracelulares se han implicado como factores de patogenicidad para varios organismos como *Clostridium perfringens*, *Rickettsia* spp., *Toxoplasma gondii*, *Entamoeba histolytica*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* (Ibrahim *et al.*, 1995), aunque también se han visto fosfolipasas del tipo A implicadas

en trofozoítos de *T. vaginalis* (Vargas-Villarreal *et al.*, 2005). En esta última encontramos que la fracción proteica de S30 y P30 provenientes de extractos de trofozoítos cultivados de *T. vaginalis* (Vargas-Villarreal *et al.*, 2005), presentan actividad hemolítica directa dañando la membrana de los eritrocitos a pH 6.0 y 8.0 en presencia de 1 mM de Ca²⁺ (Vargas-Villarreal *et al.*, 2003). Después observamos que esta actividad fue inhibida con un inhibidor específico de fosfolipasas el inhibidor de Rosenthal (Vargas-Villarreal *et al.*, 2003), lo cual confirmaba que en dicha actividad hemolítica estaban involucradas las fosfolipasas como factores de virulencia, lo cual sugiere que tanto la actividad hemolítica como fosfolipasa tienen el mismo mecanismo de acción.

En este trabajo nosotros hemos caracterizado parcialmente, la principal actividad fosfolipasa de los trofozoítos de *T. tenax*, dada su presunta importancia como factor de virulencia de este parásito, por tal motivo usamos un método de detección con mucha precisión y reproducibilidad (el radioensayo). Este consiste para cuantificar la actividad de fosfolipasa tipo A₁ y A₂ en extractos subcelulares de *T. tenax*. La cual consiste en usar: i) L-1-2-dipalmitoil-[2-palmitoil-¹⁴C]-fosfatidilcolina, para determinar la actividad de fosfolipasas A₁ y A₂ ya que este sustrato esta marcado en el carbón 1 del ácido palmítico esterificado en la posición 2 del glicerol, considerando que si la radioactividad se encontraba en la mancha cromatográfica correspondiente a Lisofosfatidilcolina (LFC), pero no a la mancha de ácidos grasos libres (AGL) la enzima será del tipo A₁. En caso contrario, la actividad correspondería a una actividad de fosfolipasa tipo A₂. Los lípidos marcados fueron diluidos con fosfatidilcolina fría (sin marcar) a una concentración específica de 1800 µCi/mole y solubilizadas en presencia de 0.4% de Tritón X 100. Esta mezcla fue diluida 1:1 con las muestras de ensayo (extracto total, S30 o P30) de *T. tenax*. El ensayo final (0.02 mL) contenía 100 mM de Tris-HCl, pH 8.0, usado como amortiguador, 0.138 mM de fosfatidilcolina fría, 0.2 % de tritón X 100 y la muestra.

Este método de radioensayo presenta varias ventajas con respecto a otros métodos como: a) realizamos los ensayos en menor tiempo con respecto a los métodos

tradicionales sin usar radiactividad, b) como se requiere cantidades pequeñas de material biológico y reactivos podemos usarlos para futuras determinaciones en este tipo de actividades.

Elegimos a la cepa ATCC-30207 de *T. tenax*, la cual obtuvimos del ATCC (American Type Culture Collection) para caracterizar las fosfolipasas A de este protozoario, porque a la fecha no hay reportes científicos en ninguna de las plataformas de búsqueda de la presencia e identificación de este tipo de enzimas en los trofozoítos de *T. tenax*.

Nuestro primer paso consistió en tener los parámetros de crecimiento de este protozoario, para definir tanto los días de incubación como el inóculo para obtener cultivos crecidos en la fase exponencial y por ende en las mejores condiciones fisiológicas. Para ello, obtuvimos la ecuación lineal de crecimiento los trofozoítos de *T. tenax*.

Los tiempos de generación y duplicación obtenidos fueron de 12 h 37 min y 8 h 44 min respectivamente, se observa que la fase exponencial de *T. tenax* se extiende hasta las 96 h en medio TYI-S-33 adicionado con suero bovino (Figura 6).

Una vez obtenidos los mejores parámetros de crecimiento de *T. tenax* en primer instancia, lo que hicimos, bajo nuestra experiencia en detección de este tipo de actividades, usamos varios criterios como: a) obtener los extractos totales de los trofozoítos de *T. tenax*, mediante homogenización mecánica (tipo Elvejem Poter), donde preservamos al máximo la compartimentalización subcelular ya que otros métodos como la sonicación o ciclos repetidos de congelación y descongelación pueden dañar irreversiblemente a las actividades enzimáticas (Vargas-Villarreal et al., 1995), y b) un esfuerzo extra se presentó cuando usamos la fracción P30, ya que esta es asociada a membranas plasmáticas (Said-Fernández y López-Revilla, 1986), lo cual implicó el uso de métodos de solubilización, usando la presencia de detergentes como el Tritón X 100, el cual no afecta a las actividades de tipo fosfolipasa A (Van Den Bosch, 1980; Vargas-Villarreal et al., 1995).

En el estudio de la posible participación de la presencia de las fosfolipasas A en *T. tenax* por ser la cepa que hay en la ATCC, siendo que *Trichomonas* spp. da un alto rendimiento en los cultivos, asegurando la cantidad necesaria de masa y proteína para caracterizar parcialmente actividades, que en nuestro caso fue las actividades de fosfolipasas.

En el estudio de la posible participación de las fosfolipasas en la virulencia de *T. tenax*, usamos el método de radioensayo ya que este método ya está adaptado y probado, para determinar y cuantificar actividad de fosfolipasa del tipo A, pudimos demostrar en primera instancia que el extracto total de proteínas obtenido por homogenización de los trofozoítos de *T. tenax*, cuando observamos que la radioactividad en las manchas correspondientes a $[^{14}\text{C}]\text{-LFC}$ y $[^{14}\text{C}]\text{-AGL}$ se incrementó con respecto al tiempo de incubación (figura 8), lo que nos confirmaba que el extracto total de *T. tenax*, presenta actividad de fosfolipasas del tipo A₁ y A₂.

Durante la caracterización de la actividad fosfolipasa del extracto total de *T. tenax* este extracto total, lo fraccionamos usando centrifugación a alta velocidad (30,000 g) con el propósito de obtener la parte soluble (S30) y la parte no soluble (P30), conteniendo membranas celulares y dendritos celulares no solubles (proteínas no solubles, pegadas a membranas principalmente).

Durante la caracterización de la actividad de fosfolipasa A₁ y A₂ de *T. vaginalis* encontramos actividad contundente, el primer paso fue si *T. tenax* presentaba dicha actividad, nosotros determinamos la presencia de dicha actividad con el sustrato específico $[^{14}\text{C}]\text{-FC}$, marcado en la posición 2 del ácido palmítico del carbono dos del glicerol, considerando que si la radioactividad se localizaba en la mancha correspondiente a $[^{14}\text{C}]\text{-LFC}$ pero no en la del $[^{14}\text{C}]\text{-ácido palmítico}$ sería una fosfolipasa del tipo A₁, de lo contrario sería una actividad de fosfolipasa del tipo A₂, cuando sometimos este sustrato, con 200 µg de proteína del extracto total, encontramos un claro incremento de actividad hasta los 120 min de incubación, lo cual confirma por primera vez la presencia de actividad de fosfolipasas del tipo A₁ y A₂ en *T. tenax*, ya que la radioactividad estuvo en ambas manchas de cromatografía correspondientes a

[¹⁴C]-LFC y [¹⁴C]-AGL. En la Figura 8, se observa que dichas actividades de fosfolipasas A₁ y A₂ se incrementan linealmente hasta los 30 min de incubación, después de este tiempo las actividades ya no son lineales, aunque hay un incremento hasta los 120 min de incubación, mayor tiempo de este límite no representa mayor actividad. También nos percatamos que la actividad de fosfolipasa A₁ fue 30 % mayor que la fosfolipasa de tipo A₂ (Figura 8).

Cuando usamos las subfracciones S30 y P30 (Figuras 9 y 10), representa las actividades de fosfolipasas del tipo A₁ y A₂, confirmando la presencia de dichas actividades en *T. tenax*.

Una vez adaptado y probado el sistema quisimos determinar la cantidad de proteína necesaria para tener la máxima actividad fosfolipasa a diferentes concentraciones de proteínas de ET, S30 y P30 (Figuras 11, 12 y 13) donde encontramos un incremento de radioactividad en las manchas cromatográficas de [¹⁴C]-LFC (PLA₁) y [¹⁴C]-AGL (PLA₂). Donde la PLA₁ fue un 30 % más activa que PLA₂, en todos los casos. Esto nos indica que *T. tenax*, presenta actividad de fosfolipasa en forma soluble en la subfracción S30 y además en forma particulada posiblemente pegada a membrana de la subfracción P30. Lo cual es parecido a lo encontrado en *T. vaginalis*, pero el efecto de la PLA₁ con mayor actividad nos hace pensar que esta enzima se requiere más en el trabajo estricto de recambio de fosfolípidos en las membranas plasmáticas y, posiblemente, las fosfolipasas del tipo A₂ sean para hacer daño a las células del hospedero, (Shier, 1979; Lehninger, 1979). Esto lo afirmamos por la amplia información científica que corrobora las actividades de estas enzimas (Van Den Bosch, 1980).

Por otro lado, nosotros determinamos el efecto del pH, sobre el extracto total, S30 y P30, obtenidas de *T. tenax*. Encontramos que las tres fracciones presentan dos picos de actividad una a pH 6.0 y 8.0. Con respecto a PLA₁ y PLA₂ (Figura 14 y 15, respectivamente) observamos que en las tres fracciones las PLA₁ y PLA₂ a pH 8.0 presenta un incremento del 30 % aproximadamente con respecto a pH 6.0; éste marcado pH óptimo alcalino para PLA₁ está en contraste directo con el pH ácido a neutro óptimo para PLA₂, lo cual destaca el hecho de que la PLA₁ y la PLA₂ son dos enzimas distintas

en *T. tenax* de acuerdo con otros organismos estudiados hasta ahora (DeSilva y Quinn, 1986).

Sabemos que el pH de la boca de un paciente se localiza entre el pH de 5.6 a 7.9 lo cual es congruente con el pH encontrado para ambas actividades PLA₁ y PLA₂ de *T. tenax*, por lo que estas enzimas podrían intervenir como posibles factores de virulencia, sobre todos las PLA₂ ya que estas son las más usadas por mamíferos para la destrucción de membranas plasmáticas celulares (Van Den Bosch, 1980; Hawthorne y Ansell, 1982).

Para continuar la caracterización de las fosfolipasas de *T. tenax*, investigamos si estas dependían de Calcio, ya que la gran mayoría de estas enzimas reportadas en la literatura requieren como cofactor al calcio para ser activas (Van Den Bosch, 1980; Dennis, 1983).

En las Figuras 16 y 17, encontramos que tanto las fosfolipasas A₁ y A₂ son dependientes de calcio su actividad, esto lo afirmamos ya que, si en las mezclas de reacción no se adicionaba calcio, no encontrábamos actividad de estas enzimas. Además, determinamos que la máxima actividad en ambas subfracciones S30 y P30 fue de 1 mM de este catión, mayor concentración de calcio no se vio un incremento estadísticamente satisfactorio; donde si lo hay es en el Extracto total, donde en ambos tipos de PLA₁ y PLA₂, se incrementan su actividad en un 15% aproximadamente.

Con estos resultados determinamos las características de las fosfolipasas del tipo A₁ y A₂, en las subfracciones S30 (solubles) y P30 (particuladas), encontrando la presencia de actividad en ambas fracciones.

CONCLUSIONES

- Confirmamos la existencia por primera vez, que el extracto total y las subfracciones S30 y P30 de *T. tenax*, presentan actividad de fosfolipasas.
- En ambas subfracciones S30 (solubles) y P30 (particulada) se presenta actividad de fosfolipasas del tipo A₁ y A₂, presentándose una mayor actividad fosfolipasa del tipo A₁.
- Al presentarse mayor actividad fosfolipasa del tipo A₁ (PLA₁) nos hace pensar que esta enzima se requiere más en el recambio de fosfolípidos en las membranas plasmáticas, mientras que la actividad fosfolipasa del tipo A₂ (PLA₂) sea para hacer daño a las células del hospedero.
- Encontramos que los requisitos de calcio (1mM) y las condiciones de pH (6 a 8) en la que determinamos la actividad de las fosfolipasas, se debe en realidad a dos tipos de fosfolipasas una A₁ y otra A₂, ambas calcio-dependientes.

PERSPECTIVAS

Las fosfolipasas detectadas *in vitro* en esta tesis podrían jugar un papel importante en las lesiones en la boca o en otros órganos como pulmón, (Porcheret *et al.*, 2002; Govro y Stuart, 2016; Mallat *et al.*, 2004; Hersh, 1985; Duboucher *et al.*, 2000), ya que las fosfolipasas se caracterizan por producir zonas necróticas, en donde la destrucción tisular podría deberse a que los trofozoítos de *T. tenax* liberen citotoxinas activas o precursoras de ellas, mediante exocitosis o autolisis. La liberación de las fosfolipasas por estos mecanismos traería como consecuencia que ataque las membranas plasmáticas de las células adyacentes y producir ácidos grasos libres y fosfolisoderivados los cuales actúan como detergentes (Van Den Bosch, 1980), esto potenciaría a las fosfolipasas de las membranas plasmáticas o bien intercalándose sobre las membranas de las células blanco y auto-lisándolas provocando la no fluidez de membrana y la lisis de las células afectadas.

Además, las fosfolipasas de *T. tenax* podrían actuar directamente como enzimas hidrolíticas sobre los fosfolípidos de las membranas celulares, como sucede en otras fosfolipasas conocidas (Ibrahim *et al.*, 1995; Vargas-Villarreal *et al.*, 2005).

Este hallazgo que acabamos de describir contribuye en el proceso de identificar los posibles factores patogénicos de *T. tenax*, abriendo la posibilidad inmediata de purificar estas fosfolipasas más adelante para finalmente analizar su contribución en la virulencia de *T. tenax*.

BIBLIOGRAFÍA

1. Blake, GC. 1968. The microbiology of acute ulcerative gingivitis with reference to the culture of oral Trichomonads and Spirochaetes. *Proc R Soc Med.* 61:131-36.
2. Bozner P. y Demes, P. 1991. Degradation of collagen types I, III, IV and V by extracellular proteinases of an oral flagellate *Trichomonas tenax*. *Archs oral Biol*; 36 (10): 765-770.
3. Dawson-Saunders, B. and Trapp, R. (2005). *Bioestadística médica*. México: Manual Moderno.
4. Dennis, E.A. (1983). Phospholipases. In Boyer. P. (Ed). *The Enzymes*, Chap 9 Vol. XVI. Academic Press, New York,:Pp. 307-353
5. DeSilva, N. and Quinn, P. (1999). Characterization of phospholipase A₁, A₂, C activity in *Ureaplasma urealyticum* membranes. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 201: 159-167.
6. Duboucher, C. (2000). Lymph node infection by *Trichomonas tenax*: Report of a case with co-infection by *Mycobacterium tuberculosis*. *Human Pathology*, 31(10), pp.1317-1321.
7. Dybicz, M., Perkowski, K., Baltaza, W., Padzik, M., Sędzikowska, A. and Chomicz, L. (2018). Molecular identification of *Trichomonas tenax* in the oral environment of domesticated animals in Poland – potential effects of host diversity for human health. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 25(3), pp.464-468.
8. Faust, E. C. Russell, P. F. and Jung, R. C. (1974). *Parasitología Clínica*. Ed. Salvat. México. Pp.133-170.
9. Flores-Díaz M, Thelestam M, Clark GC, Titball RW, Alape-Girón A (2004) Effects of *Clostridium perfringens* phospholipase C in mammalian cells. *Anaerobe* 10: 115–123.

10. Fuentes-Cuevas R, Sánchez A, Castillo C, Hernández-Sierra F. 2008. Prevalencia y asociación epidemiológica de los protozoarios orales *Entamoeba gingivalis* y *Trichomonas tenax* en niños mexicanos. Revista ADM. 65:259-62
11. Gottlieb, DS., Diamond, LS. and Feki, PF. 1968. Incidence of Oral Protozoa in Necrositing Ulcerative Gingivitis. Int Ass Dent Res. 46th Meetng: 51.
12. Govro, E.J., Stuart, M.K., Cytokine response of human THP-1 macrophages to *Trichomonas tenax*, Experimental Parasitology (2016), doi: 10.1016/j.exppara.2016.07.011.
13. Hawthorne, S.N., Ansell, G.B. (1982) Phospholipids. Edición Elsevier Biomedical. Press Amsterdam, N.Y, Oxford. 313.
14. Hawthorne, S.N., Ansell, G.B. 1982. Phospholipids. Ed. Elsevier Biomedical. Press Amsterdam, N.Y, Oxford. 313.
15. Hersh, SM. 1985. Pulmonary trichomoniasis and *Trichomonas tenax*. J. Med. Microbiol. 20:1-8.
16. Honigberg, B., and D. E. Burgess. 1994. Trichomonads of importance in human medicine including *Dientamoeba fragilis*, p. 1–109. In J. P. Kreier ed.), Parasitic protozoa, vol. 9. Academic Press, Inc., New York, N.Y.
17. Honigberg, BM. 1978. Trichomonads of importance in human medicine. In: Kreier JP editor. Parasitic Protozoa. 2ed. Nueva York: Acad Press. p. 392-405.
18. Ibrahim AS, Mirbod F, Filler SG, Banno Y, Cole GT, Kitajima Y, Edwards Jr JE, Nozawa Y, Ghannoum MA. Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. Infect Immun 1995; 63: 1993-1998.
19. Jakobsen, EB., Friismoller, A. and Friis, J. 1987. *Trichomonas* species in a Subhepatic Abscess. Eur J Clin Microbiol. 6(3): 296-7.
20. Krvavac, S. 1998. Trichomoniasis of the breast diseased by fibrocystic mastopathy: pathogenic rather than saprophytic relationship (Trichomonas in fibrocystic mastopathy process). Med Arh. 52(3):143-5.
21. Lehninger, A.L. 1979. Bioquímica. pp. 296-299. Edición Omega. S.A. Barcelona.
22. Lowry, OH., NJ. Rosebrough, AL. Farr, y RJ. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry 193:265-273.

23. Lubick, KJ. and Burgess, DE. 2003. Purification and Analysis of a Phospholipase A2- Like lytic factor of *Trichomonas vaginalis*. American Society for Microbiology. 72(3):1284-1290.
24. Mallat, H., Podglajen, I., Lavarde, V., Mainardi, J., Frappier, J. and Cornet, M. (2004). Molecular Characterization of *Trichomonas tenax* Causing Pulmonary Infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(8), pp.3886-3887.
25. Marty, M., Lemaitre, M., Kémoun, P., Morrier, J. and Monsarrat, P. (2017). *Trichomonas tenax* and periodontal diseases: a concise review. *Parasitology*, 144(11), pp.1417-1425.
26. Mazur, H., Hook, E. 1976. A *Trichomonas* species in a mixed microbial Meningitis. *JAMA*. 236(17): 1.978-9.
27. Nagao, E., Yamamoto, A., Igarashi, T., Goto, N. and Sasa R. 2000. Two distinct hemolysins in *Trichomonas tenax* ATCC 30207. *Oral Microbiol Immunol*. 15(6):355-9.
28. Pardi, G., Perrone, M. and Mazzali de Ilja, R. 2002. *Trichomonas tenax*: Protozoario flagelado de la cavidad bucal. Consideraciones generales. *Acta odontol. Venez.* 40(1).
29. Poirier, TP., Holt, SC. And Honigberg, BM. 1990. Fine structure of the Mastigont System in *Trichomonas tenax* (Zoomastigophorea: Trichomonadida). American Microscopical Society. 109(4):342-351.
30. Porcheret, H., Maisonneuve, L., Esteve, V., Jagot, J., & Pennec, M.L. (2002). [Pleural trichomoniasis due to *trichomonas tenax*]. *Revue des maladies respiratoires*, 19 1, 97-9.
31. Ribeiro, LC, Santos C, Benchimol M. 2015. Is *Trichomonas tenax* a Parasite or a Commensal? *Protist*. 166: 196-210.
32. Roch, OC y Snyden, F. 1975. Rapid purification of phospholipase A2 from *Crotalus adamantis* venom by affinity chromatography. *J. Biol. Chem.* 250: 6565-6566.

33. Rosenberg, P. 1976. Toxins, Animal, Plant and Microbial. En: 5th International Symposium on Animal, Plant and Microbial Toxins P Rosenberg (Ed). Pergamon Press Ltd. Headington Hill Hall. San Jose Costa Rica. 1-1134.
34. Said-Fernández S. y López-Revilla, R. 1986. Free fatty acids generation from endogenous phospholipids are the major heat-stable hemolytic factor of *Entamoeba histolytica*. *Infect. Immun.* 56: pp 874-879.
35. Schwebke, JR. and Burgess, D. 2004. Trichomoniasis. Clinical Microbiology Reviews. 17(4):794 *Parasitology Res.* 81: 320-323.
36. Shier, WT. 1979. Activation of high levels of endogenous phospholipase A2 in cultured cells. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 76: 195-199.
37. Skipsky, J.P. y Barclay, M. (1969). Thin-Layer chromatography of lipids. En J.M. Lowestein (ED). *Methods in Enzymology. Academic Press*, 14: pp. 30-599.
38. Van Den Bosch, H. (1980). Intracellular phospholipase A. *Biochim. Biophys. Acta.* 604: pp. 191.
39. Vargas-Villarreal J, Mata-Cárdenas BD, González-Salazar F, Lozano-Garza HG, Cortes-Gutierrez EI, Palacios-Corona R, Martínez-Rodríguez HG, Ramírez-Bon E, Said-Fernández S. 2003. *Trichomonas vaginalis*: identification of a phospholipase A-dependent hemolytic activity in a vesicular subcellular fraction. *J Parasitol* 89: 105 –112.
40. Vargas-Villarreal J, Mata-Cárdenas BD, Palacios-Corona R, Gonzalez-Salazar F, Cortes-Gutierrez EI, Martinez-Rodriguez HG, Said-Fernández S. 2005. *Trichomonas vaginalis*: identification of soluble and membrane-associated phospholipase A₁ and A₂ activities with direct and indirect hemolytic effects. *Journal of Parasitology* 91(1):5-11.
41. Vargas-Villarreal, J., Escobedo-Guajardo, B., Mata-Cárdenas, B., Palacios-Corona, R., Cortes-Gutiérrez, E., Morales-Vallarta, M., Sampayo-Reyes, A. and Said-Fernández, S. (2007). Activity Of Intracellular Phospholipase A₁ and A₂ in *Giardia Lamblia*. *Journal of Parasitology*, 93(5), pp.979-984.
42. Vargas-Villarreal, J., Martínez-Rodríguez, H., Castro-Garza, J., Mata-Cárdenas, B.D., González-Garza, M.T. and Saíd-Fernández, S. (1995). Identification of

- Entamoeba histolytica* Intracellular Phospholipase A and Lysophospholipase L₁ Activity. *Parasitology Research*, 81(4), pp.320-323.
43. Yamamoto A, Asaga E, Nagao E, Igarashi T, Goto N. Characterization of the cathepsin Blike proteinases of *Trichomonas tenax* ATTC 30207. *Oral Microbiol Immunol* 2000; 15 (6): 3604.