

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE UNA
FOSFOLIPASA A₂ DE *Trichomonas vaginalis***

Por

BRENDA LETICIA ESCOBEDO GUAJARDO

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTORA EN CIENCIAS con Especialidad en Microbiología**

Junio, 2012

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE UNA
 FOSFOLIPASA A₂ DE *Trichomonas vaginalis***

Comité de Tesis

**Dr. Mario Rodolfo Morales Vallarta
 Director de Tesis**

**Dr. Javier Vargas Villarreal
 Secretario**

**Dr. Benito David Mata Cárdenas
 Vocal 1**

**Dr. Carlos Eduardo Hernández Luna
 Vocal 2**

**Dr. Jorge A. Verduzco Martínez
 Vocal 3**

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE UNA
 FOSFOLIPASA A₂ DE *Trichomonas vaginalis*.**

Comité Académico de Doctorado

Subdirector de Estudios de Posgrado

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE UNA
 FOSFOLIPASA A₂ DE *Trichomonas vaginalis*.**

Dr. Mario Rodolfo Morales Vallarta
Director Interno de Tesis
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad Autónoma de Nuevo León

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

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento al Dr. Javier Vargas Villarreal, director externo de mi tesis, así como al Dr. Mario R. Morales Vallarta, director interno de tesis, y al Dr. Benito D. Mata Cárdenas por su valiosa colaboración, al Dr. Carlos E. Hernández Luna y al Dr. Jorge A. Verduzco Martínez por sus consejos y apoyo, por el interés y tiempo dedicado por todos para la realización de este proyecto, y por formar parte de mi comité de tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico brindado para la realización de mis estudios de doctorado. Al Centro de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social, por el apoyo económico, así como el espacio y equipo para la realización de esta tesis.

Al Dr. Salvador Saíd Fernández quien fungió como director del CIBIN, IMSS, durante gran parte de la elaboración de este trabajo por su apoyo y estímulos. Al Dr. Juan Manuel Alcocer González, director de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL durante la elaboración de esta tesis por las amplias facilidades brindadas.

A los integrantes del laboratorio de Biología Celular y Molecular del CIBIN: M en C. Magda E. Hernández Garza y Jesus Norberto Garza la amistad, apoyo y consejos que me brindaron durante el desarrollo de esta tesis.

De manera muy especial, a mi familia, por su apoyo y comprensión en todos los sentidos, y a todas esas personas que se preocuparon, me apoyaron y motivaron de alguna u otra manera para la culminación de este trabajo.

GRACIAS.

DEDICATORIA

Quiero dedicar esta tesis, la cual representa la culminación de una de mis metas, a mis padres con mucho cariño: Juan Antonio y Maria de Jesús, pues gracias a ellos he ha sido posible realizar este trabajo, brindándome el tiempo y la ayuda necesaria durante las largas horas de trabajo.

A mis hermanos Diana y Jorge por su gran apoyo, principalmente por su dedicación para compartir con mis pequeños mientras yo me ocupaba en el laboratorio.

Para mi esposo, Alejandro, por su paciencia y comprensión durante el tiempo que implicó el desarrollo del proyecto y la elaboración de la tesis, y por los sacrificios en el tiempo que compartimos juntos, y por último, pero no menos importante, a mis dos hermosos hijos, Diego y Valeria, por que son ellos mi principal motivación para seguir avanzando en la larga carrera de la vida, con la bendición de Dios...

Con mucho cariño,

BRENDA

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

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
	1
1. RESUMEN y ABSTRACT.	3
2. INTRODUCCIÓN	4
3. HIPÓTESIS.	5
4. OBJETIVOS	5
4.1 Objetivo General	5
4.2 Objetivos Particulares	6
5. ANTECEDENTES.	6
5.1 Características Biológicas de <i>T. vaginalis</i>	6
5.2 Clasificación Taxonómica	7
5.3 Epidemiología	8
5.4 Factores de Virulencia de <i>T. vaginalis</i>	9
5.5 Fosfolipasas A	11
5.6 Cromatografía de Afinidad con el Inhibidor de Rosenthal como Ligando.	12
5.7 Definición del Problema y Justificación	13
6. MATERIALES.	14
6.1 Reactivos Usados	14
6.2 Material Biológico.	14
6.2.1 Cepa de <i>T. vaginalis</i> GT-15	15
6.2.2 Medio de Cultivo PEHPS	15
6.2.3 Suero Bovino.	16
6.2.4 Suspensión de Eritrocitos para Ensayos de Hemólisis.	17
6.2.5 Solución Concentrada de Veneno Total de <i>Crotalus adamanteus</i>	17

Solución Concentrada de Veneno Total de <i>Crotalus basiliscus</i> .	17
6.3 Soluciones de Trabajo	17
6.3.1 Solución Amortiguadora de Fosfatos (PBS) 10X.	17
6.3.1.1 Solución Amortiguadora de Fosfatos (PBS) 1X	18
6.3.2 Cloruro de Calcio 1 M.	18
6.3.3 Tritón X 100 al 4%	18
6.3.4 Tris-HCl 1 M	18
6.3.5 Tris-Base 1 M	18
6.3.6 Amortiguador de Acetatos 1 M.	19
6.3.7 Mezcla de Ensayo 2X para Determinar Actividad de FLA	19
6.3.8 Soluciones para la Elaboración de la Columna de Afinidad	19
6.3.8.1 Bicarbonato de Sodio 0.1 M.	19
6.3.9 Soluciones para Cromatografía de Afinidad	19
6.3.9.1 Solución Amortiguadora con Calcio	19
6.3.9.2 Solución Amortiguadora con Calcio y Cloruro de Sodio.	20
6.3.9.3 Amortiguador con EDTA.	20
6.3.9.4 Acido Acético 0.1 M.	20
6.3.9.5 Fase Móvil	20
6.3.10 Soluciones para la Digestión con Tripsina.	21
6.3.10.1 Bicarbonato de Amonio 1 M	21
6.3.10.2 Bicarbonato de Amonio 100 mM	21
6.3.10.3 Ditiotretitol 200 mM en Bicarbonato de amonio 100 mM	21
6.3.10.4 Yodoacetamida 1M en Bicarbonato de amonio 100 mM.. . . .	21
6.3.10.5 Tripsina.	22
6.3.11 Soluciones para la Electroforesis en Gel de Poliacrilamida con SDS.	22
6.3.11.1 Poliacrilamida 30%	22
6.3.11.2 Dodecil Sulfato Sódico 10 %	22
6.3.11.3 Amortiguador de Gel Concentrador 0.5 M	22
6.3.11.4 Amortiguador de Gel Separador 1.5 M	22
6.3.11.5 Amortiguador de Corrimiento.	22
6.3.11.6 Amortiguador de Muestra.	23
6.3.11.7 Persulfato de Amonio al 10%	23
6.3.12 Soluciones para Actividad Hemolítica.	23
6.3.12.1 Solución Salina Balanceada de Hank 1 M (SSB).	23
6.3.12.2 Solución de Alsever	23
6.3.13 Soluciones para la Tinción con Plata	24
6.3.13.1 Solución de Metanol al 50% y Ácido Acético al 12%	24
6.3.13.2 Solución de Etanol al 10% y Ácido Acético al 5%	24
6.3.13.3 Dicromato de Potasio 0.0034 M en Ácido Nítrico 0.0032 N.	24
6.3.13.4 Solución de Nitrato de Plata 0.012 M	25

6.3.13.5 Solución de Carbonato de Sodio 0.28 M y Formaldehído al 0.05%	25
6.3.14 Soluciones para el Análisis por CLAR/EM en tándem	25
6.3.14.1 Fase Móvil Acuosa	25
6.3.14.2 Fase Móvil Orgánica	25
6.3.14.3 Solución de Acetonitrilo al 100%	25
6.3.14.4 Solución de Ácido Trifluoroacético al 1%	25
6.3.14.5 Leucina-Encefalina	25
6.3.14.5.1 Solución Stock	25
6.3.14.5.2 Solución Spec.	25
 7. MÉTODOS.	 26
7.1 Cultivo Axénico de <i>T. vaginalis</i>	26
7.1.2 Descongelación de la Cepa de <i>T. vaginalis</i> GT-15	26
7.1.3 Mantenimiento de la Cepa	26
7.1.4 Resiembra y Cosecha.	26
7.2 Curva de Crecimiento de <i>T. vaginalis</i>	27
7.3 Cultivo Masivo de <i>T. vaginalis</i>	27
7.3.1 Medio de Cultivo Usado de <i>T. vaginalis</i>	28
7.4 Obtención de Fracciones Subcelulares	28
7.4.1 Fracción Subcelular S30 de <i>T. vaginalis</i>	28
7.4.2 Fracciones Ultrafiltradas por Membranas de Corte	29
7.5 Cuantificación de Proteínas Totales	30
7.6 Detección de la Actividad de Fosfolipasa A.	30
7.6.1 Método de Radioensayo.	30
7.6.2 Cromatografía en Capa Fina	31
7.7 Curva Temporal de Actividad de FLA ₂	32
7.8 Curva Dosis-Respuesta de Actividad de FLA ₂	32
7.9 Determinación del Efecto del pH sobre la Actividad de FLA ₂	32
7.10 Determinación del Efecto del Calcio sobre la Actividad de FLA ₂	32
7.11 Actividad Hemolítica de la FLA ₂ Aislada	33
7.11.1 Curva Temporal de Hemólisis	33
7.11.2 Curva Dosis-Respuesta de Hemólisis.	33
7.11.3 Efecto del IR sobre la Actividad Hemolítica.	34
7.12 Digestión con Tripsina.	34
7.13 Electroforesis en Gel de Poliacrilamida en presencia de SDS.	35
7.14 Tinción con Plata.	36
7.15 Elaboración de la columna de afinidad	37
7.16 Cromatografía de Afinidad	38
7.16.1 Preparación de la Columna para Cromatografía de Afinidad	38
7.17 Análisis por Espectrometría de Masas en Tándem	
Acoplado a Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.	38
7.17.1 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.	39
7.17.2 Espectrometría de Masas	39

7.17.2.1 Condiciones de calibración	39
7.17.3 Secuenciación.	40
7.17.4 Análisis de Resultados	40
8. RESULTADOS.	41
8.1 Preparación y Evaluación de la Columna de Afinidad de Sefarosa-4B Activada con Bromuro de Cianógeno y el IR como Ligando frente a FLA ₂ Conocidas	41
8.2 Aislamiento de dos FLA ₂ Conocidas a partir de Venenos de Serpientes mediante Cromatografía de Afinidad	42
8.3 Análisis por SDS-PAGE de las FLA ₂ de Venenos de Serpientes Aisladas por Cromatografía de Afinidad.	44
8.4 Obtención de la Fracción de <i>T. vaginalis</i> con Actividad de FLA ₂ y Determinación de las Condiciones para su Purificación	45
8.5 Parámetros de Crecimiento de la cepa GT-15 de <i>T. vaginalis</i>	45
8.6 Obtención del Medio de Cultivo Usado y Fracción Subcelular S30 de <i>T. vaginalis</i>	46
8.7 Actividad de FLA ₂ en el Medio de Cultivo Usado de <i>T. vaginalis</i> a pH 8.0	47
8.7.1 Ensayo de Actividad de FLA ₂ en el Medio de Cultivo Usado y Ultrafiltrado con Membrana de Corte de 10 KDa.	48
8.7.2 Actividad de FLA ₂ de la FR10 del Medio de Cultivo Usado frente al IR.	49
8.7.3 Actividad de FLA ₂ de las Fracciones Ultrafiltradas con Membrana de Corte de 30 KDa y 10-30 KDa.	50
8.7.4 Cromatografía de Afinidad de la FR30 del Medio de Cultivo Usado.	51
8.8 Actividad de FLA ₂ en la Fracción Subcelular S30 a pH 8.0.	53
8.9 Actividad de FLA ₂ en la Fracción Subcelular S30 a pH 6.0.	53
8.10 Purificación de una FLA ₂ soluble de la fracción S30 de 48 hrs de <i>T. vaginalis</i> a pH 6.0	55
8.11 Análisis por SDS-PAGE de las Fracciones de Cromatografía de S30	56
8.12 Análisis por Espectrometría de Masas	57
8.12.1 Análisis por Espectrometría de Masas de la Fracción de EDTA obtenida por Cromatografía de Afinidad del Veneno Total de <i>C. adamanteus</i>	57
8.12.2 Análisis por Espectrometría de Masas de la Fracción de EDTA obtenida por Cromatografía de Afinidad de S30 a pH 6.0	57
8.12.3 Análisis por Espectrometría de Masas de la FUF30 3X obtenida de S30	59
8.12.4 Obtención de Secuencias Parciales de las Proteínas Aisladas de la FUF30 3X	60

8.13 Caracterización de la Proteína de 13 KDa con Actividad de FLA ₂ Aislada de la FUF30 3X.	61
8.13.1 Cromatografía de Afinidad de la FUF30 3X	62
8.13.2 Análisis por Espectrometría de Masas de las Fracciones de Cromatografía de Afinidad de FUF30 3X.	62
8.13.3 Curva Temporal de Actividad de FLA ₂	66
8.13.4 Curva Dosis-Respuesta de Actividad de FLA	68
8.13.5 Curva de pH de la Actividad de FLA ₂	68
8.13.6. Efecto del Calcio sobre la Actividad de FLA ₂	69
8.13.7 Actividad Hemolítica de la FLA ₂	69
8.13.7.1 Curva Temporal de Hemólisis de la FLA ₂	70
8.13.7.2 Curva Dosis-Respuesta de Hemólisis de la FLA ₂	70
8.13.7.3 Efecto del Inhibidor de Rosenthal sobre la Actividad Hemolítica de la FLA ₂	71
9. DISCUSIÓN	73
10. CONCLUSIONES	87
11. PERSPECTIVAS	88
12. LITERATURA CITADA	89

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
I. Componentes del medio PEHPS	16
II. Componentes de la mezcla de ensayo 2X	20
III. Disolventes utilizados para la preparación de la fase móvil para la CCF	21
IV. Recuperación de proteínas y actividad fosfolipásica de la columna de afinidad del veneno de <i>C. basiliscus</i>	42
V. Recuperación de proteínas y actividad fosfolipásica de la columna de afinidad del veneno de <i>C. adamanteus</i>	43
VI. Recuperación de proteínas y actividad fosfolipásica de la columna de afinidad de la fracción retenida (FR30) por ultrafiltración del medio de cultivo usado de <i>T. vaginalis</i> a pH 8.0.	51
VII. Recuperación de proteínas y actividad fosfolipásica de la columna de afinidad de la fracción subcelular S30 de 72 hrs de <i>T. vaginalis</i> a pH 6.0.	55
VIII. Recuperación de proteínas y actividad fosfolipásica de la columna de afinidad de la fracción subcelular S30 de 48 hrs de <i>T. vaginalis</i> a pH 6.0	55
IX. Secuencias peptídicas de las proteínas presentes en la FUF30 3X previa digestión con tripsina y análisis por CLAR/EM.	61
X. Recuperación de proteínas y actividad fosfolipásica de la columna de afinidad de la FUF30 3X de <i>T. vaginalis</i>	63

LISTA DE FIGURAS

Figuras	Página
1. Esquema de Hidrólisis de la Fosfatidilcolina por las Fosfolipasas A ₁ y A ₂	9
2. Esquema del procedimiento para la obtención de la fracción S30 a partir de los cultivos masivos de <i>T. vaginalis</i>	29
3. Cromatografía de afinidad del veneno total de <i>Crotalus basiliscus</i> y <i>C. adamanteus</i>	43
4. Electroforesis en gel de poliacrilamida (12%) en presencia de SDS de las fracciones de cromatografía del veneno total de <i>C. adamanteus</i> teñido con la técnica de nitrato de plata	44
5. Curva de Crecimiento de <i>T. vaginalis</i> GT-15 en medio PEHPS.	46
6. Efecto del IR sobre las distintas fracciones de <i>T. vaginalis</i>	47
7. Comparación de la actividad de FLA ₂ a diferentes tiempos de incubación en el medio de cultivo usado de <i>T. vaginalis</i>	48
8. Actividad de FLA ₂ en DPM's de 400 µg de PT de Medio de cultivo usado directo y Fracción Retenida (FR) por corte con membrana de 10 KDa.	49
9. Efecto de diferentes concentraciones del Inhibidor de Rosenthal sobre la FR10 del medio de cultivo de 72 hrs	49
10. Efecto del IR sobre las fracciones obtenidas por ultrafiltración de medio de cultivo de 72 h	50
11. Cromatografía de afinidad de la FR30 del medio de cultivo de 72 hrs de <i>T. vaginalis</i> GT-15 a pH 8.0.	52

12. Cromatografía de afinidad de la fracción S30 de 72 hrs de <i>T. vaginalis</i> GT-15 a pH 6.0.	54
13. Cromatografía de afinidad de la fracción S30 de 48 hrs de <i>T. vaginalis</i> GT-15 a pH 6.0	56
14. Electroforesis en gel de poliacrilamida (12%) en presencia de SDS de las fracciones de cromatografía S30 de 48 hrs a pH 6.0 teñido con la técnica de nitrato de plata.	56
15. Deconvolución del espectro de masas para fracción de EDTA del veneno total de <i>C. adamanteus</i>	58
16. Deconvolución de los espectros de masas de la fracción EDTA de S30 de 48 hrs a pH 6.0	59
17. Deconvolución de los espectros de masas de las dos fracciones separadas a partir de FUF30 3X.	60
18. Efecto del IR en la actividad de la FLA ₂ de 13 KDa de la FUF30 de S30 de 48 hrs a pH 6.0.	62
19. Cromatografía de afinidad de FUF30 3X de la fracción S30 de 48 hrs de <i>T. vaginalis</i> GT-15 a pH 6.0.	63
20. Deconvolución de espectros de masas de las fracciones de cromatografía de afinidad de FUF30 3X a pH 6.0 de S30 de <i>T. vaginalis</i>	66
21. Curva temporal para la FLA ₂ dependiente de calcio de <i>T. vaginalis</i>	67
22. Curva Dosis-Respuesta de la FLA ₂ aislada dependiente de Calcio	67
23. Actividad de FLA ₂ a diferentes valores de pH.	68
24. Efecto de la concentración de CaCl ₂ en la actividad de FLA ₂	69
25. Curva temporal de la actividad hemolítica de la FLA ₂ sobre eritrocitos de rata a pH 6.0.	70
26. Curva de actividad hemolítica de la FLA ₂ sobre eritrocitos de rata a pH 6.0.	71
27. Efecto del IR sobre la actividad hemolítica de FLA ₂ en eritrocitos de rata.	72

LISTA DE ABREVIATURAS

AG	Ácido graso
AGL	Ácido graso libre
cm	Centímetros
CaCl ₂	Cloruro de calcio
CCF	Cromatografía en capa fina
EDTA	Ácido etilendiaminotretacético
ET	Extracto total
FC	Fosfatidilcolina
Fig.	Figura
FLA	Fosfolipasa A
FLA ₂	Fosfolipasa A ₂
FUF	Fracción Ultrafiltrada
g	Gramos
x g	x veces la fuerza de gravedad
h	Hora
HCl	Ácido clorhídrico
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
IR	Inhibidor de Rosenthal
Kg	Kilogramo
KDa	Kilodalton
L	Litro
LFC	Lisofosfatidilcolina
mg	Miligramos
mL	Mililitros

mm	Milímetros
mM	Milimolar
mOsm	Miliosmoles
min	Minutos
M	Molar
μg	Microgramos
μL	Microlitros
nM	Nanomolar
ng	Nanogramos
No.	Número
PBS	Solución Amortiguadora de Fosfatos
pg	Picogramos
PI	Punto isoelectrico
P30	Particulado a 30 000 x g
pmoles	Picomoles
Rf	Relación de frentes
RI	Regiones intermedias
rpm	Revoluciones por minuto
SSB	Solución Salina Balanceada de Hank
S30	Sobrenadante a 30 000 x g
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TFA	Ácido trifluoroacético
T _R	Tiempo de Retención
U	Unidad
°C	Grados Celsius

1. RESUMEN

Trichomonas vaginalis es el agente causal de la tricomoniasis, afectando al 12% de los hombres y al 16% de las mujeres en el mundo. La manifestación clínica más frecuente es la vulvovaginitis, dolor abdominal y mayor secreción vaginal. Se sabe que *T. vaginalis* posee la habilidad de destruir *in vitro* monocapas celulares de la mucosa vaginal, donde las fosfolipasas A₂ (FLA₂) han sido reportadas como posibles factores de virulencia. En *T. vaginalis*, estas enzimas están en forma soluble (fracción subcelular S30), en el medio de cultivo y asociadas a membrana (fracción particulada P30). **Objetivo General.** Purificar a homogeneidad una fosfolipasa A₂ de *T. vaginalis*, caracterizarla parcialmente, obtener su secuencia parcial y determinar su participación en el efecto lítico de *T. vaginalis*. **Objetivos Específicos.** 1) Obtención de la fracción S30 de *T. vaginalis* con actividad de FLA₂ y determinar condiciones para su purificación. 2) Elaboración de la columna de afinidad usando Sefarosa-4B activada con bromuro de cianógeno y el inhibidor de Rosenthal como ligando. 3) Purificación de una FLA₂ soluble de la fracción S30 de *T. vaginalis*. 4) Obtener la secuencia parcial de la FLA₂ purificada a homogeneidad mediante espectrometría de masas en tandem acoplada a cromatografía de líquidos de alta resolución. 5) Caracterizar parcialmente la enzima pura en cuanto a tiempo de incubación, curvas dosis-respuesta, pH óptimo de actividad y dependencia de calcio. 6) Determinar la participación de la enzima pura en la actividad lítica de *T. vaginalis* usando el inhibidor de Rosenthal. **Material y Métodos.** Utilizamos la cepa GT-15 de *T. vaginalis* la cual cultivamos en medio PEHPS. Obtuvimos la fracción subcelular (S30) a partir del cultivo masivo para purificar a partir de ella una fosfolipasa A₂ soluble. La detección y cuantificación de la actividad de FLA₂ en el extracto S30, previo a la purificación y posterior a ella se hizo por el método de radioensayo descrito por Vargas-Villarreal *et al.*, (1995). La fosfolipasa A₂ se purificó mediante cromatografía de afinidad, la cual tuvo como ligando al inhibidor de Rosenthal que en presencia de calcio retiene a las fosfolipasas A₂ mediante la interacción específica enzima-sustrato. La elución de las fosfolipasas A₂ de la columna se hizo mediante la remoción del calcio. Una vez la enzima ya purificada, se caracterizó parcialmente. Se determinó el peso molecular el cual fue de aproximadamente 13 KDa, se obtuvieron secuencias parciales, se determinó el pH óptimo de actividad que fue de 6.0, concentración óptima de calcio en 1 mM, tiempo óptimo de incubación a una hora y se determinó su efecto hemolítico sobre eritrocitos de rata el cual fue del 100 % a la hora de incubación con una actividad hemolítica directa.

ABSTRACT

Trichomonas vaginalis is the causative agent of trichomoniasis, affecting 12% of men and 16% of women in the world. The most common clinical manifestation involves vulvovaginitis, abdominal pain, and increased vaginal discharge. It is known that *T. vaginalis* has the ability to destroy vaginal mucose monolayer cells *in vitro*, where phospholipase A₂ (PLA₂) have been reported as potential virulence factors. In *T. vaginalis*, these enzymes are in soluble form (subcellular fraction S30), also found in the used culture media and associated to membrane (P30 particulated fraction). **General Objective.** Purification of a FLA₂, its partial characterization and sequencing, and determination of its participation in the lytic effect of *T. vaginalis*. **Specific Objectives.** 1) Obtaining the S30 fraction of *T. vaginalis* with PLA₂ activity and to determine conditions for its purification. 2) Elaboration of the affinity column using sepharose 4B activated bromide-cyanogen and the Rosenthal inhibitor as ligand. 3) Purification of a soluble PLA₂ from *T. vaginalis* S30 subcellular fraction. 4) Obtention of a partial sequence from the purified PLA₂ by HPLC/MS in tandem. 5) Partial characterization of the purified enzyme with temporal curve, dosis-response curve, optimum pH and calcium dependence. 6) Determine the role of the purified enzyme in the lytic activity of *T. vaginalis*, using the Rosenthal inhibitor. **Material and Methods.** Strain *T. vaginalis* GT-15 was cultured in PEHPS culture media. We massively cultured the strain *T. vaginalis* GT-15 to obtain the S30 subcellular fraction, and to achieve purification of a soluble PLA₂. Detection and quantification of the activity in the S30 extract prior to purification and after it was made by the radioassay method described by Vargas-Villarreal *et al.*(1995). The PLA₂ was purified by affinity chromatography on a column prepared in our laboratory, which had as ligand the Rosenthal inhibitor, that in the presence of calcium retains the PLA₂ by specific enzyme-substrate interaction and in the same way, it can be eluted by calcium remotion. Once the enzyme was purified to homogeneity, it was characterized partially. It had a molecular weight of 13 KDa approximately, a optimum pH of 6.0, an optimum activity at 1mM of calcium, an incubation time of 1 hr and a direct hemolytic activity of 100% in the first hour with rat erythrocytes.

2. INTRODUCCIÓN

Trichomonas vaginalis es un protozoario parásito flagelado, agente causal de la tricomoniasis, una enfermedad de transmisión sexual y causa común de vaginitis. Esta infección se ha relacionado con un bajo peso de los bebés al nacer y como cofactor en la transmisión y adquisición del HIV (Sorvillo *et al.*, 2001). Aún cuando su prevalencia es alta y tiene una distribución geográfica amplia, *T. vaginalis* no ha sido el foco de intensos estudios ni de programas activos de salud pública para el control de la infección.

T. vaginalis presenta actividad de varias hidrolasas que ya han sido caracterizadas, como por ejemplo: las cisteín-proteasas son las más abundantes en este protozoario (Hernández-Romano *et al.*, 2010); siguiendo las neuraminidasas (Crampen *et al.*, 1979), beta-N-acetilglucosaminidasas (Mirhaghani and Warton, 1998), alfa manosidasas (Banerjee *et al.*, 2007) y la alfa glucosidasa (Ter Kuile *et al.*, 2000). El papel de las actividades de fosfolipasas (Vargas-Villarreal *et al.*, 2003 y 2005), en los mecanismos patogénicos de *T. vaginalis* permanece sin ser definido. Estas enzimas ya se han propuesto como un factor de virulencia en otros microorganismos como *Clostridium perfringens* (Gustafson and Tagesson, 1990). La purificación y caracterización de esta actividad es un prerequisite para establecer su papel en el mecanismo patogénico de este parásito, así como su posible papel en el metabolismo del mismo protozoario.

3. HIPÓTESIS

Trichomonas vaginalis posee una fosfolipasa A₂ soluble que puede ser aislada y purificada a homogeneidad mediante cromatografía de afinidad para su secuenciación y caracterización parcial.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General.

Purificar a homogeneidad una fosfolipasa A_2 de *T. vaginalis*, caracterizarla parcialmente, obtener su secuencia parcial y determinar *in vitro* su capacidad lítica sobre eritrocitos en suspensión.

4.2 Objetivos Particulares.

4.2.1 Obtención de la fracción S30 de *T. vaginalis* con actividad de FLA₂ y determinar condiciones para su purificación.

4.2.2 Preparar una columna de afinidad usando Sefarosa-4B activada con bromuro de cianógeno y el inhibidor de Rosenthal como ligando.

4.2.3 Purificación de una FLA₂ soluble de la fracción S30 de *T. vaginalis*.

4.2.4 Obtener secuencia parcial de la FLA₂ purificada a homogeneidad mediante espectrometría de masas acoplada a cromatografía de líquidos de alta resolución.

4.2.5 Caracterizar parcialmente la enzima pura en cuanto a tiempo de incubación, curvas dosis-respuesta, pH óptimo de actividad y dependencia de calcio.

4.2.6 Determinar la actividad lítica de la enzima purificada de *T. vaginalis* sobre eritrocitos en suspensión presencia del inhibidor de Rosenthal.

5. ANTECEDENTES

5.1 Características Biológicas de *T. vaginalis*.

En cultivo este parásito es típicamente piriforme, sin embargo se han descrito formas ameboideas evidentes en los parásitos adheridos al tejido vaginal *in vivo* (John and Squires 1978) y algunas formas alusivas a un pseudoquiste en casos muestras relacionadas a neoplasia cervical (Afzan and Suresh, 2012). Presenta una sola fase de trofozoíto. Miden de 7 a 30 μm de largo y de 5 a 15 μm de ancho, poseen 4 flagelos anteriores y un flagelo recurrente en el borde exterior de la membrana ondulante, un núcleo, hidrogenosomas y un axostilo que corre a lo largo del parásito. Se dividen por fisión binaria longitudinal y la infección natural se establece en el tracto urogenital del humano (Costamagna and Prado-Figueroa, 2001). Su genoma consta de alrededor de 160 Mb de las cuales un 65% son repeticiones que consisten de elementos transposones activos o mavericks, repeticiones tipo virus y retrotransposones (Pritham *et al.*, 2006; Carlton *et al.*, 2007).

5.2 Clasificación Taxonómica.

T. vaginalis es un miembro del linaje de los parabasálidos microaerófilos eucariotas que carecen de mitocondrias y peroxisomas pero contienen organelos inusuales llamados hidrogenosomas. Aun cuando estudios previos lo han considerado como uno de los primeros organismos en la rama de los eucariotas, recientes estudios colocan a los parabasálidos en otros grupos mayores de eucariotas aun no bien definidos. Esta nueva clasificación taxonómica está basada en la Nueva Clasificación de Niveles Superiores de Eucariotas con Énfasis en la Taxonomía de Protistas (Adl *et al.*, 2005) y es la siguiente

<i>Super-grupo</i>	<i>Excavata</i>
<i>Primer rango</i>	<i>Parabasalia</i>
<i>Segundo rango</i>	<i>Trichomonadida</i>
<i>Tercer rango</i>	<i>Trichomonas</i>

5.3 Epidemiología.

T. vaginalis coloniza cavidades urogenitales, sin embargo existen 2 especies ampliamente relacionadas que también pueden causar infección al hombre: *T. tenax* y *Pentatrichomonas hominis* (colonizan boca e intestino grueso respectivamente). De estas tres especies la más importante por ser la única patógena es *Trichomonas vaginalis*. (Schwebke and Burgess, 2004).

La Organización Mundial de la Salud ha estimado que esta infección constituye casi la mitad de todas las infecciones curables en todo el mundo y se estima que alrededor de 120 a 180 millones de personas se infectan anualmente (Global Prevalence and Incidence of Selected Curable Sexually Transmitted Infections. World Health Organization; Geneva: 2001. www.who.int/docstore/hiv/GRSTI/006.htm; Cates, 1999). A la fecha se han realizado múltiples estudios moleculares que han permitido la clasificación de las diferentes cepas de *T. vaginalis* en “grupos” o “tipos” según características como la resistencia al metronidazol, o la susceptibilidad al Virus de *Trichomonas vaginalis* (TVV) siendo solo uno de ellos de implicación mundial (Cornelius *et al.*, 2010; Conrad *et al.*, 2012).

Tan solo en los Estados Unidos se presentan 7.4 millones de infecciones nuevas por año (Weinstock *et al.*, 2004) y de ellos el 50% de los casos son asintomáticos (Petrin *et al.*, 1998; Hook, 1999). En ese mismo país la prevalencia se estima en 2.3 millones de mujeres de edad entre 14 y 49 años, según una muestra nacional representativa de mujeres estudiadas entre el 2001- 2004. Otro hallazgo realizado en este estudio fue que la mayoría de las mujeres con tricomoniasis (85%) no presentaban síntomas siendo la

prevalencia de 13.35 % entre mujeres afroamericanas, del 1.3 % entre mujeres blancas y del 1.8% entre mujeres Mexicanas-Americanas. (CDC. Sutton *et al.*, 2007).

En México, las enfermedades de transmisión sexual se registran en el primer nivel de atención médica, sin embargo, se acepta que existe un subregistro. Hasta el 2003, la incidencia era de 183.42 por cada 100 000 habitantes. Si observamos la distribución por grupos de edad, las tasas más significativas se presentan en población entre los 15 y los 49 años siendo los estados que reportan las mayores incidencias en población general Morelos (170.59), Zacatecas (96.80) y Veracruz (85.72) casos por cada 100 000 habitantes (Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, No. 18, Vol. 21, Semana 18, Mayo del 2004).

5.4 Factores de Virulencia de *T. vaginalis*.

Aún cuando la patogénesis y virulencia en la tricomoniasis no está completamente entendida, ya se han identificado componentes derivados de este parásito que pueden causar daño a las células y tejidos del hospedero. Dentro de los mecanismos moleculares, se ha propuesto a la adhesión como un proceso importante y necesario en la patogénesis de *T. vaginalis*. Se han identificado varias moléculas de adhesión sobre la superficie de este parásito, que al ser bloqueadas por anticuerpos, inhiben el efecto citopático sobre el hospedero (Engbring y Alderete, 1998; Lee *et al.*, 2011). Dentro de las actividades enzimáticas, una variedad de hidrolasas han sido descritas en *T. vaginalis*, siendo las cisteín-proteasas particularmente prevalentes. De estas enzimas, las de bajo peso molecular pueden ser liberadas al espacio extracelular (Lockwood *et al.*, 1988).

Recientemente se ha encontrado evidencia que sugiere que *T. vaginalis* puede producir moléculas que son dirigidas a las células blanco y dañan la membrana plasmática por mecanismos de citotoxicidad. También una molécula adicional de ataque a membrana ha sido detectada recientemente en *T. vaginalis* y se ha denominado Factor Lítico, el cual es capaz de destruir células nucleadas y eritrocitos además de ser

específica para actuar sobre la fosfatidilcolina sugiriendo una actividad de fosfolipasa A₂ (Lubick and Burgess, 2004). Vargas-Villarreal *et al.*, (2005) demostraron actividades hemolíticas directas e indirectas dependientes de fosfolipasas A (A₁ y A₂) en los extractos subcelulares de *T. vaginalis* así como en el medio de cultivo. Estas actividades se han propuesto como las responsables de las actividades citolíticas y hemolíticas de *T. vaginalis*.

5.5 Fosfolipasas A.

Las fosfolipasas pertenecen al grupo de las hidrolasas. Estas son conocidas con el nombre de esterases, ya que hidrolizan los enlaces éster de los fosfolípidos y lisofosfolípidos (Van den Bosch, 1980). Se clasifican según la posición del enlace éster que hidrolizan en los fosfolípidos teniendo a las fosfolipasas A (divididas en A₁ y A₂) B, C y D (Dennis, 1983). Estas enzimas se describieron desde hace 100 años, pero fue hasta hace 20 que se empezaron a estudiar con mayor intensidad (Van den Bosch, 1980; Chang *et al.*, 1987).

La FLA₂ (E.C. 3.1.1.4, fosfatidilcolina 2-acilhidrolasa) hidroliza el acilo en la posición sn-2 de un fosfolípido produciendo un ácido graso y un monoacil-1-glicero-fosfátido, en forma equimolar. Se han aislado principalmente de páncreas de mamífero, veneno de serpientes, veneno de abeja y diversos microorganismos mas (Dennis, 1994, Figura 1).

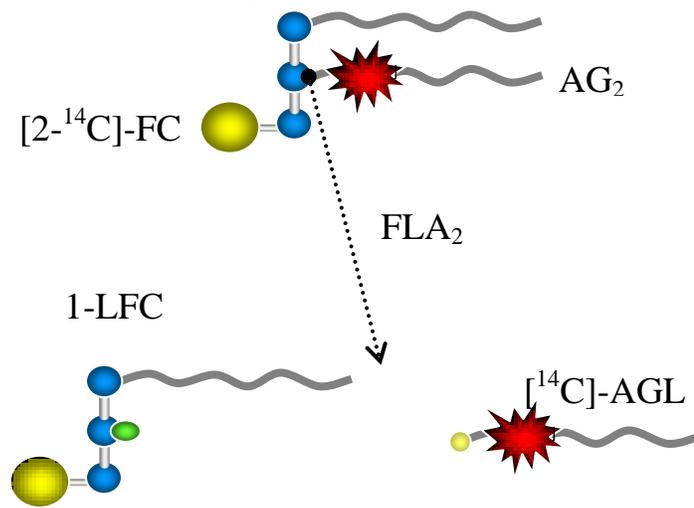


Figura 1. Productos de hidrólisis de [2-¹⁴C]-FC por una FLA₂.

Se les ha clasificado en grupos con base en el número de puentes disulfuro y su secuencia, y los grupos son: secretorias, citosólicas, independientes de calcio, asociadas a lipoproteína, como factores activadores de plaquetas y como fosfolipasas adiposo específicas. (Dennis, 2011). La mayoría de éstas forman parte esencial de diversos procesos fisiológicos, tales como recambio de fosfolípidos en las biomembranas; en la generación de diversas sustancias bioactivas: lisofosfolípidos, ácidos grasos libres y mediadores lipídicos de la inflamación, como el ácido araquidónico, precursor de prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos, en la modulación del proceso de fagocitosis (Dennis, 1983; Zizza *et al.*, 2012) así como regulación de la entrada de calcio (Eintracht *et al.*, 1998). Algunas otras son responsables directas de la neurotoxicidad y citotoxicidad ampliamente conocida en venenos de hongos, celenterados, insectos, arácnidos y reptiles (Vadas and Pruzanski, 1986; Chang *et al.*, 1987), además de participar en el mantenimiento del ciclo infeccioso de algunos protozoarios (Cassaing *et al.*, 2003; Bhanot *et al.*, 2005) o relacionarse con su patogenicidad (Matin and Jung, 2011) y efecto antibacterial (Perumal-Samy *et al.*, 2006, 2007).

Existen numerosas diferencias fisicoquímicas entre estas enzimas tales como: punto isoeléctrico (varía entre 4.0 a 11.0), el estado de agregación y una diversidad de especificidad por sus substratos (Dennis, 1983). También, presentan algunas características conservadas como: bajo peso molecular (alrededor de 14 KDa) en las FLA₂ secretadas y de aproximadamente 85 KDa para la citosólicas (Dennis, 1994), numerosos puentes disulfuro (4 a 7) lo cual les da estabilidad, alto grado de homología en su secuencia primaria y en general, dependen de cofactores divalentes, principalmente calcio. (Van den Bosch, 1980; Wainszelbaum *et al.*, 2001).

El papel de las actividades de FLA₂, en los mecanismos patogénicos de *T. vaginalis* aun se desconoce. McGregor y colaboradores (1992) reportaron un incremento en la actividad de FLA₂ en los fluidos vaginales de mujeres embarazadas con presencia de vaginosis bacteriana, *T. vaginalis* o *Chlamydia trachomatis*, con respecto a quienes no padecían infección. En cuanto a su presencia y función biológica en otros parásitos, este mismo tipo de enzimas se han reportado como posibles factores de virulencia en

Entamoeba histolytica (Vargas-Villarreal *et al.*, 1995), *Trypanosoma cruzi* (Wainszelbaum *et al.*, 2001), *Naegleria fowleri* (Barbour and Marciano-Cabral, 2001).

5.6 Cromatografía de Afinidad con el Inhibidor de Rosenthal como Ligando.

La purificación de enzimas del tipo de las FLA₂ para el estudio de su papel en el metabolismo o virulencia de *T. vaginalis* puede intentarse mediante el uso de un inhibidor específico competitivo no hidrolizable (Vargas-Villarreal *et al.*, 1991, 1998). Existen múltiples compuestos que han sido identificados como inhibidores de FLA₂. Algunos de ellos son antibióticos (Sugatani *et al.*, 1979), ácidos biliares (Pereañez *et al.*, 2011), compuestos como el p-bromofenacilbromuro (Mitchell *et al.*, 1977) y el PX-52 (Franson and Rosenthal, 1997) entre otros mas.

Dijkman y colaboradores en 1997 reportaron el uso de un análogo de fosfolípido 2-acylamino para la elaboración de una columna de afinidad. Por otro lado, el inhibidor de Rosenthal (DL-2,3-distearoiloxipropil (dimetil)-β-hidroxiethylacetato de amonio) es un análogo de la fosfatidilcolina, por lo que actúa como un inhibidor competitivo para las fosfolipasas (Rosenthal and Geyer, 1960) que además ya ha sido utilizado en nuestro laboratorio como ligando para la fabricación de una columna de afinidad específica para fosfolipasas A y purificar estas enzimas a homogeneidad en un solo paso (Vargas-Villarreal *et al.*, 1991, 1998).

Una vez aislada la FLA₂ sería posible identificar secuencias parciales que nos permitieran estudiarla, determinar el gen así como su homología con las FLA₂ de otras especies. Si la secuencia obtenida lo permite puede llegar a ser incluso clonada y expresada en *E. coli* para posteriores estudios (Franken *et al.*, 1992). Debido a lo anterior creemos que la purificación de las fosfolipasas, en particular la fosfolipasa A₂ de *T. vaginalis* es factible mediante el uso de una columna de afinidad, además, permitirá la realización de estudios para el esclarecimiento de su papel en el mecanismo patogénico de este parásito.

5.7 Definición del Problema y Justificación.

En México existe poca experiencia en el manejo de fosfolipasas solubles e integradas a membrana. Manejar estrategias para purificar y caracterizar este tipo de enzimas dejará una experiencia que será de gran utilidad en los problemas inherentes al estudio posterior de este tipo de proteínas. Además las fosfolipasas provenientes de venenos de toda índole se han usado como blanco para obtener anticuerpos específicos para contrarrestar los efectos de estos venenos. La razón de utilizar como modelo biológico a las fosfolipasas de *Trichomonas vaginalis* se debe a la presunta importancia como factores de virulencia ya que las tricomonas están altamente distribuidas, afectando a la población a nivel mundial, incluyendo países industrializados y constituye un problema grave de salud pública en diversos países en vías de desarrollo.

La aportación de esta tesis es primeramente la purificación de una fosfolipasa A₂ de *T. vaginalis* para obtener su secuencia parcial y mas adelante su secuencia total por técnicas de Biología Molecular; ya que hasta ahora, de este tipo de enzimas no se conoce su secuencia total en protozoarios. Además intentaremos discernir su participación como posible factor de virulencia inhibiendo la actividad de la fosfolipasa purificada sobre eritrocitos usando ya sea inhibidores de la actividad o secuestradores de los productos líticos.

6. MATERIALES

6.1 Reactivos Usados.

A continuación se enlistan las compañías de origen de cada uno de los reactivos que se utilizaron en esta tesis:

A) Bioxón (Becton Dickinson de México S.A. de C.V.): Peptona de caseína, dextrosa.

B) Control Técnico y Representaciones, S.A. de C.V. (Monterrey, N. L. México): Fosfato de potasio monobásico, dibásico, ácido acético glacial, cloroformo, cloruro de sodio.

C) DIFCO Laboratories (Detroit, Michigan, E.U.A.): Extracto de levadura.

D) Merck México, S. A.: Placas de cromatografía capa fina.

E) New England Nuclear (Boston Mass. EUA): substratos radiactivos L-1-lisopalmitoil-L-1-[palmitoil-1-¹⁴C]-Fosfatidilcolina; L- α -dipalmitoil-[2-palmitoil-1-¹⁴C]-Fosfatidilcolina; L-dipalmitoil-[colina-metil-³H]-Fosfatidilcolina.

F) Productos Químicos Monterrey, S. A.: Carbonato de sodio, ácido clorhídrico, cloruro de calcio, hidróxido de sodio, yodo resublimado, citrato de amônio férrico, tartrato de sodio y potasio, sulfato de cobre pentahidratado, formaldehído, nitrato de plata, dicromato de potasio.

G) RELABY, S.A. de C.V. (México, D. F.): Metanol.

H) 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, veneno total de *Crotalus adamanteus*, veneno total de *Crotalus basiliscus*, EDTA, bilis bovina, formalina, N,N'-diciclohexilcarbodiimida, 4-dimetilaminopiridina, persulfato de amônio, ácido etilendiaminotetracético, carbonato de sódio, ácido nítrico, cloruro de potasio, acetato de sódio, yodoacetamida, acrilamida, bis-acrilamida, dodecil sulfato sódico, azul de bromofenol, sulfato de magnésio, ácido cítrico, Dioxano.

I) Spectrum: ácido aminocaproico, ditiotreitól, bicarbonato de amônio, Glicina, Acido fórmico, Metanol.

J) Promega: Tripsina.

6.2 Material Biológico.

6.2.1 Cepa de *T. vaginalis* GT-15.

Utilizamos la cepa GT-15 de *T. vaginalis* para desarrollar este trabajo por ser una cepa altamente virulenta y porque en ella se ha caracterizado la presencia de algunas actividades biológicas relevantes como hemólisis, y actividad de FLA₂ (Vargas-Villarreal *et al.*, 2003, 2005).

Ésta cepa fue donada por el Dr. Fernando Anaya Velázquez del Instituto de Biología Experimental, Facultad de Química, Universidad de Guanajuato, México y fue obtenida a partir de la secreción vaginal de pacientes con trichomoniasis sintomática (Padilla-Vaca y Anaya-Velázquez, 1997). Esta cepa se ha mantenido en resiembras continuas 3 veces por semana hasta la fecha. También ha sido criopreservada en nitrógeno líquido para evitar cambios y mantener sus propiedades biológicas originales.

6.2.2 Medio de Cultivo PEHPS.

Los medios de cultivo comerciales que han sido utilizados para el diagnóstico de *T. vaginalis* son el Kupferberg y el Diamond (Kupferberg et al., 1948; Schmid *et al.*, 1989; Clark and Diamond, 2002) con muy buena recuperación de células en ambos (Gelbart *et al.*, 1990). De los medios elaborados en el laboratorio tenemos el TYI y PEHPS adicionados con suero o suplemento PACSR (Mata-Cárdenas *et al.*, 1998).

Para el cultivo de la cepa de *T. vaginalis* en nuestro laboratorio de investigación decidimos usar el medio PEHPS (Saíd-Fernández *et al.*, 1988) por las siguientes características: i) sus principales componentes se producen en el laboratorio y son de origen mexicano, ii) se puede producir en grandes cantidades iii) Se pueden obtener cultivos en suspensión de 1 o de 2 litros donde la densidad de las tricomonas es de 3 a 4 veces mayor que en tubo de ensayo (Castro-Garza *et al.*; 1996). Su composición específica se describe en la Tabla I.

6.2.3 Suero Bovino.

El suero bovino se obtuvo de sangre bovina colectada del rastro municipal en la ciudad de Monterrey. La sangre se dejó coagular a 37 °C por 12 h, posteriormente se separó el coagulo del suero por centrifugación a 2,000 rpm durante 15 min. Después de este tiempo, el suero fue esterilizado usando papel Whatman No. 1 y 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 Bioscences, Lenexa, Ks) por cada litro de suero. Finalmente se distribuyó en forma estéril en lícotas de 100 mL y se almacenó en frascos de 125 mL a -20 °C hasta su uso.

TABLA IComponentes del medio PEHPS^a

Componente	g/L
Extracto de Hígado y Páncreas	250 mL
Peptona de Caseína	10
Acido Ascórbico	0.2
Cisteína	1.0
Glucosa	6.0
K ₂ HPO ₄	1.0
KH ₂ PO ₄	0.6

^aSe mezclan todos los componentes, se agrega agua hasta completar 1 L y se ajusta el pH a 7.0. Se vacía el medio en tubos de ensayo con tapón de rosca (5 mL) o en Spinners de 1 L (600 mL), se esteriliza por 20 min a 121 °C, con los tapones de los tubos o Spinners flojos, y después de esterilizar los tubos o los Spinners con el medio se deja enfriar hasta temperatura ambiente. Finalmente se adiciona suero bovino en condiciones de esterilidad hasta un volumen correspondiente al 10% del volumen total para obtener el medio PEHPS.

6.2.4 Suspensión de Eritrocitos para Ensayos de Hemólisis.

Anestesiarnos a una rata por vía intraperitoneal, con una solución de 0.063 g/ml de pentobarbital sódico de uso veterinario (Smithkline Norden, México), con jeringa desechable de 1 ml y aguja calibre No. 25 a una dosis de 3 a 5 mg/100 g de peso corporal. Con esta dosis inducimos una anestesia profunda en 10 minutos, y con una duración aproximada de una hora. Procedimos entonces a rasurar el vientre y desinfectamos el área con una solución acuosa de cloruro de benzalconio al 0.25 %. Inmediatamente después colocamos campo estéril y con tijeras realizamos laparotomía exploratoria exteriorizando y rechazando hacia la derecha las asas intestinales y de esta forma visualizar la arteria aorta descendente. Colectamos la sangre y la diluimos con un volumen igual de solución de Alsever, mediante punción aórtica con aguja calibre No.20.

Inmediatamente después del sangrado obtuvimos los eritrocitos con tres lavados de la sangre por centrifugación (9 min. a $600 \times g$ y 4°C); los dos primeros lavados se hicieron con PBS y el tercero con SSB. Después de cada centrifugación eliminamos por aspiración el sobrenadante líquido y la fracción de leucocitos depositados sobre la pastilla de eritrocitos. Fraccionamos los paquetes celulares en alícuotas de 1 ml y los almacenamos a 4°C hasta por una semana.

6.2.5 Solución Concentrada de Veneno Total de *Crotalus adamanteus*.

Se pesaron 30 mg de veneno total de *C. adamanteus* (Sigma) los cuales se disolvieron en 10 mL de amortiguador de Tris-base 0.1 M con cloruro de calcio 4 mM.

6.2.6 Solución Concentrada de Veneno Total de *Crotalus basiliscus*.

Se pesaron 6 mg de veneno total *C. basiliscus* (Sigma) los cuales se disolvieron en 0.5 mL de amortiguador de Tris-base 0.1 M con cloruro de calcio 4 mM.

6.3 Soluciones de Trabajo.

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

6.3.1 Solución Amortiguadora de Fosfatos (PBS) 10X.

Se pesaron los siguientes componentes: NaCl 80 g; KCl 2g, Na_2HPO_4 (anhidro) 14.4 g, KH_2PO_4 (anhidro) 2.4g, los cuales se disolvieron en agua destilada, se ajustó el pH a 7.4 y se completó hasta un volumen de 1000 mL. Almacenar a temperatura ambiente.

6.3.1.1 Solución Amortiguadora de Fosfatos (PBS) 1X.

La solución de trabajo se preparó diluyendo 10 mL de la solución 10X con 90 mL de agua bidestilada. Se verificó con un osmómetro que la osmolaridad fuera de 290 mOsm/Kg. Se esterilizó por filtración y se usó inmediatamente o se almacenó a -20 °C en alícuotas de 10 mL hasta su uso.

6.3.2 Cloruro de Calcio 1 M.

CaCl₂ 0.11 g. Se disolvió el componente en 1 mL de agua bidestilada y se almacenó en alícuotas de 0.1 mL a -20 °C hasta su uso.

6.3.3 Tritón X 100 al 4%.

Tritón X 100 1 mL. Se mezcló un mililitro del Tritón X 100 concentrado con 24 mL de agua bidestilada y se almacenó en alícuotas de 2.5 mL en tubos de criopreservación a -20 °C hasta su uso.

6.3.4 Tris-HCl 1 M.

Tris-HCl 3.9 g. Se disolvió el componente en 15 mL de agua miliQ y se ajustó el pH a 7.0 con NaOH 10 N. Finalmente se aforó a 25 mL con agua bidestilada y se almacenó a -20 °C, dividida en alícuotas de 2.5 mL.

6.3.5 Tris-Base 1 M.

Tris-Base 3.03 g. Se disolvió el componente en 15 mL de agua milliQ y se ajustó el pH a 8.0 y 9.0 con NaOH 10 N y HCl concentrado. Finalmente se aforó a 25 mL con agua bidestilada y se almacenó a -20 °C en alícuotas de 2.5 mL.

6.3.6 Amortiguador de Acetatos 1 M.

Se prepararon 5 mL de amortiguador de acetatos ajustados a pH 4.0, 5.0 y 6.0 (con 0.23 mL/0.06g, 0.095 mL/0.27g y 0.013 mL/0.39 g respectivamente de Ac. Acético/Acetato de Sodio en agua milliQ que se completaron al volumen indicado con agua milliQ.

6.3.7 Mezcla de Ensayo 2X para Determinar Actividad de FLA₂.

Todos los componentes se depositaron en viales Bellco de policarbonato de 1 mL (Bellco, E.U.A.). Se aforaron a 1 mL con agua bidestilada y la muestra se sonicó (Sonicador Lab-Line Instruments, Inc. Melrose Park, Ill 60160) a 40 watts por 60 s. Se deja en reposo durante 1 hora y luego puede ser utilizada ó almacenada a -20 °C hasta su uso. (Tabla II)

6.3.8 Soluciones para la Elaboración de la Columna de Afinidad.

6.3.8.1 Bicarbonato de Sodio 0.1 M.

Se pesaron 8.4 g del componente que se disolvieron en 900 mL de agua destilada, se ajustó el pH a 9.0 y se completó a 1000 mL.

6.3.9. Soluciones para Cromatografía de Afinidad.

6.3.9.1. Solución Amortiguadora con Calcio.

CaCl₂ anhidro 4 mM (0.0444 g) más 10 mL de amortiguador 1 M (Tris-HCl, Tris-Base o de Acetatos) y completar con agua milliQ a 100 mL.

TABLA II

Componentes de la mezcla de ensayo 2X

Componente	Concentración Final
[2- ¹⁴ C]-FC	44 μ Ci/mL
Cloruro de Calcio 10 mM	2 mM
Tris-HCl (10X)	200 mM
Tritón X 100 4%	0.8 %
FC 50 mM	0.2 mM
Agua desionizada	cbp

6.3.9.2 Solución Amortiguadora con Calcio y Cloruro de Sodio.

CaCl₂ 4 mM (0.0444 g), NaCl 0.5 M (1.775 g) en 10 mL de amortiguador 1 M (Tris-HCl, Tris-Base o de Acetatos) y completar con agua milliQ a 100 mL.

6.3.9.3 Amortiguador con EDTA.

EDTA 50 mM (1.86 g) en 10 mL de amortiguador 1 M (Tris-HCl, Tris-Base o de Acetatos) y completar con agua a 100 mL

6.3.9.4 Acido Acético 0.1 M.

Se tomaron 0.6 mL de ac. Acético glacial y se completó a un volumen de 100 mL con agua milliQ.

6.3.9.5 Fase Móvil.

La fase móvil se preparó a un volumen final de 15 mL y consistió en una mezcla de disolventes para lípidos polares en las proporciones indicadas en la tabla III.

TABLA III

Disolventes utilizados para la preparación de la fase móvil para la CCF^a

Disolventes	Volumen (mL)
Cloroformo	10.5
Metanol	2.5
Acido Acético	1.0
Agua milliQ	0.5

^aLos volúmenes se indican para la preparación de 15 mL de fase móvil en cubas para placas cromatográficas de 10 x 10 cm.

6.3.10 Soluciones para la Digestión con Tripsina.

6.3.10.1 Bicarbonato de Amonio 1 M.

Se pesaron 79.1 mg de NH_4HCO_3 que se añadieron a 1 mL de agua milliQ y se guardó en refrigeración hasta su uso.

6.3.10.2 Bicarbonato de Amonio 100 mM.

Se tomaron 100 μL de la solución de NH_4HCO_3 1M y se le añadieron 900 μL de agua milliQ y se guardó en refrigeración hasta su uso.

6.3.10.3 Ditiotreitól 200 mM en Bicarbonato de amonio 100 mM.

Se pesaron 30.86 mg de DTT se agregaron a una 1 mL de NH_4HCO_3 100 mM y se guardó en refrigeración hasta su uso.

6.3.10.4 Yodoacetamida 1M en Bicarbonato de amonio 100 mM.

Se pesaron 37 mg de yodoacetamida que se añadieron a 200 μL de NH_4HCO_3 100 mM y se guardó en refrigeración hasta su uso.

6.3.10.5 Tripsina.

100 μg de Tripsina (Gold Mass-Spec Grade, promega) se disolvieron con 100 μL de ácido acético 50 mM obteniendo una solución de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Se dividió en alícuotas y se almacenó a $-70\text{ }^\circ\text{C}$.

6.3.11 Soluciones para la Electroforesis en Gel de Poliacrilamida con SDS.

6.3.11.1 Poliacrilamida 30%.

Se pesaron 50 g de acrilamida y 1.32 g de bis-acrilamida. Se disolvieron en 165 mL de agua milliQ y se guardó en refrigeración hasta su uso.

6.3.11.2 Dodecil Sulfato Sódico 10 %.

Se pesaron 5 g de SDS y se añadieron a 50 mL de agua milliQ y se guardó en refrigeración hasta su uso.

6.3.11.3 Amortiguador de Gel Concentrador 0.5 M.

Se pesaron 6.06 g de Tris-HCl y se disolvieron en 80 mL de agua milliQ. A esta solución se le agregaron 4 mL de SDS al 10% y se ajustó el pH a 6.8. Completar la solución con agua milliQ hasta un volumen de 100 mL y se guardó en refrigeración hasta su uso

6.3.11.4 Amortiguador de Gel Separador 1.5 M.

Se pesaron 18.17 g de Tris-HCl y se disolvieron en 80 mL de agua milliQ. A esta solución se le añadieron 4 mL de SDS al 10% y se ajustó el pH a 8.8. Completar la solución con agua milliQ hasta un volumen de 100 mL y se guardó en refrigeración hasta su uso.

6.3.11.5 Amortiguador de Corrimiento.

Se pesaron 1.52 g de Tris-HCl y 7.21 g de Glicina los cuales se disolvieron en 450 mL de agua milliQ. Luego se le añadieron 5 mL de SDS 10% y se ajustó el pH a 8.6.

Completar con agua hasta un volumen de 500 mL y se guardó en refrigeración hasta su uso.

6.3.11.6 Amortiguador de Muestra.

En un tubo cónico de 15 mL con tapón de rosca se mezclaron los siguientes componentes: 1.25 mL de amortiguador de concentración, 100 μ L de SDS 10%, 1 mL de glicerol y 400 μ L de azul de bromofenol al 0.05% y se guardó en refrigeración hasta su uso.

6.3.11.7 Persulfato de Amonio al 10%.

Disolver 100 mg de persulfato de amonio ((NH₄)₂S₂O₈) en 1 mL de agua milliQ. Esta solución debe prepararse al momento de usarse.

6.3.12 Soluciones para Actividad Hemolítica.

6.3.12.1 Solución Salina Balanceada de Hank 1 M (SSB).

Se pesaron los siguientes componentes: CaCl₂ 0.175 g; Glucosa 1.0 g; NaCl 7.2 g; KCl 0.4 g; MgSO₄ 0.2 g; Tris-base 0.12 g. Se mezclaron y disolvieron todos los componentes en agua bidestilada estéril y se ajustó el pH a 8.0 con NaOH 10 N. La solución se aforó a 100 mL y se distribuyó en alícuotas de 10 mL en tubos de 13 x 150 mm con tapón de rosca. Por último se esterilizaron por filtración y se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

6.3.12.2 Solución de Alsever.

Se pesaron los siguientes componentes: glucosa 2.05 g, cloruro sódico, 0.42 g, citrato sódico 0.8 g y ácido cítrico, 0.055 g los cuales se disolvieron en agua destilada y se completó a 100 mL.

6.3.13 Soluciones para la Tinción con Plata.

6.3.13.1 Solución de Metanol al 50% y Ácido Acético al 12%.

Se añadieron 50 mL de metanol y 12 mL de ácido acético a una probeta y se completó el volumen con agua bidestilada a 100 mL. Guardar en refrigeración.

6.3.13.2 Solución de Etanol al 10% y Ácido Acético al 5%.

Se añadieron 10 mL de etanol absoluto y 5 mL de ácido acético a una probeta y se completó a 100 mL con agua bidestilada. Guardar en refrigeración.

6.3.13.3 Dicromato de Potasio 0.0034 M en Ácido Nítrico 0.0032 N.

Se pesaron 0.1 g de dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) que se añadieron a una solución con 0.288 mL de ácido nítrico (HNO_3) al 70% en agua bidestilada hasta completar un volumen final de 100 mL. Guardar en frasco ámbar y en refrigeración.

6.3.13.4 Solución de Nitrato de Plata 0.012 M.

Se pesaron 0.2030 g de nitrato de plata ($AgNO_3$) y se disolvieron en 100 mL de agua bidestilada. Almacenar en frasco oscuro y a temperatura ambiente.

6.3.13.5 Solución de Carbonato de Sodio 0.28 M y Formaldehído al 0.05%.

Se pesaron 2.968 g de carbonato de sodio (Na_2CO_3) y se añadieron a 10 mL de agua bidestilada. A esta solución se le agregaron 0.5 mL de formaldehído al 10% y se completó con agua hasta 100 mL. Guardar a temperatura ambiente.

6.3.14 Soluciones para el Análisis por CLAR/EM en tándem.

6.3.14.1 Fase Móvil Acuosa.

Se preparó acetonitrilo al 1% en agua Mili-Q con 0.1% de ácido fórmico. Se colocó en el reservorio A.

6.3.14.2 Fase Móvil Orgánica.

Se preparó acetonitrilo al 80% en agua Mili-Q con 0.1% de ácido fórmico. Se colocó en el reservorio B.

6.3.14.3 Solución de Acetonitrilo al 100%.

El acetonitrilo al 100% lo filtramos a vacío empleando filtros HA (poros 0.45 μM). Se colocó en el reservorio A. Esto constituyó la fase orgánica.

6.3.14.4 Solución de Ácido Trifluoroacético al 1%.

Adicionamos 10 mL de TFA a 900 mL de Agua Mili-Q y aforamos a 1000 mL empleando un matraz volumétrico. Dicha solución la filtramos a vacío empleando filtros HA (poros 0.45 μM). Colocamos en el reservorio B. Esto constituyó la fase acuosa.

6.3.14.5 Leucina-Encefalina.

6.3.14.5.1 Solución Stock. Para obtener una solución de 250 ng/ μL , se disolvieron 25 mg en 100 mL 50/50 MeOH/Agua con 1% de ácido fórmico.

6.3.14.5.2 Solución Spec. Para obtener una solución de 2ng/ μL se tomaron 800 μL del stock y se añadieron a 40 mL de MeOH/Agua con 1% de ácido fórmico.

7. MÉTODOS

7.1 Cultivo Axénico de *T. vaginalis*.

7.1.2 Descongelación de la Cepa de *T. vaginalis* GT-15.

Se descongeló un criotubo de *T. vaginalis* GT-15 a 37 °C en baño de agua con temperatura controlada. Una vez descongeladas las tricomonas se transfirieron en forma aséptica a tubos con 5.5 mL de medio PEHPS y se incubaron por 24 h. Pasado este tiempo se retiró el medio de los tubos junto con las tricomonas muertas (no pegadas al tubo) y se les agregó 5.5 mL de medio completo PEHPS.

7.1.3 Mantenimiento de la Cepa.

La cepa GT-15 de *T. vaginalis* se mantuvo a 3 tubos por vez: del mejor se inocularon 5×10^3 trofozoítos por mL a tres nuevos tubos con medio nuevo PEHPS. Se conservaron los tubos de la penúltima resiembra hasta comprobado el crecimiento de las tricomonas y la ausencia de contaminación en los cultivos recién sembrados. Esto se hizo tres veces por semana.

7.1.4 Resiembra y Cosecha.

La cepa de *T. vaginalis* GT-15 se mantuvo a 36.5 °C en una incubadora (Telcho, Laboratory Incubator. Precision Scientific, EUA). Antes de cada resiembra se revisaron los tubos en el microscopio invertido (Biovert, Reichert, Austria) para comprobar el buen aspecto morfológico y la movilidad de los trofozoítos. Después los tubos se

sumergieron en agua-hielo por 10 min, se agitaron suavemente y se les 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 tricomonas en tubos (para el mantenimiento de la cepa y curvas de crecimiento) o en Spinners (cultivos masivos de 600 mL) que contenían medio PEHPS. Para la cosecha se obtuvieron los trofozoítos tanto de los tubos como de los Spinners en suspensión mediante enfriamiento de los cultivos en agua-hielo durante 30 min y su posterior centrifugación a 4000 x g durante 20 min a 4 °C en una centrífuga DPR, 6000 Damon/IEC. Se obtuvieron los trofozoítos en el precipitado de cada centrifugación y se lavaron con PBS dos veces.

7.2 Curva de Crecimiento de *T. vaginalis*

Se prepararon 15 tubos de ensayo de 13 x 100 mm (Bellco, Glass, Inc. N.Y. EUA) con tapón de rosca con 5.5 mL de medio PEHPS. Se inoculó cada tubo con 5×10^3 trofozoítos/mL a partir de los tubos de resiembra y se incubaron a 36.5 °C. Cada 24 horas se tomaron 3 tubos y se colocaron en agua-hielo durante 10 min, después de este tiempo, se tomaron 0.1 mL de cada tubo y se mezclaron con 0.9 mL de formalina al 10% para fijar a los trofozoítos y contarlos en cámara de Neubauer para obtener el número de trofozoítos por mililitro. Este procedimiento se repitió durante 5 días.

7.3 Cultivo Masivo de *T. vaginalis*.

En Spinners con capacidad de 1 L que contenían 672 mL de medio PEHPS se inocularon 5×10^3 trofozoítos/mL a partir de tubos de resiembra. Los Spinners se agitaron suavemente durante 5 min y se incubaron a 36.5 °C durante el tiempo necesario (de 48 a 72 hrs).

7.3.1 Medio de Cultivo Usado de *T. vaginalis*.

Se prepararon Spinners con 672 mL de medio PEHPS que se inocularon con 5000 trofozoítos/mL de *T. vaginalis* y se incubaron a 36.5 °C el tiempo requerido. 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. Nalge) y se centrifugó a 4°C durante 20 min a 4000 x g. Se separó el medio de la fracción sedimentada y se pasó por membranas de filtración de 0.22 µm. Se ajustó el pH con NaCl o HCl según el caso y se alicuotó y almacenó a -70°C hasta su uso.

7.4 Obtención de Fracciones Subcelulares.

Los trofozoítos se cosecharon de los Spinners como se describió en la sección 7.1.4. En la Figura 2 se esquematiza el método de sedimentación fraccionada que se utilizó para obtener las fracciones subcelulares de *T. vaginalis*.

7.4.1 Fracción Subcelular S30 de *T. vaginalis*.

Se prepararon Spinners (borosilicato, Corning Co., Alemania) con 672 mL de medio PEHPS que se inocularon con 5000 trofozoítos/mL de *T. vaginalis* y se incubaron a 36.5 °C el tiempo requerido. Una vez pasado este tiempo se colocaron en agua-hielo 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 y se centrifugó a 4 °C durante 20 min a 4000 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 4000 x g durante 20 min. Realizamos 2 lavados con un volumen de amortiguador (Tris, o de acetatos) y eliminamos el medio sobrenadante con extracción al vacío. Tomamos el sedimento con 2 volúmenes de amortiguador y lo homogenizamos con ayuda de un homogenizador tipo

Elvehjem Potter. Lisamos las células con 40 golpes en 4 intervalos de 10 golpes cada uno, y con descansos de 2 min en hielo. De esta manera obtuvimos un extracto total (ET) que distribuimos en viales de 1.5 mL y centrifugamos a 30 000 x g, durante 30 min a 4 °C. Separamos el sobrenadante, lo homogenizamos, realizamos alícuotas y las identificamos como S30 y con la fecha de extracción. Determinamos la concentración de proteína total por absorbancia a 280 nm y las guardamos a -70 °C hasta su uso.(Figura 2)

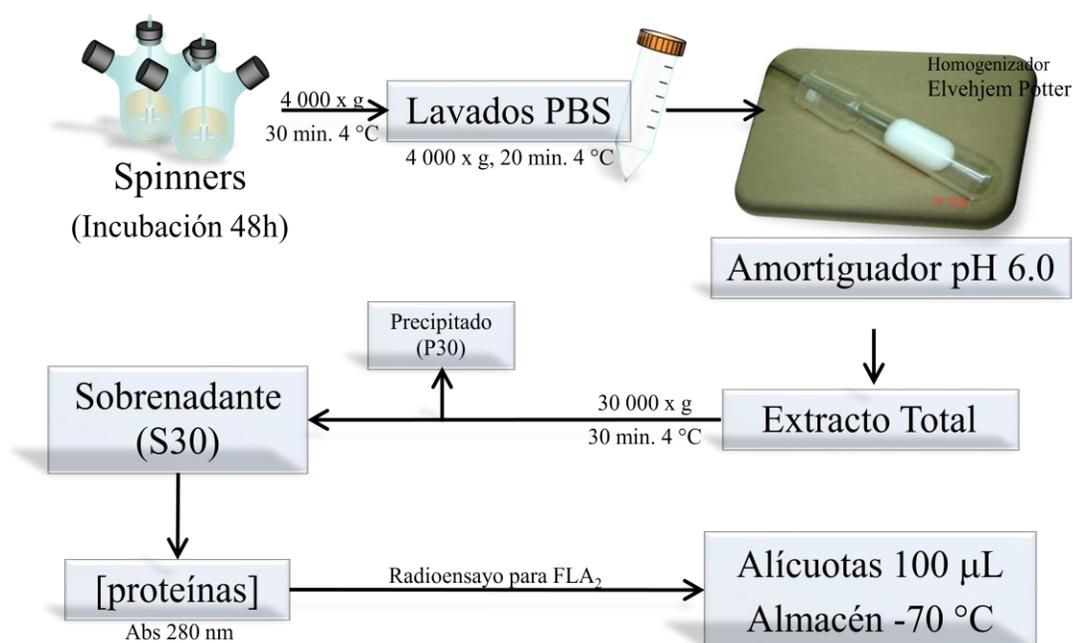


Figura 2. Esquema del procedimiento para la obtención de la fracción S30 a partir de los cultivos masivos de *T. vaginalis*.

7.4.2 Fracciones Ultrafiltradas por Membranas de Corte.

Utilizamos membranas de corte de 5, 30, 50 y 100 KDa (Ultracel, Low binding protein, Millipore) las cuales nos permitieron ultrafiltrar aproximadamente 0.4 mL de muestra por cada ciclo de centrifugación (5000 r.p.m.). Obtuvimos una fracción

ultrafiltrada (FUF) y una fracción retenida (FR) que resuspendimos y diluimos en un volumen de amortiguador para su análisis de absorbancia a 280 nm y actividad de FLA₂. De éstas, realizamos alícuotas de 100 µL y las almacenamos a -70 °C hasta su uso.

7.5 Cuantificación de Proteínas Totales.

Se determinó la concentración de proteínas en muestras biológicas mediante lectura de absorbancia a 280 nm.

7.6 Detección de la Actividad de Fosfolipasa A.

7.6.1 Método de Radioensayo.

La detección, cuantificación y rastreo de la actividad fosfolipásica la hicimos por el método de radioensayo establecido en el laboratorio de Bioquímica y Fisiología Celular de la División de Biología Celular y Molecular en el Centro de Investigación Biomédica del Noreste IMSS, descrita para muestras solubles o particuladas por Vargas-Villarreal *et al.*, (1995). El uso de radioactividad en el marcaje de los fosfoglicéridos es un método altamente sensible puesto que nos permite la detección de una sola molécula producida por la hidrólisis por efecto de la FLA₂ (Muma y Rowell, 1985).

En tubos de 7 x 75 mm (borosilicato, Bellco, Glass Inc. N.Y. EUA), se combinan 10 µL de una mezcla de ensayo 2X y 10 µL de la fracción a ensayar. Se agitaron los tubos en vórtex por 30 s y se incubaron a 36.5 °C en cámara húmeda. Después de incubados, se colocaron en agua-hielo mientras la mezcla se adicionaba en la placa de cromatografía. Los lípidos de cada muestra se separaron mediante cromatografía en capa fina (Vargas-Villarreal *et al.*, 1995).

Cuando fue necesario, las mezclas de reacción se prepararon a un volumen total de 40 µL manteniendo la proporción 1:1 entre muestra y mezcla de ensayo.

7.6.2 Cromatografía en Capa Fina.

Se utilizaron placas cromatográficas de Sílica Gel No. 60 con dimensiones de 20 x 20 cm, y un grosor de placa de 0.25 mm, las cuales se cortaron a 10 x 10 cm con un cortador de vidrio. Se aplicó cada muestra gota a gota con una jeringa Hamilton de 50 μL a una distancia de 1 cm del borde inferior de las cromatoplasas y entre ellas. Las muestras se secaron por calentamiento con aire de un secador de pelo industrial.

Las cámaras cromatográficas se cargaron con la fase móvil (cloroformo:metanol:ác. acético: agua 140:40:16:8 v/v) y se dejaron saturar por 20 minutos a temperatura ambiente, selladas herméticamente. Las placas con las muestras se colocaron en posición vertical dentro de las cámaras y se dejó ascender la fase móvil hasta un centímetro antes del borde superior de las cromatoplasas. Se retiraron las placas de las cámaras y se secaron con aire caliente.

La visualización de las manchas lipídicas en las cromatoplasas se hizo al depositarlas en una cámara saturada con vapores de yodo, en donde cada fracción lipídica se observó como una mancha color café-amarillento sobre un fondo blanco (Skispy and Barclay, 1969). Se obtuvo el coeficiente de reparto (R_f) para cada fracción: el cociente entre el recorrido de la fracción (l_s) y el de la fase móvil (l_m).

$$R_f = \frac{l_s \text{ (cm)}}{l_m \text{ (cm)}}$$

Ecuación para el cálculo del coeficiente de reparto (R_f).

Para ello, se utilizaron estándares del sustrato (FC) y los productos de hidrólisis (AGL y LFC). Una vez localizadas las manchas lipídicas, se delimitó y raspó la sílica gel de cada una de ellas y se depositaron en viales de centelleo de 20 mL a los que se les agregó 5 mL de un coctel de centelleo (BCS, Amersham, E.U.A.) y se determinó el número de DPM en un contador de centelleo líquido (Beckman Instrument Inc. Modelo LS 9,800 Irvin, California. EUA) para una eficiencia de 96% para carbono 14 (^{14}C).

Todas las determinaciones se realizaron tres veces, y por triplicado, y se presentaron como la media \pm 1 DE. La actividad específica de FLA₂ fue definida arbitrariamente como pmol de FC hidrolizada/mg de proteína total/h.

7.7 Curva Temporal de Actividad de FLA₂.

A tiempos variables de incubación a 36.5 °C (entre 0 y 120 min), se determinó la radioactividad presente en las manchas de las cromatoplasmas eluidas correspondientes a los productos de hidrólisis ([2-¹⁴C]-AGL). Se hizo la cuantificación de la radioactividad como se describió en la sección 7.6.

7.8 Curva Dosis-Respuesta de Actividad de FLA₂.

Se determinó la actividad de FLA₂ en las diversas muestras añadiendo 10 μ L de la mezcla de ensayo 2X ([2-¹⁴C]-FC) y 10 μ L de cantidades variables de la muestra a ensayar. Las mezclas se incubaron a 36.5 °C por 2 hrs y se determinaron las DPM de las zonas correspondientes a [2-¹⁴C]-AGL.

7.9 Determinación del Efecto del pH sobre la Actividad de FLA₂.

Para el ensayo de las actividades enzimáticas de las muestras a diferentes pH se emplearon 10 μ L de la mezcla de ensayo 2X ([¹⁴C]-FC) y 10 μ L de cada fracción a ensayar (122 ng de proteína total). El pH de las mezclas se ajustó a 4.0, 5.0 y 6.0 con amortiguador de acetatos y a 7.0, 8.0 y 9.0 con Tris-base.

7.10 Determinación del Efecto del Calcio sobre la Actividad de FLA₂.

Se incubaron por 120 min 10 μ L de las muestras a ensayar con 10 μ L de las mezclas de ensayo 2X con [2-¹⁴C]-FC con concentraciones de 0 a 3 mM de cloruro de calcio. Las

actividades de FLA₂ se determinaron frente a su sustrato específico por el método de radioensayo previamente descrito.

7.11 Actividad Hemolítica de la FLA₂ Aislada.

Para ensayar la actividad hemolítica directa de la FLA₂ se prepararon mezclas de reacción en tubos de 1.5 mL de polipropileno (Sigma) con 25 µL de una suspensión de eritrocitos de rata (Sprague-Dowley) ajustada a pH 6.0 que se mezcló con 25 µL de la muestra. Además de esto, se prepararon mezclas con 25 µL de agua milliQ y 25 µL de amortiguador de acetatos a pH 6.0 las cuales se usaron como 100% y 0% de hemólisis respectivamente. Una vez incubadas en las condiciones experimentales se agregó 1 mL de PBS (pH 7.4), se centrifugaron los tubos a 600 x g, 5 min a 4 °C y se midió la absorbancia a 415 nm en un espectrofotómetro. (PMQ III, ZEISS, Alemania). La actividad se expresó como el porcentaje de hemólisis con respecto a los controles.

7.11.1 Curva Temporal de Hemólisis.

Para el ensayo de hemólisis en el tiempo se prepararon las mezclas de reacción con 30 µg de muestra las cuales se incubaron en lapsos de 15 min hasta 1 hora a 36.5 °C. Pasado este tiempo se añadió 1 mL de PBS y se centrifugaron para determinar su absorbancia según las condiciones descritas previamente. Se realizaron 3 experimentos por triplicado para cada una de las condiciones experimentales descritas.

7.11.2 Curva Dosis-Respuesta de Hemólisis.

Para ensayar la actividad hemolítica de la FLA₂ con respecto a la dosis de proteína se prepararon mezclas de reacción con cantidades variables de proteína que iban desde 0 hasta 30 µg. Se incubaron durante 1 hora y pasado este tiempo se determinó la absorbancia como se describió en la sección 7.11.2.

7.11.3 Efecto del IR sobre la Actividad Hemolítica.

Para determinar si había una disminución del efecto hemolítico de la FLA₂ en presencia de un inhibidor específico de FLA como es el IR, se preincubó a la muestra de 25 μ L conteniendo 25 μ g de proteína, con diferentes concentraciones del IR (0- 120 μ M) durante 30 min a 36.5 °C y en presencia de CaCl₂ 1 mM. Transcurrido este tiempo se adicionaron 25 μ L de la suspensión de eritrocitos de rata y se incubó durante 1 h, a 36.5 °C. para posteriormente añadirle 1 mL de PBS, centrifugarla y leer absorbancia a 415 nm como se describió previamente.

7.12 Digestión con Tripsina.

Para la obtención de secuencias peptídicas de nuestra FLA₂ aislada, en un vial de polipropileno de 0.5 mL se colocaron 95 μ L de la fracción de EDTA con actividad de FLA₂ y se mezcló con 5 μ L de bicarbonato de sodio (NH₄HCO₃) 1 N para un volumen final de 100 μ L. Esta mezcla se sometió a digestión siguiendo el método descrito a continuación:

- A) *Reducción de disulfuros.* Añadimos 5 μ L de ditioneitol (DTT) 200 mM en bicarbonato de amonio 100 mM a los 100 μ L de muestra. Aseguramos con parafilm la tapa del vial y lo calentamos por 10 minutos en baño de agua. Pasado este tiempo, se le dió un spin rápido y se dejó reposar por 1 h a temperatura ambiente.
- B) *Alquilación de sulfhidrilos.* Para alquilar la muestra añadimos 4 μ L de yodoacetamida 1M en bicarbonato de amonio 100 mM a nuestra muestra ya reducida y la agitamos en vórtex, le dimos un spin rápido y la dejamos en reposo durante 1 h en oscuridad y a temperatura ambiente.

C) *Paro de la alquilación.* Para neutralizar la yodoacetamida remanente se adicionaron 20 μL de la solución de DTT, se agitó en vortex, se le dio un spin rápido y se incubó a temperatura ambiente durante 1 h.

D) *Digestión con tripsina.* Se añadió la tripsina necesaria según la cantidad de proteína presente en la muestra en una proporción de 1:50 (proteasa:proteína); se agitó en vortex, se le dio un spin rápido y se incubó durante 8 hrs a 36.5 °C.

7.13 Electroforesis en Gel de Poliacrilamida en presencia de SDS.

Para la electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS se siguió el método descrito previamente por Laemmli (1976).

Gel Separador al 12%. Se mezclaron los siguientes componentes para una mezcla final de 5 mL: 1.365 mL de agua milliQ, 2 mL de poliacrilamida al 30%, 1.25 mL de Tris-HCl 1.5 M pH 8.8, 0.05 mL de SDS al 10%, 0.333 de persulfato de amonio al 1.5% y 2 μL de N`N`N`N`-Tetramethyl-ethylenediamine (TEMED). Se agitó suavemente la mezcla y se colocó entre los vidrios portageles previamente montados con la ayuda de una pipeta pasteur.

Gel Concentrador al 4%. Se mezclaron los siguientes componentes para una mezcla final de 1 mL: 0.54 mL de agua milliQ, 0.133 de poliacrilamida al 30%, 0.250 mL de Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, 0.01 mL de SDS al 10%, 0.066 de persulfato de amonio al 1.5% y 2 μL de TEMED. Se agitó suavemente la mezcla y se vació con pipeta pasteur sobre el gel separador ya polimerizado.

Una vez elaborado el gel realizamos la corrida el mismo día. Para ello, colocamos 15 μL de cada muestra con jugo azul en el gel con ayuda de una jeringa Hamilton de 20 μL . En cada corrida se utilizaron 2 μL de un marcador de peso molecular (Sigma) con rango entre 9 y 241 KDa. Se corrió a 50 V para el gel de concentración y se incrementó a 100 V para la separación que duró alrededor de 2 hrs.

7.14 Tinción con Plata.

Para el revelado del gel de poliacrilamida utilizamos la técnica de tinción con plata descrita por Merrill *et al.*, (1980) el cual se describe brevemente a continuación:

- A) En una caja Petri de 120 x 20 mm añadimos 100 mL de la solución de metanol al 50% y ácido acético al 12% y colocamos el gel de poliacrilamida con las muestras y lo incubamos durante 20 minutos en agitación suave.
- B) Eliminamos la solución anterior e hicimos 3 lavados de 10 min cada uno con 100 mL de la solución de etanol al 10% y ácido acético al 5%.
- C) Dos lavados con agua desionizada.
- D) Añadimos 100 mL de dicromato de potasio 0.0034 M en ácido nítrico 0.0032 N e incubamos durante 5 min. en agitación suave.
- E) Cuatro lavados con agua desionizada, de 30 segundos cada uno.
- F) Agregamos 100 mL de nitrato de plata 0.012 M e incubamos durante 30 min, en agitación suave.
- G) Dos lavados con agua desionizada.
- H) Tres lavados con carbonato de sodio 0.28 M en formaldehído al 0.05% de 1 minuto los primeros dos y el tiempo que sea necesario en el tercero para visualizar las manchas de proteínas.
- I) Paramos la tinción colocando el gel en una solución de ácido acético al 1%, durante 10 minutos.

7.15 Elaboración de la Columna de Afinidad.

Para la elaboración de la columna de afinidad seguimos el protocolo descrito previamente por Vargas-Villarreal *et al.* (1991).

- A) Pesamos 2.5 g de Sefarosa 4B activada con bromuro de cianógeno (Porath *et al.*, Sigma).
- B) Lavamos con 200 mL de bicarbonato de sodio 0.1 M ajustado a pH 9.0 en embudo Buschner.
- C) Agregamos 10 mL de NaHCO₃ 0.1 M pH 9.0 y 131.2 mg de ácido aminocaproico.
- D) Agitamos durante 48 h a temperatura ambiente.
- E) Lavamos con 100 mL bicarbonato de sodio 0.1 M pH 9.0 en Buschner.
- F) Lavado con 100 mL de agua milliQ.
- G) Lavado con 250 mL de dioxano.
- H) Añadimos 10 mL de dioxano y 206 mg de N,N'-diciclohexilcarbodiimida.
- I) Agitamos 20 min a temperatura ambiente.
- J) Añadimos 80 mg de inhibidor de Rosenthal en 10 mL de una mezcla 1:1 de dioxano-cloroformo y se continúa con la agitación.
- K) Añadimos 49 mg de 4-dimetilaminopiridina en 1 mL de dioxano.
- L) Agitamos durante 24 hrs a temperatura ambiente.
- M) Lavado con 50 mL de isopropanol.
- N) Lavado con 50 mL de cloroformo.
- O) Repetir pasos 13 y 14 dos veces más.
- P) Dejar en agua milliQ en refrigeración o añadir 30% de metanol si es que se va a almacenar a largo plazo.

7.16 Cromatografía de Afinidad.

7.16.1 Preparación de la Columna para Cromatografía de Afinidad.

- A) Añadimos 3 mL de la sefarosa preparada con el IR en una minicolumna (Corning, Sigma) y la lavamos con 50 mL de agua milliQ para su empaque.
- B) Equilibramos la columna con 50 mL del amortiguador con cloruro de calcio 4 mM en el que será introducida la muestra.
- C) Introdujimos la muestra disuelta en amortiguador (de acetatos o Tris 0.1 M) con calcio 4 mM y lavamos con el mismo amortiguador hasta un volumen máximo de 15 mL.
- D) Elución con 10 mL de amortiguador (de acetatos o tris 0.1 M) con cloruro de sodio 0.5 M y cloruro de calcio 4 mM.
- E) Elución con amortiguador con EDTA 50 mM.
- F) Elución con ácido acético 0.1 M y recolección de las fracciones eluidas en tubos con 1 mL de amortiguador (de acetatos o tris 1 M).

7.17 Análisis por Espectrometría de Masas en Tándem Acoplado a Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.

Todas las fracciones que se analizaron directamente en el espectrómetro de masas se prepararon previamente como soluciones en bicarbonato de amonio 100 mM. Para ello, tomamos un volumen de 95 μL de la muestra a analizar y la mezclamos con 5 μL de una solución de bicarbonato de amonio 1 M.

Tomamos todo el volumen con la jeringa de inyección del espectrofotómetro y lo programamos para el análisis de volúmenes de 5 μL cada uno, realizando por lo menos 3 análisis de proteínas por muestra.

7.17.1 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.

La fracción III (EDTA) concentrada la separamos mediante CLAR, con cromatógrafo (Waters Corporation) equipado con un controlador modelo 600, un inyector 717 plus, un detector de fotodiodos 996 y un degasificador de solventes Degassit. Los registros se analizaron en un procesador Dell Optiplex gX1 equipado con el software para cromatogramas Waters Millenium 32. Aplicamos la técnica de fase reversa, utilizando una columna modelo Symetry C18 (Waters, Milford, MA, USA) (3.9× 150 mm y PAA 5µm) y un guarda columna modelo Sentry 18(Waters).

Como fase móvil utilizamos un gradiente de concentración preparado a partir de ácido Trifluoroacético (TFA) y acetonitrilo, ambos grado CLAR. El flujo se mantuvo constante a 1mL/min.

La columna se mantuvo a una temperatura de 50 °C y la muestra a 4 °C. Como fase móvil se utilizó un gradiente de concentración preparado a partir de acetonitrilo, grado CLAR. El flujo se mantuvo constante a 0.2 mL/min y se utilizó un volumen de inyección de 15 µL.

7.17.2 Espectrometría de Masas.

Todos los análisis se realizaron en un espectrómetro de masas Micromass QTOF Micro, Waters.

7.17.2.1 Condiciones de calibración.

El espectrómetro de masas se calibró con la solución spec de leucina encefalina, con la cual se llevó a cabo el cálculo de los parámetros de resolución y el ajuste del valor del punto de calibración inicial (Lteff).

Para la calibración de un solo punto, se utilizó la solución spec del GFP. El ion doblemente cargado $[(M+2H)2+]$ con valor de masa exacta de 785 Da se liberó a través del sprayer de referencia de la fuente NanoLockSpray.

Voltaje del capilar: 3500 V

Voltaje del cono de extracción: 2 V

Voltaje de extracción de la muestra: 35 V

Temperatura de desolvatación: 350 °C

7.17.3 Secuenciación.

Para la secuenciación se utilizó la técnica de CLAR acoplada a espectrometría de masas. Los datos se adquirieron con columna C18 (2.1 × 150 mm y PAA 3 μ m), mediante fase reversa. La espectrometría de masas se realizó utilizando la interfase ESI en modo positivo, el equipo híbrido cuadrupolar-tiempo de vuelo (modelo QTOF-micro, Waters) acoplado al sistema de CLAR (Waters Alliance 2695), ambos controlados por el software MassLynx (v4.0). La información fue procesada con el software ProteinLynx global Server, version 2.2, el cual utiliza la base de datos Swissprot-MASCOT.

El método cromatográfico y de detección fueron optimizados utilizando albúmina sérica bovina y la mezcla estándar de FLA₂ de *Crotalus adamanteus*. Los experimentos fueron realizados por triplicado bajo las siguientes condiciones.

7.17.4 Análisis de Resultados.

Software para resolver e interpretar los resultados de espectrómetro de masas AutoMod-Query y el de Novo-Query.

8. RESULTADOS

8.1. Preparación y Evaluación de la Columna de Afinidad de Sefarosa-4B Activada con Bromuro de Cianógeno y el IR como Ligando frente a FLA₂ Conocidas.

El aislamiento de FLA₂ solubles principalmente a partir de venenos de serpientes y algunos insectos ha permitido su caracterización bioquímica y fisicoquímica debido a que estas actividades se encuentran en altas concentraciones al grado de que pueden ser detectadas incluso en el rango de los picomoles de proteína (Perumal Samy *et al.*, 2007.). Se ha encontrado que estas proteínas generalmente tienen su contraparte idéntica en humanos y otros organismos de importancia, y es por ello que las características ya estudiadas pueden ser aplicadas de igual manera a otras FLA₂. En nuestro caso particular, son pocos los antecedentes del aislamiento a homogeneidad de una FLA₂ a partir de protozoarios, sin embargo, se ha confirmado que su comportamiento bioquímico es el mismo que las ampliamente estudiadas procedentes de venenos de serpientes, insectos y tejidos humanos.

Vargas-Villarreal y colaboradores en 1998 realizaron el aislamiento de una FLA₂ a partir de una fracción subcelular de *Entamoeba histolytica*. utilizando una columna de afinidad que permitió su retención y elución específica posterior mediante secuestro del calcio necesario para la interacción entre la FLA₂ y el ligando IR (Vargas-Villarreal *et al.*, 1991). Tomando en cuenta que el material biológico de *Trichomonas* es restringido optamos por usar controles para poder optimizar el uso de la columna de afinidad como son los venenos de serpientes, cuyas características son ampliamente conocidas y reportadas en artículos de investigación (Perumal Samy, 2007; Vargas-Villarreal, 1991).

8.2 Aislamiento de dos FLA₂ Conocidas a partir de Venenos de Serpientes mediante Cromatografía de Afinidad.

Crotalus basiliscus y *C. adamanteus* son serpientes de importancia sanitaria en México, y su veneno ha sido fuente de estudio de múltiples actividades biológicas, entre ellas la de FLA₂ (Heinrikson *et al.*, 1977; de Roodt *et al.*, 2005); por otro lado, existen antecedentes de la purificación de FLA₂ directamente de las muestras utilizando este tipo de columnas de afinidad, por ello, usamos estos venenos para evaluar el funcionamiento de nuestra columna de afinidad para lo cual cuantificamos la proteína total (PT) y la actividad de FLA₂ en cada una de las fracciones de cromatografía obtenidas en viales con 1 mL de volumen eluído (Fig. 3).

TABLA IV

Recuperación de proteínas y actividad fosfolipásica de la columna de afinidad del veneno de *C. basiliscus*

Fracción	Volumen (mL)	Proteína Total (mg)	Actividad Total (U)	Act. Específica (U/mg)	Recuperación (%)	Factor de Purificación
VT	3.34	4.0	1 284 000	321 000	100	1
NaCl	3.0	0.0297	32 952	1 109 500	3	3
EDTA	2.0	0.2878	176 565	613 500	14	2
Acido acético	1.0	0.014	2 954	211 000	0	1

TABLA V

Recuperación de proteínas y actividad fosfolipásica de la columna de afinidad del veneno de *C. adamanteus*

Fracción	Volumen (mL)	Proteína Total (mg)	Actividad Total (U)	Act. Específica (U/mg)	Recuperación (%)	Factor de Purificación
VT	10	29.88	12 848 750	430 012	100	1
NaCl	2.0	3.4398	1 424 024	413 984	11	1
EDTA	2.0	0.0464	401 160	8 645 690	3	20
Acido acético	1.0	0.0311	180 288	5 797 026	1	13

U = 1 pmol de FC hidrolizada por la FLA₂. % Recuperación = Actividad Total posterior a la purificación x 100/ Actividad Total previa a la purificación. Factor de Purificación = Act. Específica posterior a la purificación/Act. Específica previa a la purificación.

Los ensayos realizados con ambos venenos nos permitieron purificar la FLA₂ de manera específica, aun cuando el porcentaje de recuperación para ambos venenos fue algo bajo (14 y 3% para *C. basiliscus* y *C. adamanteus* respectivamente).

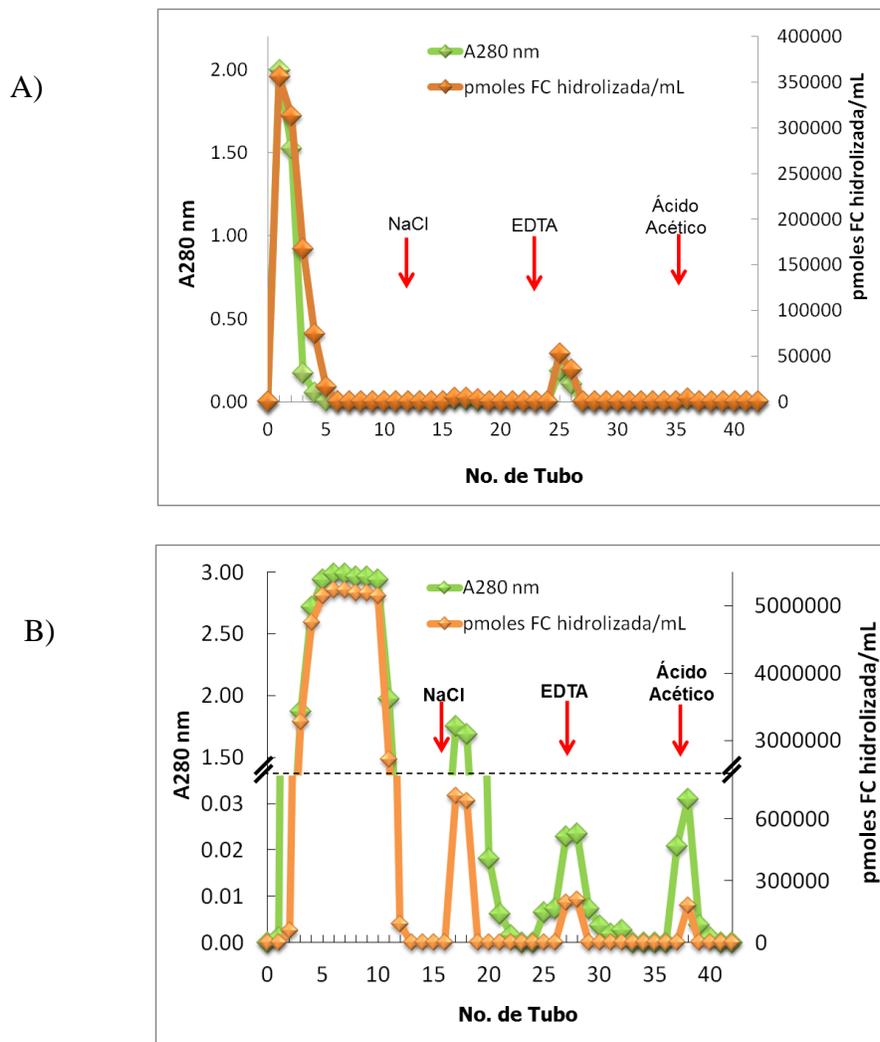


Figura 3. Cromatografía de afinidad del veneno total de *Crotalus basiliscus* y *C. adamanteus*. Se preparó una solución con 6 mg del veneno total de *C. basiliscus* (A) y 30 mg del veneno total de *C. adamanteus* (B) en 0.5 y 10 mL respectivamente de amortiguador Tris-base 0.1 M con CaCl₂ 4 mM a pH 8.0. Aplicamos muestras de *C. basiliscus* (0.334 mL) y *C. adamanteus* (9.5 mL) en la columna de afinidad con el IR como ligando, previamente equilibrada con el mismo amortiguador. Iniciamos la cromatografía con el amortiguador con NaCl 0.5 M en CaCl₂ 4 mM, eluimos específicamente con el amortiguador con EDTA 50 mM, y finalmente con Ac. Acético 0.1 M. Colectamos las muestras de 1 mL por tubo y en el caso de las fracciones obtenidas con ácido acético, las recibimos en tubos que contenían 1 mL de amortiguador Tris-Base 1 M a pH 8.0. Las flechas verticales indican los cortes que se hicieron para cada amortiguador utilizado. Determinamos la actividad de FLA₂ para cada tubo por el método de radioensayo previamente descrito.

8.3 Análisis por SDS-PAGE de las FLA₂ de Venenos de Serpientes Aisladas por Cromatografía de Afinidad.

Analizamos en un gel de electroforesis en poliacrilamida con SDS (12%) en condiciones no reductoras las fracciones obtenidas de los venenos de serpientes, los cuales teñimos con Tinción con Plata y de esta manera corroboramos la pureza de la fracción obtenida con EDTA. Debido a que las dos FLA₂ de *C. adamanteus* son idénticas en estructura, actividad y secuencia (excepto por un cambio entre Glutámico y Glutamina en la posición 117, Heinrikson *et al.*, 1977), y a que no existen estudios que describan alguna característica para las FLA₂ de *C. basiliscus*, y que en nuestros experimentos previos no obtuvimos la presencia de bandas en la fracción de EDTA, solamente las fracciones para *C. adamanteus* obtenidas de la columna de afinidad fueron analizadas (Fig. 3)

Utilizamos todas las fracciones con actividad fosfolipásica obtenidas durante la cromatografía de afinidad y encontramos que se reveló sólo una banda con un peso molecular de alrededor de 15 KDa en la elución con EDTA (carril 6 de la Fig 4) la cual corresponde con el peso molecular reportado para cada uno de los dos monómeros que conforman la FLA₂ de *C. adamanteus* (Heinrikson *et al.*, 1977). En las fracciones previas de lavado con Tris-base así como en la fracción de elución con NaCl encontramos más de 15 proteínas presentes (carriles 3 y 4) y en la fracción posterior a la elución, la de ácido acético, encontramos una banda de igual peso molecular al de la proteína en EDTA, pero en menor concentración (Fig. 4).

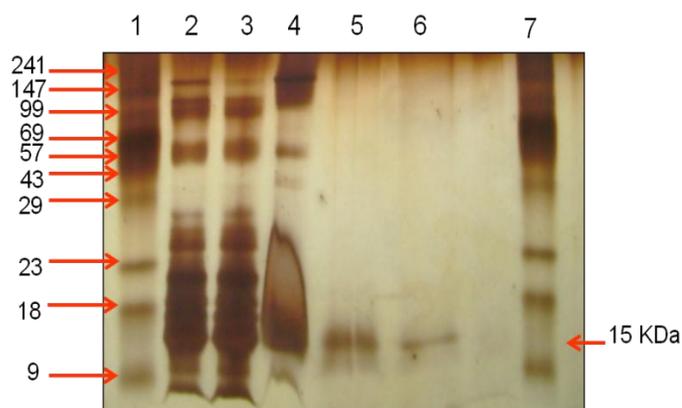


Figura 4. Electroforesis en gel de poliacrilamida (12%) en presencia de SDS de las fracciones de cromatografía del veneno total de *C. adamanteus* teñido con la técnica de nitrato de plata. Carril 1) y 7) Marcador de peso molecular 2) Veneno Total en Tris-base 0.1 M con CaCl₂ 4 mM previo a la cromatografía, 3) Fracción obtenida en Tris-base 0.1 M con CaCl₂ 4 mM pasada por la columna de afinidad, 4) Elución con Tris-base 0.1 M con NaCl 0.5 M, 5) Elución con EDTA 50 mM, 6) Lavado con Ac. Acético 0.1 M.

8.4 Obtención de la Fracción de *T. vaginalis* con Actividad de FLA₂ y Determinación de las Condiciones para su Purificación.

La purificación de una FLA₂ a partir de *T. vaginalis* representa de inicio un proceso difícil debido a las siguientes razones: a) a diferencia de las enzimas solubles obtenidas a partir de venenos de serpientes y abejas, las encontradas en parásitos no presentan actividades enzimáticas tan potentes lo cual se hace evidente en el frecuente uso de métodos radiométricos para su detección (Arai *et al.*, 1986; Safer *et al.*, 1989; Kovacs and Csaba, 1997), y b) los antecedentes de estas enzimas en parásitos consisten en estudios realizados a nivel de homogenizados de fracciones subcelulares (Arai *et al.*, 1985; Safer *et al.*, 1989; Cassaing *et al.*, 2000), o de enzimas recombinantes obtenidas por homología de genes de FLA₂ (Hu *et al.*, 2009) lo cual hace difícil su comparación.

Es por ello, que nuestro primer paso en la purificación de una FLA₂ soluble a partir de *T. vaginalis* fue encontrar la fracción subcelular a partir de la cual pudiéramos purificarla y determinar las mejores condiciones para mantener su actividad enzimática durante este proceso.

8.5 Parámetros de Crecimiento de la Cepa GT-15 de *T. vaginalis*.

Primeramente, realizamos curvas de crecimiento con la cepa GT-15 de *T. vaginalis* incubando 5,000 células/mL en medio de cultivo PEHPS. Los resultados obtenidos nos mostraron que no existe una fase Lag evidente y que la fase de crecimiento exponencial se extiende hasta las 48 horas, donde se alcanza una meseta hasta las 72 hrs y una lisis celular total a las 96 horas de incubación como se observa en la Figura 5.

Los parámetros de crecimiento obtenidos por regresión lineal nos permitieron calcular un tiempo de generación (t) de 10.36 hrs, un tiempo de duplicación (t_D) de 7.18 hrs y una velocidad de duplicación (m) de 0.14 células por hora.

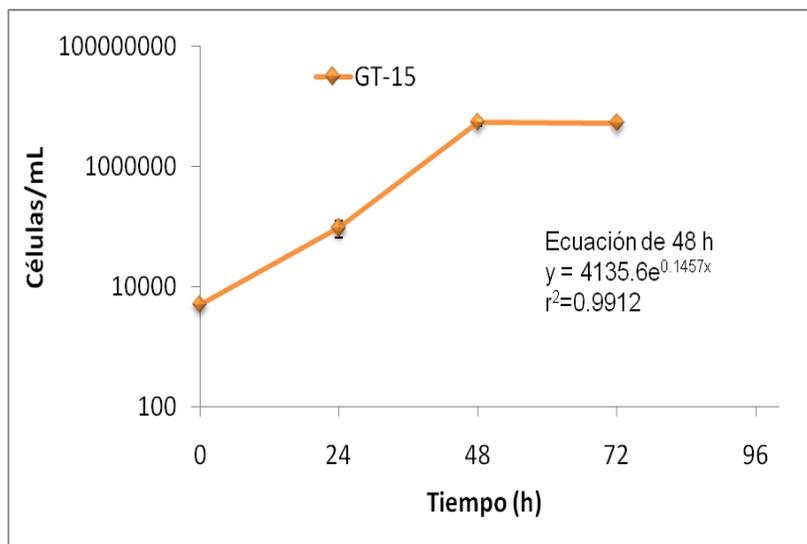


Figura 5. Curva de crecimiento de *T. vaginalis* GT-15 en medio PEHPS. Se inocularon 15 tubos con 5 mL de medio de cultivo PEHPS con 5,000 trofozoítos/mL los cuales después de diferentes tiempos de incubación a 36.5 °C les determinamos la densidad celular en cámara de Neubauer y graficamos en fase semilog la concentración de células obtenidas con respecto al tiempo de incubación. Obtuvimos un coeficiente de correlación (r^2) de 0.992. Los símbolos corresponden a tres experimentos independientes por triplicado.

8.6 Obtención del Medio de Cultivo Usado y Fracción Subcelular S30 de *T. vaginalis*.

Preparamos cultivos masivos de *T. vaginalis* en Spinners de 672 mL de medio de cultivo PEHPS, los cuales incubamos hasta 72 horas y una vez pasado este tiempo, separamos el medio de cultivo usado y las células de *T. vaginalis* para obtener la fracción S30 (ver Métodos sección 7).

Determinamos la actividad específica de FLA₂ en diferentes fracciones de los cultivos de *T. vaginalis*: fracción soluble S30 y medio de cultivo usado de 72 hrs obtenidas a pH 6.0 y 8.0 y las comparamos entre sí para determinar a partir de cual fracción era factible la purificación de una FLA₂. Aunado a esto, determinamos el efecto inhibitorio del IR en cada fracción con el fin de demostrar su efectividad como posible ligando específico de FLA₂ en la columna de afinidad. (Figura 6)

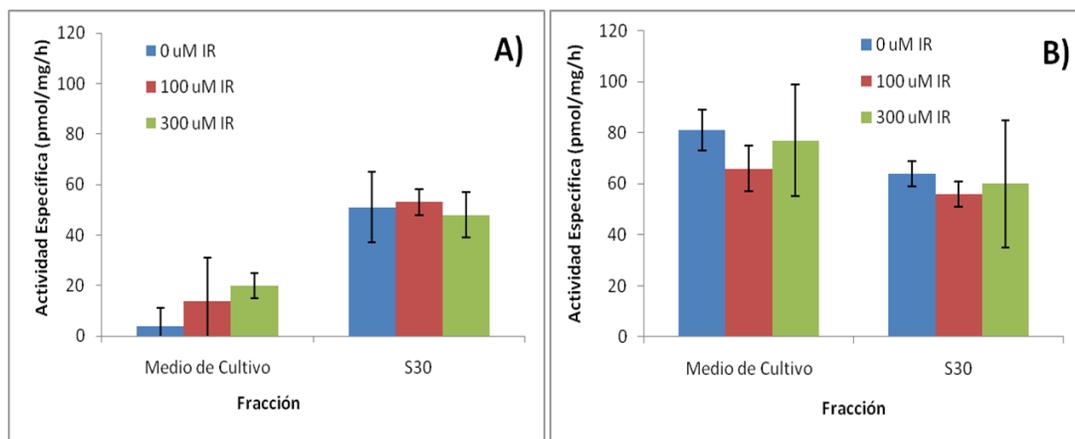


Figura 6. Efecto del IR sobre las distintas fracciones de *T. vaginalis*. Los gráficos muestran la actividad específica de la FLA₂ de las fracciones S30 y Medio de cultivo usado de 72 hrs, además de su inhibición frente a diferentes concentraciones del Inhibidor de Rosenthal. A) Actividad específica de FLA₂ a pH 6.0 y en presencia del IR. B) Actividad de FLA₂ a pH 8.0 y en presencia del IR.

En la Figura 6 observamos que la actividad específica de FLA₂ en el medio de cultivo usado fue 4 veces mayor a un pH de 8.0 con respecto a la obtenida a pH 6.0. La actividad de FLA₂ en S30 fue la misma para los dos valores de pH ensayados. En ningún caso se observó una tendencia clara de inhibición al incrementar la concentración del Inhibidor de Rosenthal hasta 300 μ M

Por poseer la mayor actividad específica, se eligió al Medio de cultivo usado a pH 8.0 para intentar la purificación de una FLA₂ soluble mediante cromatografía de afinidad.

8.7 Actividad de FLA₂ en el Medio de Cultivo Usado de *T. vaginalis* a pH 8.0.

Determinamos la actividad de FLA₂ en el medio de cultivo usado a diferentes tiempos (tubos de 5 mL) y encontramos que había una actividad importante en el medio de cultivo de 48 hrs con respecto al de 0, 72 y 96 hrs cuando incubamos durante una hora las mezclas de reacción de 40 μ L (400 μ g de PT). Cuando extendimos el tiempo de incubación de las mezclas de reacción a 2 horas para los medios de cultivo de 48 y 72 horas, encontramos un incremento importante solo en la actividad de FLA₂ del medio de cultivo de 48 hrs. (Fig. 7).

Cuando realizamos estos ensayos en mezclas de 20 μ L de volumen total, los valores de actividad de FLA₂ fueron muy bajos y muy variables, por lo que no fue posible minimizar el volumen de mezcla y de gasto de sustrato.

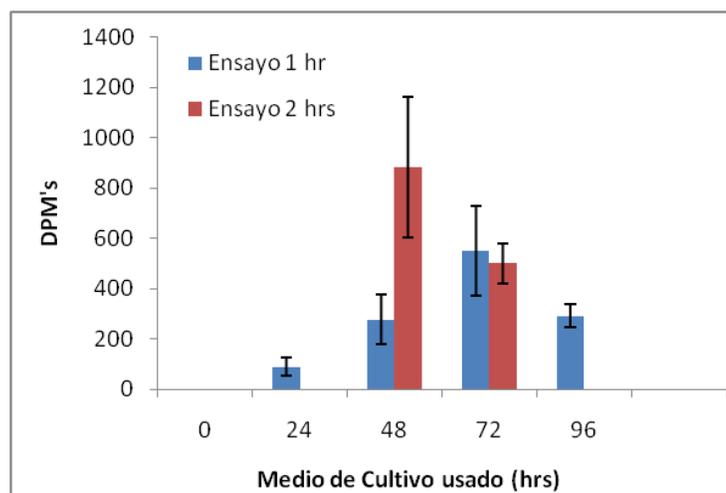


Figura 7. Comparación de la actividad de FLA₂ a diferentes tiempos de incubación en el medio de cultivo usado de *T. vaginalis*. Se ensayó la actividad del medio de cultivo usado de diferentes tiempos (0 – 96 h) incubándolo con una mezcla de ensayo durante 1 hora (también se hizo a 2 hrs para el medio de 48 y 72 hrs), a pH 8.0 en mezclas de reacción de 40 μ L de volumen total (400 μ g de proteína total por mezcla de reacción) y se determinó la actividad de FLA₂ en DPM's por radioensayo

8.7.1 Ensayo de Actividad de FLA₂ en el Medio de Cultivo Usado y Ultrafiltrado con Membrana de Corte de 10 KDa.

Preparamos spinners con 672 mL de medio PEHPS y los incubamos durante 48 y 72 hrs. Obtuvimos el medio de cultivo y lo ajustamos a pH 8.0. Corroboramos su actividad y posteriormente concentramos el medio pasándolo por una membrana de corte de 10 KDa (Fig. 8). La actividad observada en el medio de cultivo tratado por la membrana de corte nos indicó un incremento de poco más del doble de la actividad de FLA₂ observada en el medio sin tratar. Esto era más que conveniente para que al intentar la purificación de la enzima, obtuviéramos una mayor recuperación de la misma.

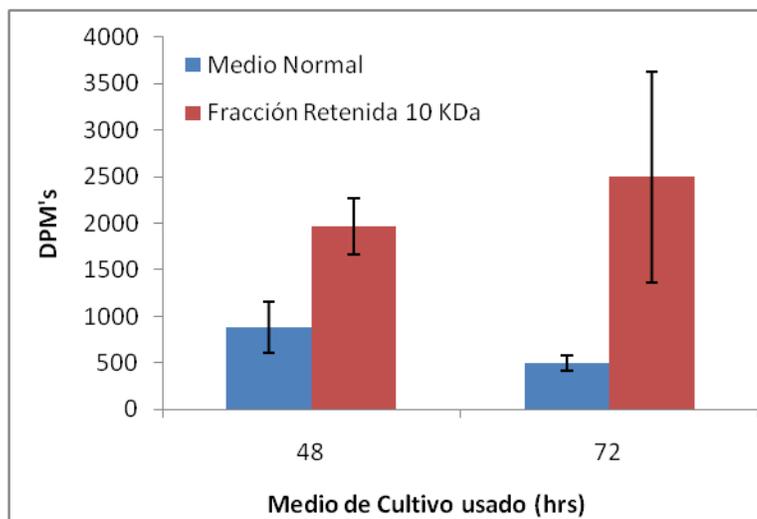


Figura 8. Actividad de FLA₂ en DPM's de 400 µg de PT de Medio de cultivo usado directo y Fracción Retenida (FR) por corte con membrana de 10 KDa. Se observó un incremento de poco más del 50 % de la actividad de FLA₂ en el medio de cultivo usado de 48 y 72 hrs solo para la FR de 10 KDa a pH 8.0.

8.7.2 Actividad de FLA₂ de la FR10 del Medio de Cultivo Usado frente al IR.

Se eligió continuar con la FR10 del medio de 72 hrs para intentar la purificación de la FLA₂, y para ello primeramente realizamos ensayos de actividad de FLA₂ frente al IR a diferentes concentraciones. (Fig. 9)

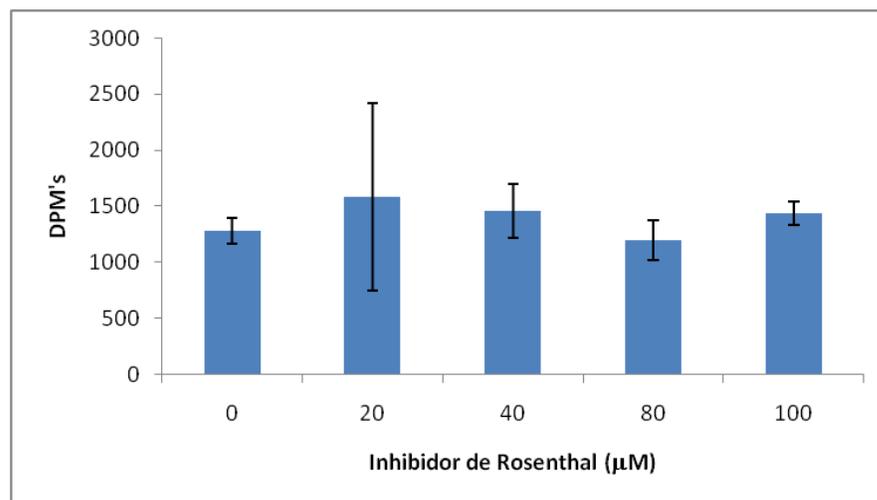


Figura 9. Efecto de diferentes concentraciones del Inhibidor de Rosenthal sobre la FR10 del medio de cultivo de 72 hrs. Determinamos la actividad de FLA₂ de la fracción retenida FR10 obtenida del medio de cultivo usado de 72 hrs, preincubada con diferentes concentraciones del IR (0 – 100 µM) durante 30 min. en presencia de calcio 1 mM y ajustado a pH 8.0. Pasado este tiempo se agregó el sustrato específico [¹⁴C]-FC y se incubó durante 2 horas a 36.5 °C. Se determinó la actividad de FLA₂ en DPM's. Cada símbolo corresponde a la media y desviación estándar de tres experimentos independientes por triplicado.

La figura 9 nos muestra que no se observó inhibición de la actividad de FLA₂ en ninguna de las concentraciones de IR ensayadas para la FR10 del medio de cultivo de 72 hrs de *T. vaginalis* GT-15 a pH 8.0. Los datos presentados anteriormente indicaron que la actividad de FLA₂ no se inhibió a ninguna concentración probada del IR (Figura 9)

8.7.3 Actividad de FLA₂ de las Fracciones Ultrafiltradas con Membrana de Corte de 30 KDa y 10-30 KDa.

Debido a que la mayoría de las FLA₂ poseen pesos moleculares menores a 30 KDa, se probó el medio de cultivo de 72 hrs de dos maneras diferentes: a) separado por una membrana de corte de 30 KDa, para obtener una fracción ultrafiltrada (FUF30) y una fracción retenida (FR30) y b) con 30 y 10 KDa (F10-30), en donde el medio de cultivo se ultrafiltró con la membrana de 10 KDa y la fracción retenida de éste se ultrafiltró con membrana de 30 KDa. Se realizaron ensayos con estas fracciones para determinar el efecto del IR en cada una, y los resultados los observamos en la figura 10.

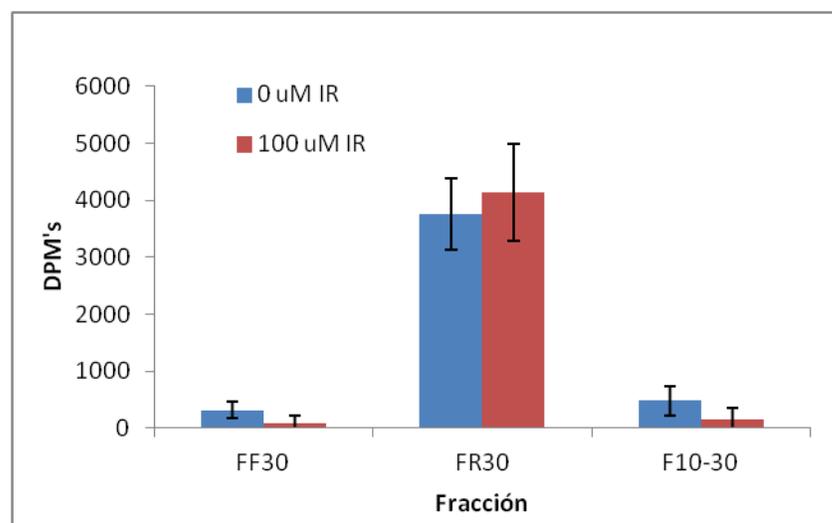


Figura 10. Efecto del IR sobre las fracciones obtenidas por ultrafiltración de medio de cultivo de 72 h. Determinamos la actividad de FLA₂ de las fracciones ultrafiltradas FF30, FR30 y F10-30 obtenidas del medio de cultivo de 72 hrs las cuales se preincubaron en ausencia y en presencia de 100 μ M de IR durante 30 min. en presencia de calcio 1 mM y a pH 8.0. Pasado este tiempo se agregó el sustrato específico [¹⁴C]-FC y se incubó durante 2 horas a 36.5 °C. Se determinó la actividad de FLA₂ en DPM's. Cadas barras corresponden a la media y desviación estándar de tres experimentos independientes por triplicado.

El efecto del IR fue nulo sobre todas las fracciones ensayadas, sin embargo llamó la atención que la mayor actividad de FLA₂ obtenida hasta este ensayo se encontró en la fracción retenida de 30 KDa, lo que nos hizo pensar que la FLA₂ de interés pudiera ser de mayor peso molecular al esperado. Para averiguar en qué rango de peso molecular podría estar nuestra enzima, hicimos un corte con membrana de tamaño de poro de 50 KDa. Después ensayamos la actividad tanto de la fracción retenida como la ultrafiltrada. En este caso, perdimos el 90% de la actividad en la FR50 y casi el 100% de la FUF50; lo mismo sucedió para un corte de 100 KDa. (datos no mostrados).

8.7.4 Cromatografía de Afinidad de la FR30 del Medio de Cultivo Usado.

Debido a los resultados obtenidos con los diferentes cortes del medio de cultivo, se decidió seguir trabajando con la fracción retenida de 30 KDa, por su buena actividad, e intentar la purificación de una FLA₂ soluble.

Aun cuando no se observó inhibición con una concentración de 100 μ M de IR en los ensayos en tubo, se procedió a realizar una cromatografía de afinidad, y el resultado lo muestra la Figura 11.

TABLA VI

Recuperación de proteínas y actividad fosfolipásica de la columna de afinidad de la fracción retenida (FR30) por ultrafiltración del medio de cultivo usado de *T. vaginalis* a pH 8.0.

Fracción	Volumen (mL)	Proteína Total (mg)	Actividad Total (U)	Act. Específica (U/mg)	Recuperación (%)	Factor de Purificación
FR30	0.73	16.6288	105 746	6359	100	1
NaCl	1.0	0.0099	106	10 707	0	2
EDTA	4.0	0.0424	65.75	1 551	0	0
Acido acético	1.0	0.0270	92	3 407	0	1

U = 1 pmol de FC hidrolizada por la FLA₂. % Recuperación = Actividad Total posterior a la purificación x 100/ Actividad Total previa a la purificación. Factor de Purificación = Act. Específica posterior a la purificación/Act. Específica previa a la purificación.

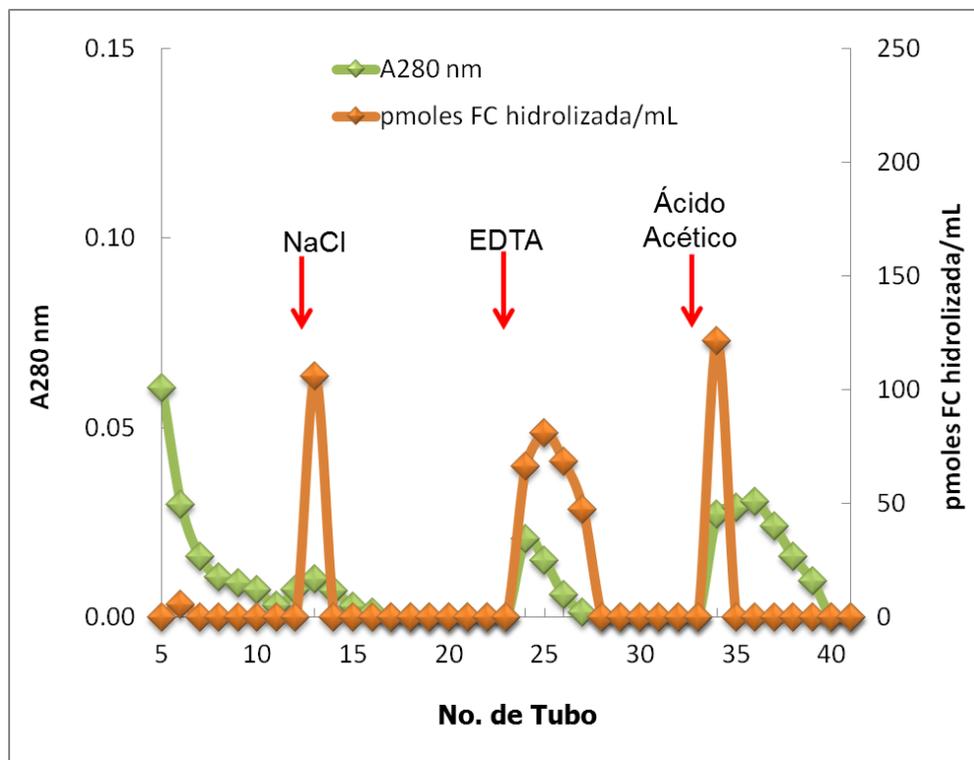


Figura 11. Cromatografía de afinidad de la FR30 del medio de cultivo de 72 hrs de *T. vaginalis* GT-15 a pH 8.0. Mezclamos 0.4 mL de la FR30 obtenida por ultrafiltración del medio de cultivo, con 0.4 mL de amortiguador Tris-base 0.1 M y CaCl_2 4 mM a pH 8. Aplicamos 0.725 mL (16.63 mg) de esta mezcla en la columna de afinidad con el IR como ligando, previamente equilibrada con el mismo amortiguador de la muestra. Iniciamos la cromatografía con el amortiguador con NaCl 0.5 M en CaCl_2 4 mM, luego una elución específica con el amortiguador con EDTA 50 mM, y finalmente con Ac. Acético 0.1 M. Colectamos las muestras de 1 mL por tubo y en el caso de las fracciones obtenidas con ácido acético, las recibimos en tubos que contenían 1 mL de amortiguador Tris-Base 1 M a pH 8.0. Las flechas verticales indican los cortes que se hicieron para cada amortiguador utilizado. Determinamos la actividad de FLA₂ para cada tubo por el método de radioensayo previamente descrito.

Encontramos baja actividad en la fracción de elución con EDTA, distribuida en 4 viales de 1 mL cada uno. Sin embargo, las fracciones de lavados con NaCl y Ac. Acético también presentaron actividad en por lo menos un tubo. Como se aprecia en la Tabla VI, no hubo recuperación importante en ninguna de las fracciones de cromatografía. Realizamos un segundo ensayo de actividad de FLA₂ en las mismas condiciones y encontramos que la actividad en todas las fracciones de cromatografía ensayadas se había perdido (datos no mostrados).

Se obtuvieron nuevas fracciones de FR30 de medio de cultivo de 72 hrs, y se repitieron los experimentos y sucedió lo mismo, hubo pérdida de actividad de las

fracciones obtenidas por cromatografía en las descongelaciones e incluso, para alícuotas, a través del tiempo. Debido a esto, no se pudo continuar trabajando con la FLA₂ de esta fracción, pues su caracterización no era factible.

8.8 Actividad de FLA₂ en la Fracción Subcelular S30 a pH 8.0.

Debido a que la purificación de una FLA₂ a partir del medio de cultivo usado de *T. vaginalis* no fue factible por las razones ya expuestas previamente, se procedió a probar con la fracción S30. Para ello realizamos una cromatografía de afinidad a la fracción S30 a pH 8.0. Cuando corroboramos la actividad de las fracciones obtenidas en tres ensayos por triplicado observamos el mismo efecto de pérdida de la actividad en el tiempo (datos no mostrados).

8.9. Actividad de FLA₂ en la Fracción Subcelular S30 a pH 6.0.

Nuestra tercera fracción por probar era la S30 pH 6.0. Obtuvimos nuestra fracción S30 de 72 hrs. a pH 6.0 y realizamos ensayos para corroborar su actividad de FLA₂ en mezcla de reacción de 40 µL de volumen total, a pH 6.0 e incubando por 2 horas. Encontramos valores excelentes de DPM's correspondientes a la actividad de FLA₂, y procedimos a realizar un ensayo con la columna de afinidad. Se prepararon nuevas soluciones al pH requerido y se realizó la cromatografía de afinidad. (Fig. 12)

Como podemos observar en la tabla VII, la concentración de PT obtenida en la fracción de elución con EDTA sigue siendo muy baja, lo cual podemos corroborar al ver el porcentaje de recuperación de 7%, sin embargo la actividad específica se ha incrementado significativamente con respecto a la fracción S30 inicial. Cuando observamos los datos para la fracción de lavado con Ac. Acético, podemos ver que también encontramos actividad de FLA₂, y que su actividad específica es aún mayor que la encontrada en la fracción de EDTA, esto como resultado de la baja concentración de proteína recuperada en esta fracción.

Este resultado nos mostró que S30 a pH 6.0 posee una FLA₂ factible de ser purificada por cromatografía de afinidad, por lo que procedimos a definir las mejores condiciones para su aislamiento y purificación a homogeneidad y lograr su caracterización parcial.

Para ello, preparamos una nueva fracción S30 a pH 6.0 y corroboramos la actividad de FLA₂ de la misma a las 48 y 72 hrs, esto debido a que hemos encontrado, en la experiencia de laboratorio, que existen variaciones en la tasa de crecimiento que presentan las cepas de *T. vaginalis* en el tiempo, y por lo mismo en la actividad de FLA₂ que podemos encontrar en las fracciones.

Debido a lo anterior procedimos a la purificación de una FLA₂ soluble a partir de la fracción S30 obtenida a las 48 hrs a pH 6.0 mediante cromatografía de afinidad.

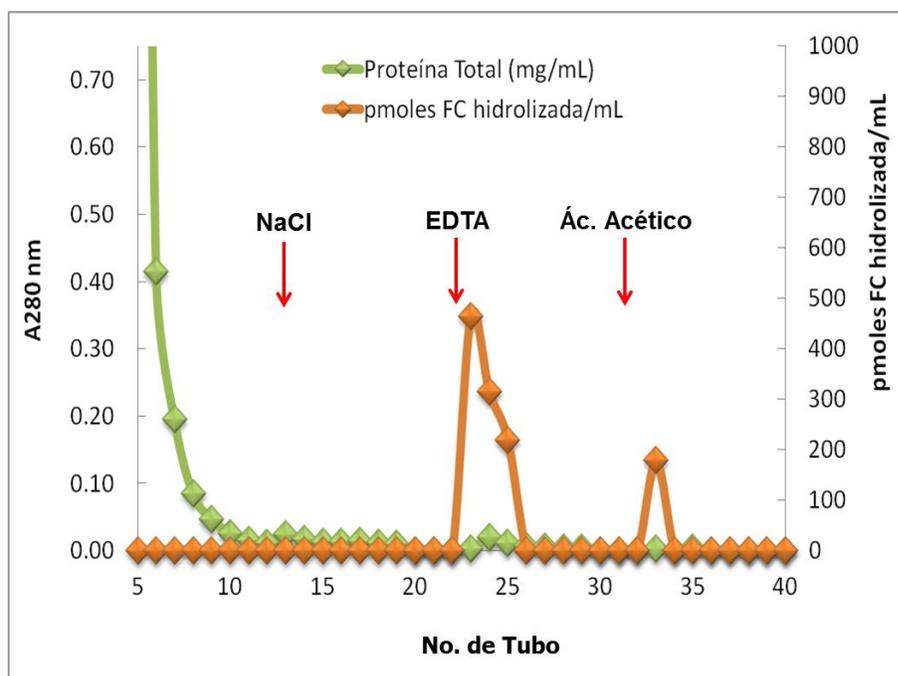


Figura 12. Cromatografía de afinidad de la fracción S30 de 72 hrs de *T. vaginalis* GT-15 a pH 6.0. Mezclamos la fracción subcelular S30 de 72 hrs de *T. vaginalis*, con amortiguador de acetatos 0.1 M y CaCl₂ 4 mM a pH 6.0 y aplicamos 3.12 mL (34.78 mg) de esta mezcla en la columna de afinidad con el IR como ligando, previamente equilibrada con el mismo amortiguador de la muestra. Iniciamos la cromatografía con el amortiguador de acetatos con NaCl 0.5 M en CaCl₂ 4 mM, luego una elución específica con el amortiguador de acetatos con EDTA 50 mM, y finalmente con Ac. Acético 0.1 M. Colectamos las muestras de 1 mL por tubo y en el caso de las fracciones obtenidas con ácido acético, las recibimos en tubos que contenían 1 mL de amortiguador de acetatos 1 M a pH 6.0. Las flechas verticales indican los cortes que se hicieron para cada amortiguador utilizado. Determinamos la actividad de FLA₂ para cada tubo por el método de radioensayo previamente descrito.

8.10. Purificación de una FLA₂ Soluble de la Fracción S30 de 48 hrs de *T. vaginalis* a pH 6.0.

En una columna de afinidad con 3 mL de Sefarosa 4B con el IR como ligando específico, se hicieron pasar 10 mL de S30 en CaCl₂ 4 mM a pH 6.0, que contenían 137.5 mg de proteína total a una velocidad de flujo de 0.28 mL/s (Fig. 13). En la Tabla VIII podemos observar que en la fracción de elución específica con EDTA obtuvimos la mayor actividad específica con un incremento importante en el factor de purificación. Sin embargo, cabe mencionar que la concentración protéica en esta fracción fue muy baja lo cual dificultó los ensayos posteriores.

TABLA VII

Recuperación de proteínas y actividad fosfolipásica de la columna de afinidad de la fracción subcelular S30 de 72 hrs de *T. vaginalis* a pH 6.0.

Fracción	Volumen (mL)	Proteína Total (mg)	Actividad Total (U)	Act. Específica (U/mg)	Recuperación (%)	Factor de Purificación
S30	3.12	34.788	3 922	113	100	1
NaCl	0	0	0	0	0	0
EDTA	3.0	0.0331	267	8 056	7	71
Acido acético	1	0.0024	178	74 167	5	658

TABLA VIII

Recuperación de proteínas y actividad fosfolipásica de la columna de afinidad de la fracción subcelular S30 de 48 hrs de *T. vaginalis* a pH 6.0.

Fracción	Volumen (mL)	Proteína Total (mg)	Actividad Total (U)	Act. Específica (U/mg)	Recuperación (%)	Factor de Purificación
S30	9.9	137.494	74 735	544	100	1
NaCl	1.0	0.0098	0.0	0.0	0.0	NA
EDTA	4.0	0.0127	2 266	178 425	3.03	328
Acido acético	3.0	0.022	2 133	96 955	2.85	178

U = 1 pmol de FC hidrolizada por la FLA₂. % Recuperación = Actividad Total posterior a la purificación x 100/ Actividad Total previa a la purificación. Factor de Purificación = Act. Específica posterior a la purificación/Act. Específica previa a la purificación.

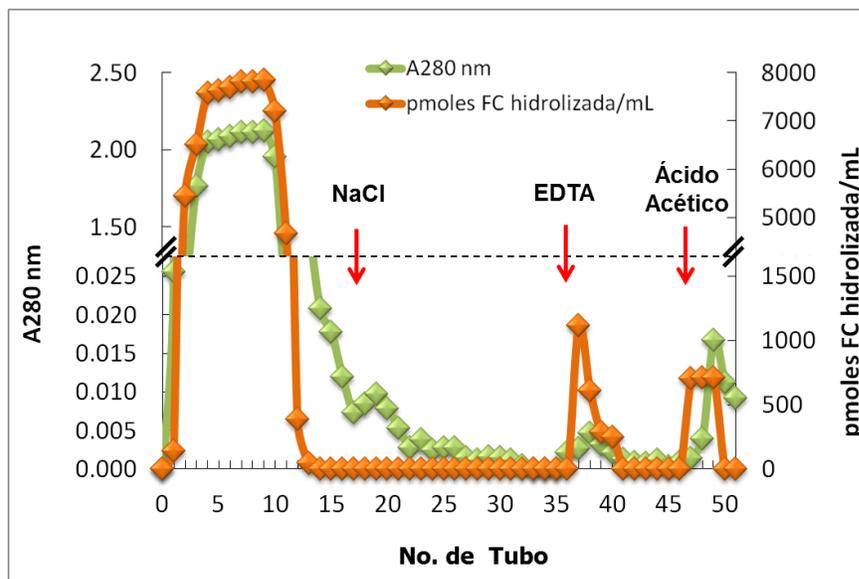


Figura 13. Cromatografía de afinidad de la fracción S30 de 48 hrs de *T. vaginalis* GT-15 a pH 6.0. Mezclamos la fracción subcelular S30 de 48 hrs de *T. vaginalis*, con amortiguador de acetatos 0.1 M y CaCl_2 4 mM a pH 6.0 y aplicamos 9.9 mL (137.5 mg) de esta mezcla en la columna de afinidad con el IR como ligando, previamente equilibrada con el mismo amortiguador de la muestra. Iniciamos la cromatografía con el amortiguador de acetatos con NaCl 0.5 M en CaCl_2 4 mM, luego una elución específica con el amortiguador de acetatos con EDTA 50 mM, y finalmente con Ac. Acético 0.1 M. Colectamos las muestras de 1 mL por tubo y en el caso de las fracciones obtenidas con ácido acético, las recibimos en tubos que contenían 1 mL de amortiguador de acetatos 1 M a pH 8.0. Las flechas verticales indican los cortes que se hicieron para cada amortiguador utilizado. Determinamos la actividad de FLA_2 para cada tubo por el método de radioensayo previamente descrito.

8.11 Análisis por SDS-PAGE de las Fracciones de Cromatografía de S30.

Cuando realizamos una electroforesis en gel con SDS no visualizamos proteínas en las fracciones de lavados ni de elución específica con EDTA, lo cual pudo ser debido a una baja concentración protéica de nuestras muestras, incluso para la tinción con plata cuyos límites de detección van de 2 a 5 ng (Fig. 14, Blum *et al.*, 1987).

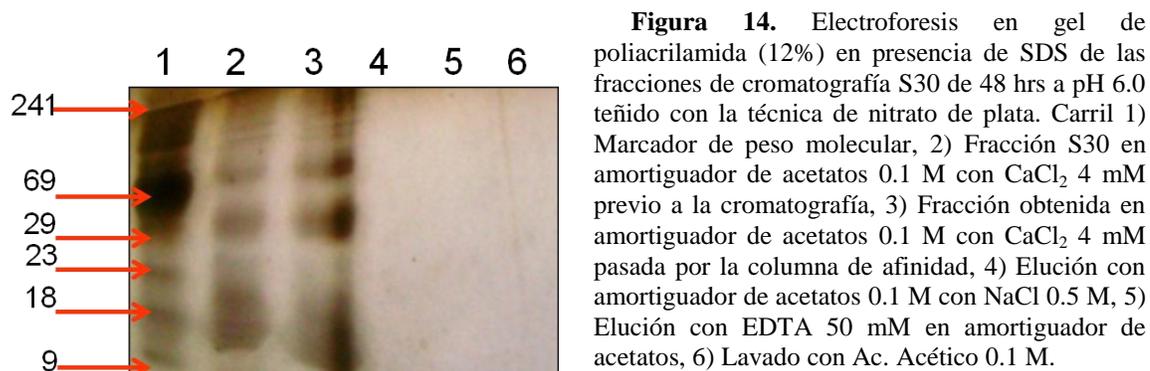


Figura 14. Electroforesis en gel de poliacrilamida (12%) en presencia de SDS de las fracciones de cromatografía S30 de 48 hrs a pH 6.0 teñido con la técnica de nitrato de plata. Carril 1) Marcador de peso molecular, 2) Fracción S30 en amortiguador de acetatos 0.1 M con CaCl_2 4 mM previo a la cromatografía, 3) Fracción obtenida en amortiguador de acetatos 0.1 M con CaCl_2 4 mM pasada por la columna de afinidad, 4) Elución con amortiguador de acetatos 0.1 M con NaCl 0.5 M, 5) Elución con EDTA 50 mM en amortiguador de acetatos, 6) Lavado con Ac. Acético 0.1 M.

8.12 Análisis por Espectrometría de Masas.

Para tratar de identificar el contenido de nuestra muestra de EDTA de la cromatografía de S30, realizamos un análisis de proteínas por espectrometría de masas acoplado a cromatografía de líquidos de alta resolución.

8.12.1 Análisis por Espectrometría de Masas de la Fracción de EDTA obtenida por Cromatografía de Afinidad del Veneno Total de *C. adamanteus*.

Primeramente utilizamos la fracción de EDTA obtenida a partir del veneno total de *C. adamanteus* como control positivo. Se seleccionó el vial que presentó proteína con actividad de FLA₂. Se concentró por ultrafiltración con filtro de corte de 5 KDa (Ultracel PLC Membranes, Millipore) y posteriormente se utilizó una columna de fase reversa de desalado (MassPREP On-Line Desalting Cartridge, Waters) previa al análisis por EM. Simultáneamente a la cromatografía en fase reversa, determinamos la absorbancia a 280 nm de nuestra solución y corroboramos la presencia de proteínas solubles. (Fig.15) En el análisis del espectro de masas encontramos que en el rango de masas de 2 a 100 KDa solo estaba presente un tipo de proteína de peso molecular alrededor de los 15 KDa correspondiente a la FLA₂ de *C. adamanteus*.

8.12.2 Análisis por Espectrometría de Masas de la Fracción de EDTA obtenida por Cromatografía de Afinidad de S30 a pH 6.0.

La fracción en EDTA con proteínas según absorbancia a 280 nm, obtenida por cromatografía de afinidad de S30 de 48 hrs a pH 6.0 sería tratada de igual manera que la fracción de EDTA obtenida por cromatografía del veneno total de *C. adamanteus*. Realizamos una ultrafiltración con membrana de corte de 5 KDa (Ultracel PLC Membranes, Millipore); determinamos su actividad de FLA₂ para corroborar que ésta se mantuvo en la fracción retenida del ultrafiltrado, sin embargo no encontramos ninguna actividad (datos no mostrados). Por ello introdujimos directamente la fracción de EDTA a la columna de desalado y el análisis por arreglo de diodos no nos dio una señal evidente de la presencia de proteína alguna (no se incluye imagen), esto debido

probablemente a la baja concentración de proteína de la muestra que es diluida aun mas en la elución de la columna de desalado. De igual manera, no fue posible identificar una proteína particular en el análisis de espectros de masas.

Finalmente, se intentó el análisis de la muestra de EDTA inyectándola directamente al espectrómetro de masas y así pudimos identificar mediante el análisis de espectros de masas la presencia de una sola proteína de peso molecular aproximado de 13 KDa (Fig.16).

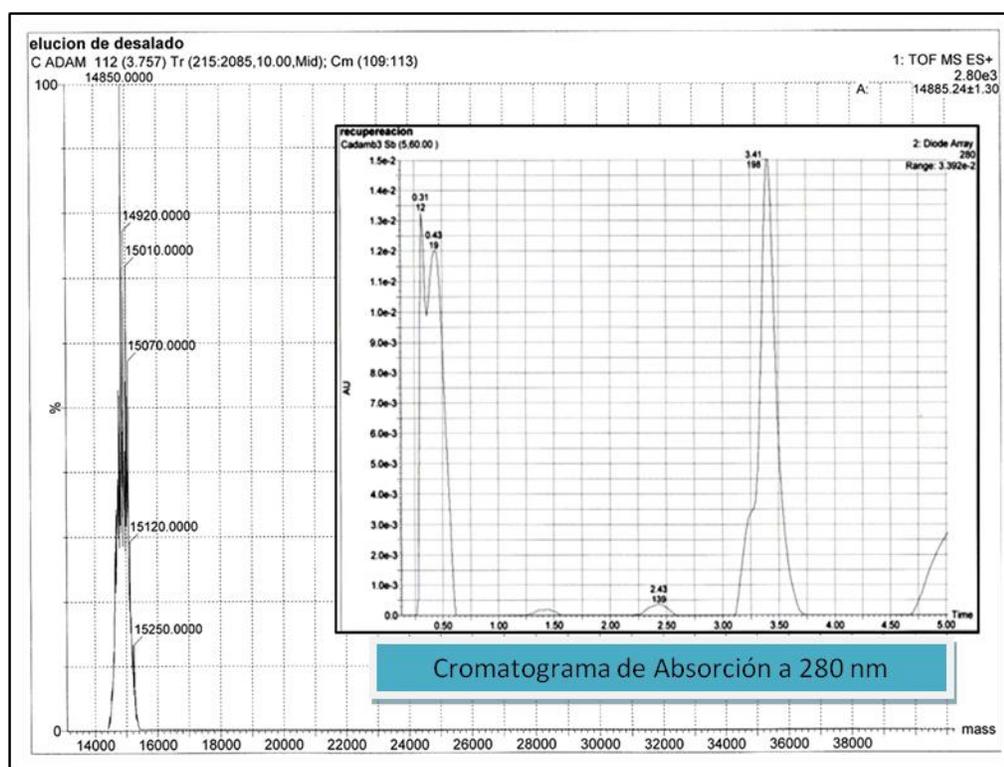


Figura 15. Deconvolución del espectro de masas para fracción de EDTA del veneno total de *C. adamanteus*. Espectrómetro de masas: Micromass® QTOF micro, Waters. Fuente de Ionización: Electropray. Muestra: Fracción retenida del ultrafiltrado de 5 KDa de la fracción de EDTA de *C. adamanteus*, Separación: CLAR- FR (2695 HPLC), MassPREP On-Line Desalting Cartridge, Waters. Algoritmo Computacional: Transform. Recuadro: Cromatograma de Absorción a 280 nm de la misma fracción de EDTA obtenida por analizador por arreglo de diodos (Waters 996 Diode Array).

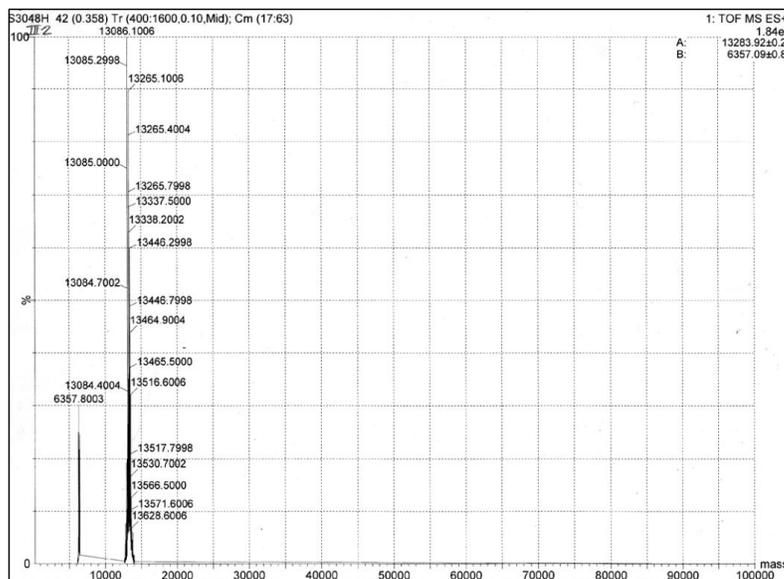


Figura 16. Deconvolución de los espectros de masas de la fracción EDTA de S30 de 48 hrs a pH 6.0 que nos muestran una sola señal de proteína de peso molecular de 13 283 Da. Espectrómetro de masas: Micromass QTOF micro, Waters. Modo de Ionización: Electrospray. Muestra: inyección directa. Umbral: 30 %. Algoritmo Computacional: Transform.

En vista de que en nuestra fracción de EDTA obtenida por cromatografía de afinidad de S30 a pH 6.0 solo encontramos nuestra proteína de interés, una FLA₂, realizamos la digestión con tripsina y sometimos nuestro digerido a un análisis por CLAR/EM en tándem para la identificación de secuencias parciales de la FLA₂ y no identificamos ninguna secuencia significativa.

8.12.3 Análisis por Espectrometría de Masas de la FUF30 3X obtenida de S30.

Una vez identificada la presencia de una FLA₂ dependiente de calcio de peso molecular aproximado de 13 KDa proveniente de S30, decidimos implementar una nueva estrategia de purificación en vista de incrementar la concentración de esta proteína para su análisis de secuencias. Para tratar de mejorar la recuperación de proteína a partir de S30 de 48 hrs a pH 6.0 por cromatografía de afinidad, sometimos nuestra fracción S30 a ultrafiltración con membrana de corte de 30 KDa y posteriormente la concentramos 3 veces por evaporación con Nitrógeno. Determinamos la actividad en la fracción ultrafiltrada de 30 KDa (FUF30 3X) y ésta se incrementó al

doble. Estos resultados nos indicaron una pérdida de actividad, pero a la vez, una mayor concentración de proteína para ser digerida y analizada.

Se analizó directamente por CLAR/EM la FUF30 concentrada 3 veces con Nitrógeno (FUF30 3X) y se encontró la presencia de 2 proteínas: una de alrededor de 8 KDa con un Rt de 5.612 min y otra de aproximadamente 13 KDa con un Rt de 7.019 min (Fig 17).

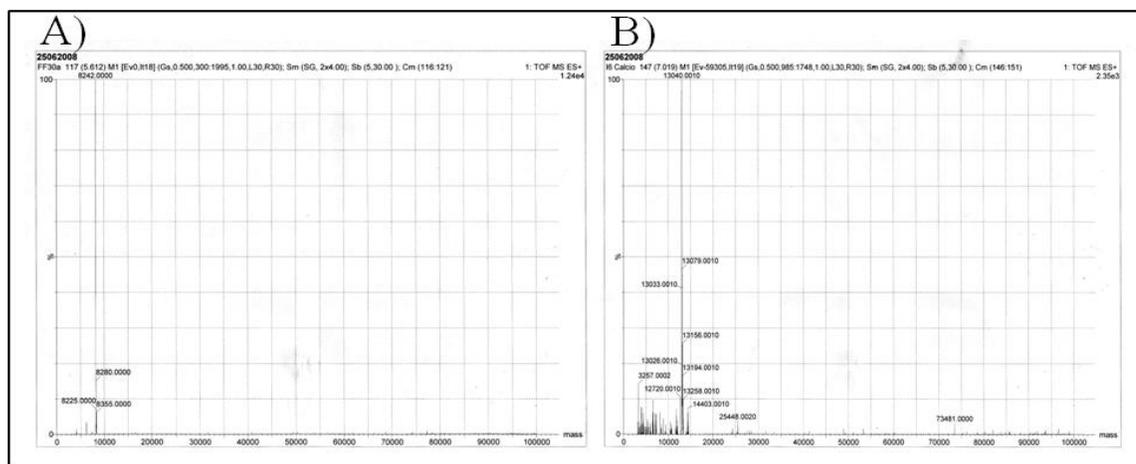


Figura 17. Deconvolución de los espectros de masas de las dos fracciones separadas a partir de FUF30 3X. A) Señal de proteína de 8 KDa y B) Señal de proteína de 13 KDa aproximadamente.

8.12.4 Obtención de Secuencias Parciales de las Proteínas Aisladas de la FUF30 3X.

Se separaron las proteínas presentes en la FUF30 3X obteniendo las fracciones por CLAR según sus tiempos de retención y se sometieron a digestión con tripsina (Ver sección 7 de Métodos). Se analizaron en búsqueda de obtener alguna secuencia parcial de las mismas y los resultados se presentan en la tabla IX.

Hicimos un BLAST para el genoma de *T. vaginalis* con filtro para proteínas con pesos moleculares entre 8 y 9 KDa y encontramos que la proteína de 8 KDa fue identificada según la secuencia parcial KDSTLHLVLR como una Ubiquitina putativa de *T. vaginalis*; en la tabla IX solo se incluyen cuatro genes que pudieran codificar para esta proteína.

TABLA IX

Secuencias peptídicas de las proteínas presentes en la FUF30 3X previa digestión con tripsina y análisis por CLAR/EM.

Proteína	Secuencias obtenidas	Gen	PM	Producto
8 KDa	KDSTLHLVRL	TVAG_184140	8 758	Ubiquitina, putativa
		TVAG_184150	8 748	
		TVAG_184180	8 758	
		TVAG_174190	8 758	
13 KDa	LETMTVAELANNSVRLFVK	TVAG_265110	13 853	Proteína Hipotética Conservada
		TVAG_602280	13 432	

En cambio para la FLA₂, la búsqueda de proteínas que contuvieran la secuencia peptídica LETMTVAELANNSVRLFVK y un peso molecular en el rango de 13 a 14 KDa nos dio la opción solo entre dos probables genes que codifican para Proteínas Hipotéticas Conservadas con pesos moleculares diferentes, pero que pueden corresponder a nuestra proteína aislada.

8.13 Caracterización de la Proteína de 13 KDa con Actividad de FLA₂ Aislada de la FUF30 3X.

Con el fin de confirmar que la actividad de FLA₂ estaba dada por la proteína de 13 KDa, era necesario aislarla y determinar si poseía esta actividad. Para ello era necesario evaluar si esta proteína era factible de ser purificada mediante cromatografía de afinidad. Realizamos ensayos *in vitro* de la fracción FUF30 3X frente al IR y encontramos que solo 40% de la actividad presente se inhibía frente a este compuesto como podemos apreciar en la Fig.18.

Con el antecedente de que la actividad de FLA₂ de la FUF30 3X se inhibe frente al IR en un 40% aproximadamente, procedimos a realizar la cromatografía de afinidad para esta fracción y cada una de las fracciones obtenidas las analizamos por CLAR/EM para identificar las proteínas presentes.

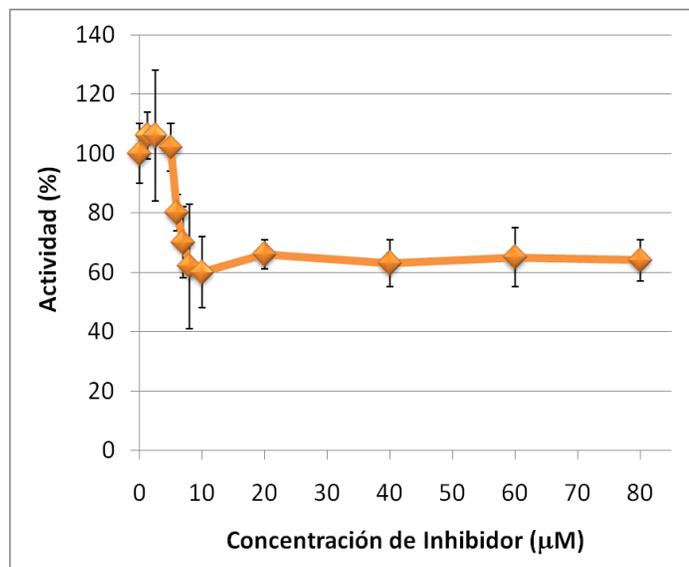


Figura 18. Efecto del IR en la actividad de la FLA₂ de 13 KDa de la FUF30 de S30 de 48 hrs a pH 6.0. Determinamos la actividad de FLA₂ por método de radioensayo en la fracción de FUF30 realizando mezclas con 10 µL de muestra (736.96 mg) que se incubaron con 10 µL de diferentes concentraciones de IR (0 – 80 µM) en presencia de 1 mM de CaCl₂ a pH 6.0 durante 30 min. Pasado este tiempo, se añadieron 20 µL del sustrato específico [¹⁴C]-FC y se incubó durante 2 horas más. Cada punto corresponde a la media y desviación estándar de seis determinaciones en tres experimentos independientes.

8.13.1 Cromatografía de Afinidad de la FUF30 3X.

Al observar el cromatograma de la Fig 19 podemos ver que la actividad de FLA₂ se encontraba presente en las 4 fracciones, sin embargo hubo un incremento significativo de la actividad específica a partir de la primera fracción de lavado así como en la fracción de elución específica con EDTA y la elución final con Ac. Acético. (Tabla X).

8.13.2 Análisis por Espectrometría de Masas de las Fracciones de Cromatografía de Afinidad de FUF30 3X.

Cuando analizamos los datos obtenidos por CLAR/EM encontramos la proteína de 8 KDa presente únicamente en la primera fracción correspondiente a la introducción de la muestra en amortiguador de acetatos con CaCl₂ a la columna de afinidad. A partir del amortiguador de acetatos con NaCl 0.5 M, en todas las fracciones con proteína, ésta se

identificó con un peso molecular de alrededor de 13 KDa con lo que confirmamos que era ésta la que poseía actividad de FLA₂ dependiente de calcio (Fig. 20. A,B,C,D y E).

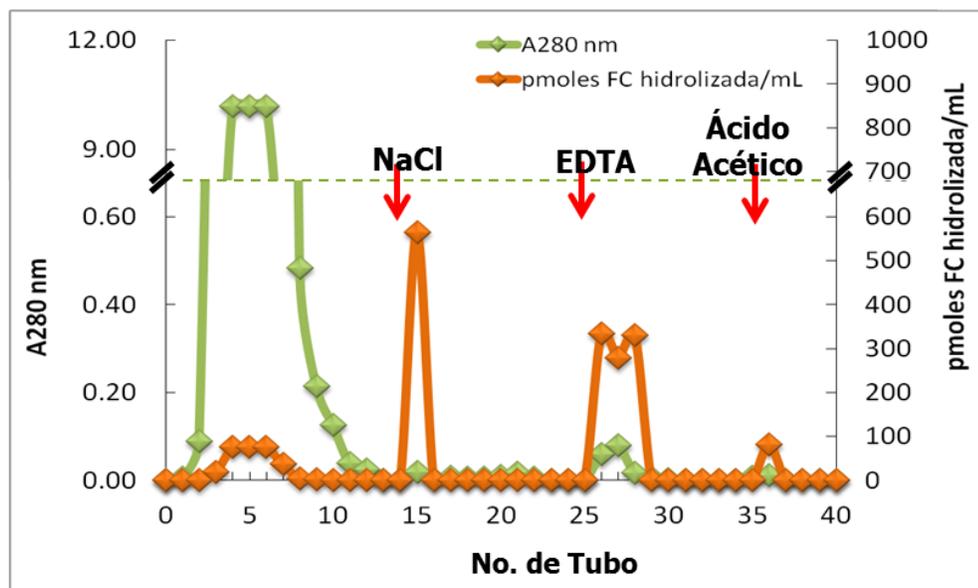


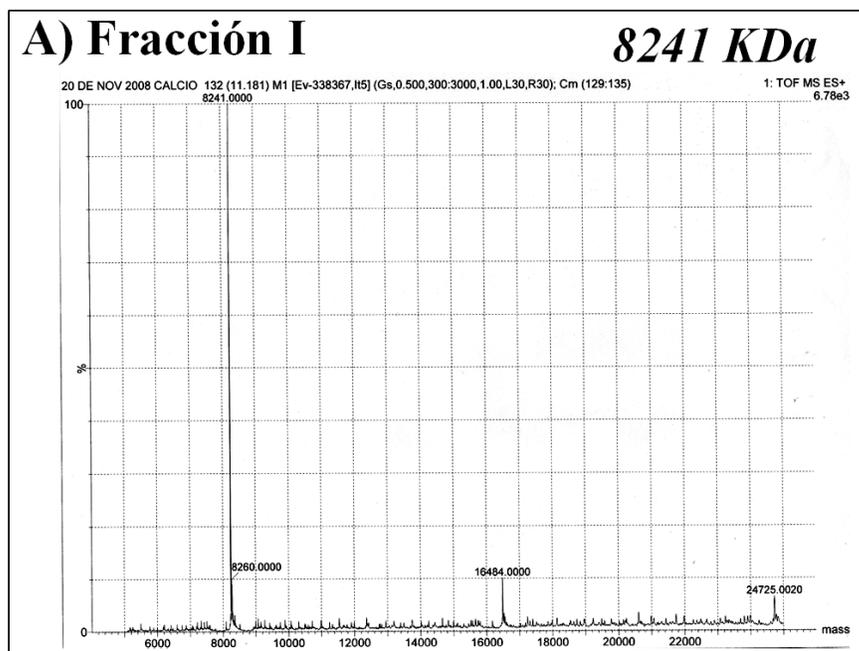
Figura 19. Cromatografía de afinidad de FUF30 3X de la fracción S30 de 48 hrs de *T. vaginalis* GT-15 a pH 6.0. Mezclamos la fracción FUF30 3X de 48 hrs de *T. vaginalis*, con amortiguador de acetatos 0.1 M y CaCl₂ 4 mM a pH 6.0 y aplicamos 3.7 mL (40.99 mg) de esta mezcla en la columna de afinidad con el IR como ligando, previamente equilibrada con el mismo amortiguador de la muestra. Iniciamos la cromatografía con el amortiguador de acetatos con NaCl 0.5 M en CaCl₂ 4 mM, luego una elución específica con el amortiguador de acetatos con EDTA 50 mM, y finalmente con Ac. Acético 0.1 M. Colectamos las muestras de 1 mL por tubo y en el caso de las fracciones obtenidas con ácido acético, las recibimos en tubos que contenían 1 mL de amortiguador de acetatos 1 M a pH 6.0. Las flechas verticales indican los cortes que se hicieron para cada amortiguador utilizado. Determinamos la actividad de FLA₂ para cada tubo por el método de radioensayo previamente descrito.

TABLA X

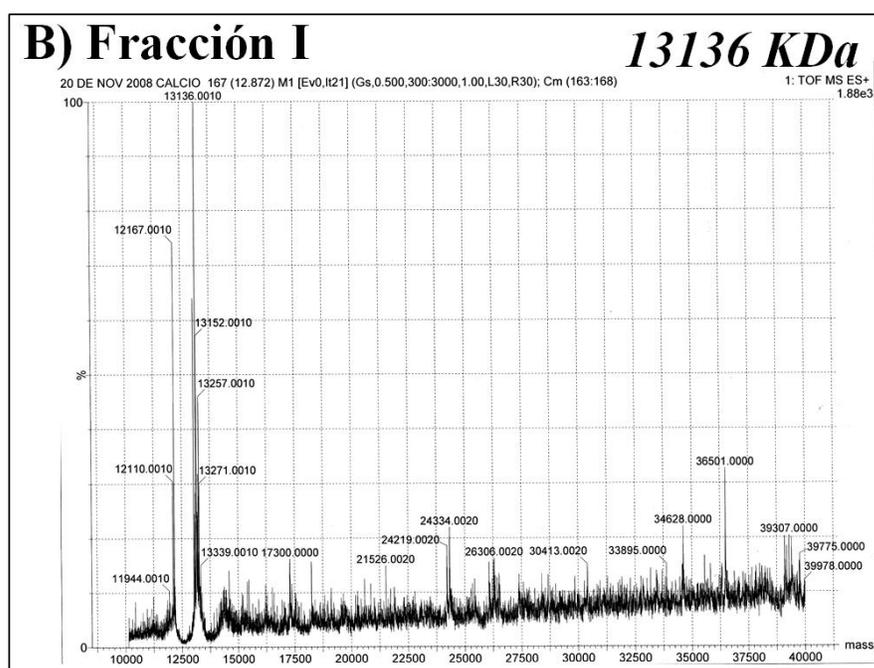
Recuperación de proteínas y actividad fosfolipásica de la columna de afinidad de la FUF30 3X de *T. vaginalis*.

Fracción	Volumen (mL)	Proteína Total (mg)	Actividad Total (U)	Act. Específica (U/mg)	Recuperación (%)	Factor de Purificación
S30	2.8	62.6360	22120	353	100	1
FUF30 3X	3.7	40.9960	3855	94	17.4	1
NaCl	1.0	0.0177	563	31808	2.55	90
EDTA	3.0	0.1529	941	6154	4.25	17
Acido acético	1.0	0.0105	81	7714	0.37	22

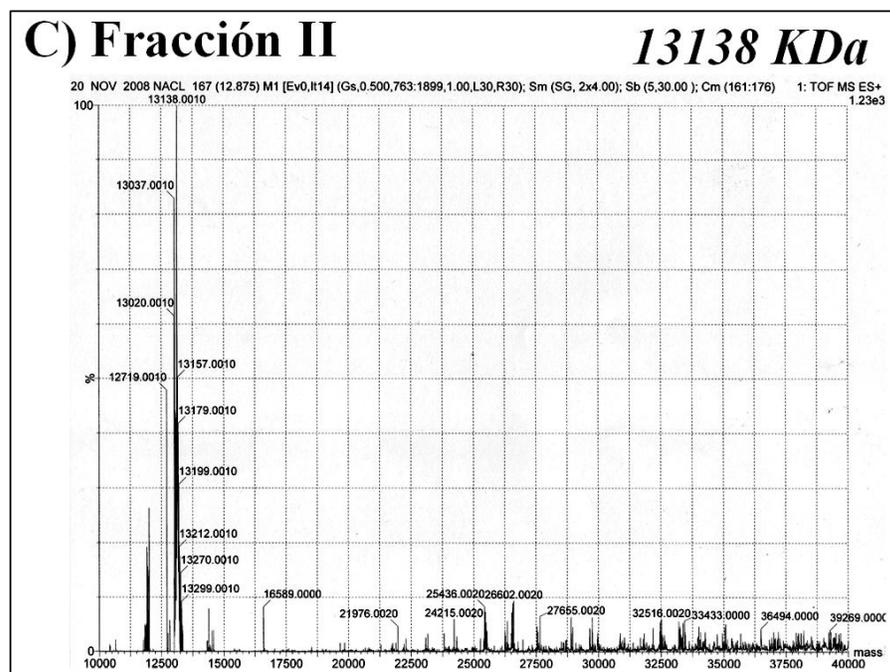
U = 1 pmol de FC hidrolizada por la FLA₂. % Recuperación = Actividad Total posterior a la purificación x 100/ Actividad Total previa a la purificación. Factor de Purificación = Act. Específica posterior a la purificación/Act. Específica previa a la purificación.



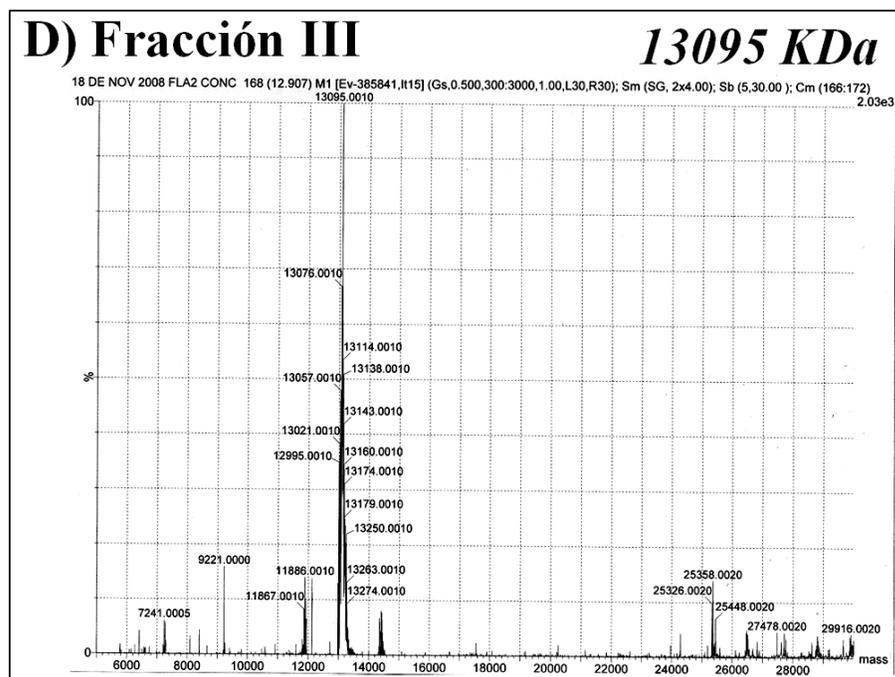
Proteína de 8 KDa que no es retenida por la columna de afinidad durante la fase de introducción de la muestra en amortiguador con CaCl_2 .



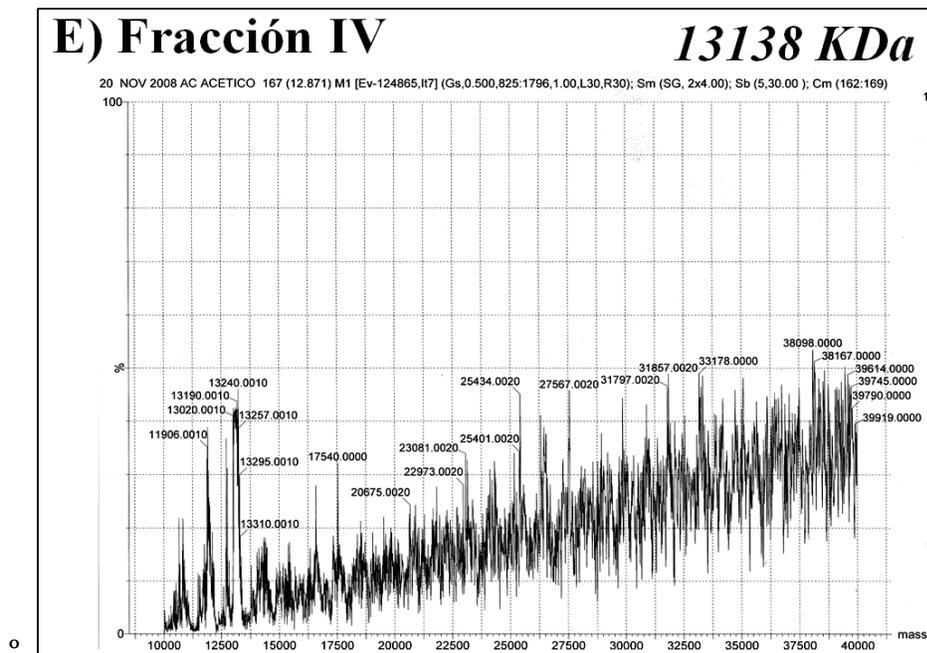
Proteína de 13 KDa que no es retenida por la columna de afinidad por saturación del ligando, durante la fase de introducción de la muestra en amortiguador de acetatos con CaCl_2 4 mM.



Proteína de 13 KDa presente en la fracción de elución con amortiguador de acetatos con NaCl 0.5 M.



Proteína de 13 KDa presente en la fracción de elución con amortiguador de acetatos con EDTA 50 mM.



Proteína de 13 KDa presente en la fracción de elución con Ac. Acético 0.1 M y estabilizada en amortiguador de acetatos 1 M.

Figura 20. Deconvolución de espectros de masas de las fracciones de cromatografía de afinidad de FUF30 3X a pH 6.0 de *S30 T. vaginalis*. A) y B) Señal correspondiente a la proteína de 8 KDa identificada como Ubiquitina putativa y la proteína de 13 KDa con actividad de FLA₂ respectivamente, presentes en la FUF30 3X posteriores a la introducción de la muestra a la columna de afinidad. C) Señal correspondiente a la proteína de 13 KDa con actividad de FLA₂ que no es retenida por la columna de afinidad. D) Señal de la proteína de 13 KDa con actividad de FLA₂ dependiente de calcio. E) Señal correspondiente a la proteína de 13 KDa con actividad de FLA₂ independiente de calcio.

Se utilizó la fracción de EDTA de la cromatografía de afinidad de FUF30 3X de S30 a pH 6.0 con actividad de FLA₂ dependiente de calcio para realizar los ensayos de caracterización parcial y corroborar si las características analizadas corresponden con las de las FLA₂ estudiadas.

8.13.3 Curva Temporal de Actividad de FLA₂.

La actividad de FLA₂ en EDTA aislada de la FUF30 3X por cromatografía de afinidad a pH 6.0 fue dependiente del tiempo de incubación; no se observó fase Lag, alcanzando un máximo de actividad a los 60 minutos. En todas las determinaciones

utilizamos 112 ng (en 10 μL) de la proteína en EDTA por ser el valor máximo que permitieron las condiciones experimentales. (Fig. 21.)

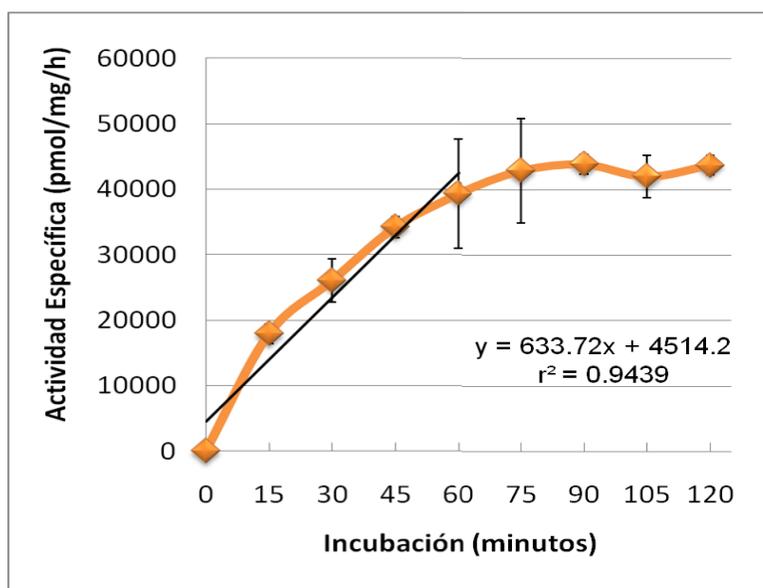


Figura 21. Curva temporal para la FLA₂ dependiente de calcio de *T. vaginalis*. Se realizaron mezclas de reacción de 20 μL con 10 μL de muestra (112 ng) y 10 μL de sustrato [¹⁴C]-FC a pH 6.0 en presencia de CaCl₂ 1 mM que se incubaron a diferentes tiempos desde 15 min hasta 2 horas en intervalos de 15 min. Se realizaron tres experimentos por duplicado.

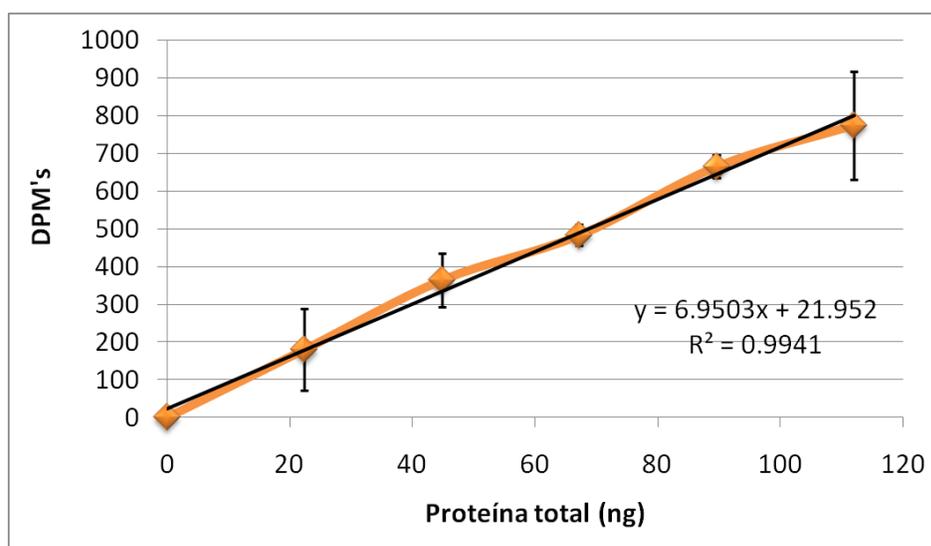


Figura 22. Curva Dosis-Respuesta de la FLA₂ aislada dependiente de Calcio a pH 6.0. La fracción de EDTA presenta actividad de FLA₂ dependiente de la dosis de proteína. Después de 2 horas de incubación a 36.5 °C. Determinamos la actividad específica en mezclas de reacción con el sustrato específico [¹⁴C]-FC y cantidades variables de la fracción en EDTA con la FLA₂ aislada en mezclas de reacción de 20 μL . Cada símbolo corresponde a la media y desviación estándar de 6 determinaciones en 3 experimentos independientes.

8.13.4 Curva Dosis-Respuesta de Actividad de FLA₂.

Se realizaron mezclas de reacción de 20 μL desde 0 a 122 ng en 10 μL de muestra en EDTA obtenida de la cromatografía de afinidad de FUF30 3X con 10 μL de sustrato específico [¹⁴C]-FC a pH 6.0 en presencia de CaCl₂ 1 mM que se incubaron durante 2 horas. Determinamos la actividad de FLA₂ y observamos que ésta se incrementó proporcionalmente con concentraciones crecientes de la muestra (Fig. 22). Obtuvimos la ecuación de regresión ($y=6.9503x + 21.952$) con una r^2 de 0.9941.

8.13.5 Curva de pH de la Actividad de FLA₂.

Se realizaron mezclas de reacción 1:1 de 10 μL de muestra con 10 μL de sustrato específico [¹⁴C]-FC preparado a diferentes valores de pH 4.0, 5.0 y 6.0 con amortiguadores de acetatos, y pH 7.0, 8.0 y 9.0 con Tris-base 0.1 M en presencia de CaCl₂ 1 mM. Las mezclas se incubaron por 2 horas y se determinó la actividad de FLA₂. La FLA₂ dependiente de calcio presentó su máxima actividad a pH 6.0 como se observa en la figura 23, si bien, tiene una actividad significativa en el rango de pH de 6.0 a 7.0.

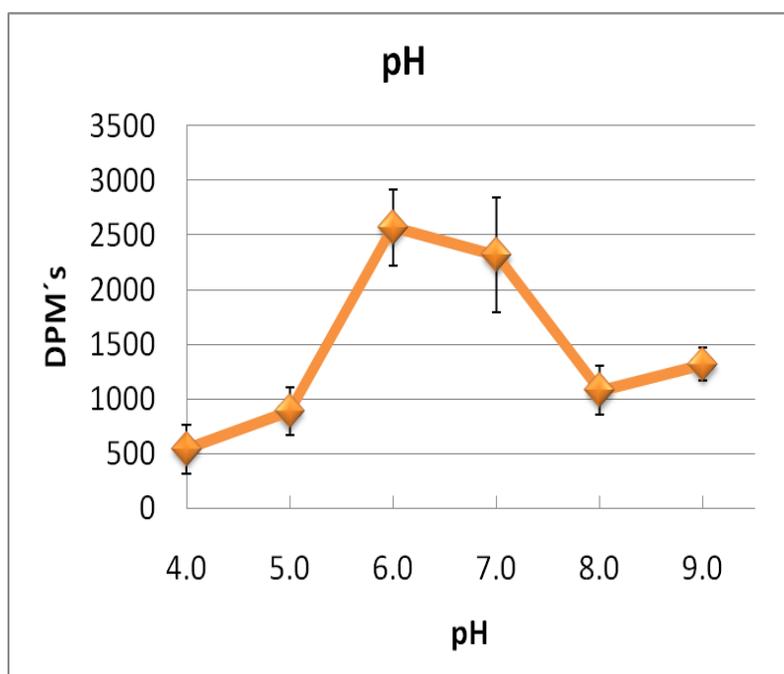


Figura 23. Actividad de FLA₂ a diferentes valores de pH. La fracción en EDTA obtenida de la FUF30 3X de S30 presenta actividad de FLA₂ del tipo ácido. Determinamos la actividad de FLA₂ en mezclas de reacción con 122 ng de proteína total (10 μL) de muestra ajustadas a diferentes valores de pH a las cuales se les adicionó el sustrato específico [¹⁴C]-FC y se incubó durante dos horas. La actividad de FLA₂ se determinó por método de radioensayo. Los símbolos corresponden a la media y desviación estándar de 6 determinaciones en tres experimentos independientes.

8.13.6 Efecto del Calcio sobre la Actividad de FLA₂.

Se realizaron mezclas de reacción 1:1 con la muestra y el sustrato específico [¹⁴C]-FC que se incubaron durante 2 horas en presencia de CaCl₂, con concentraciones desde 1 - 3 mM y en ausencia de este catión. Encontramos que como ocurre para la mayoría de las FLA₂, su óptimo de actividad es en presencia de una concentración de CaCl₂ 1 mM, y que con las demás concentraciones, incluso la de 0 mM si hay actividad aunque en menor proporción. (Figura 24)

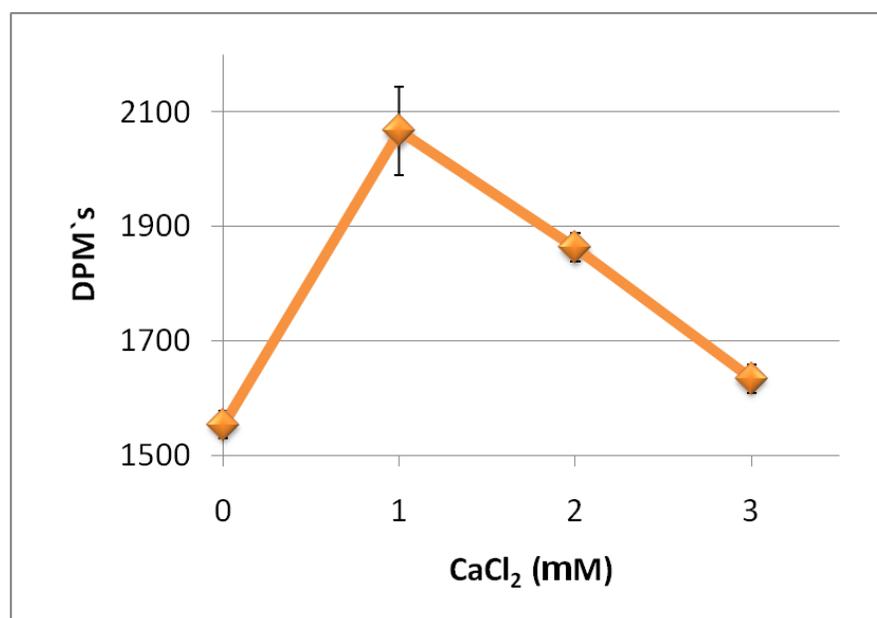


Figura 24. Efecto de la concentración de CaCl₂ en la actividad de FLA₂. Determinamos la actividad de FLA₂ de la fracción de EDTA obtenida por cromatografía de afinidad de la FUF30 3X de S30 de 48 hrs a pH 6.0. Hicimos mezclas de ensayo con 10 µL de muestra (122 ng de proteína total) y 10 µL de sustrato específico [¹⁴C]-FC en presencia de concentraciones variables de cloruro de calcio las cuales incubamos a 36.5 °C durante 2 horas. Cuantificamos la actividad de FLA₂ por el método de radioensayo. Los símbolos corresponden a la media y desviación estándar de 6 determinaciones en 3 experimentos independientes.

8.13.7 Actividad Hemolítica de la FLA₂.

Determinamos la actividad hemolítica directa sobre eritrocitos de rata (Sprague-Dowley) de nuestra FLA₂ en presencia de CaCl₂ 1 mM. Para ello realizamos mezclas de reacción con la FLA₂ y una suspensión de eritrocitos de rata y verificamos su actividad en el tiempo, su efecto según la dosis de proteína y el efecto del IR sobre la hemólisis.

8.13.7.1 Curva Temporal de Hemólisis de la FLA₂.

La actividad hemolítica de la FLA₂ se determinó incubando las mezclas de reacción en lapsos de 15 min hasta una hora, y se leyó la absorbancia a 415 nm, previa centrifugación de las suspensiones (Ver sección 7 de Métodos). En la figura 25 podemos observar que la actividad hemolítica de la FLA₂ a pH 6.0 fue directa sobre los eritrocitos y proporcional con el tiempo de incubación de las mezclas hasta 1 hora, tiempo en el cual se llegó al 100% de hemólisis (0.8 unidades de absorbancia a 415 nm).

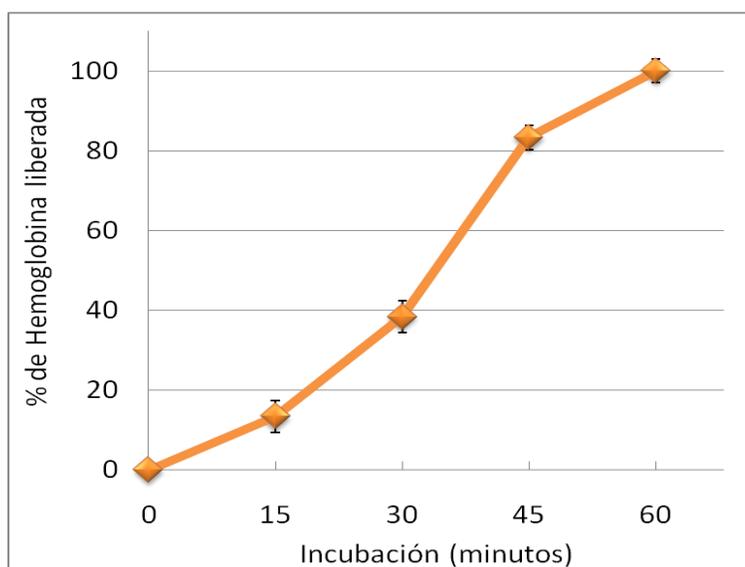


Figura 25. Curva temporal de la actividad hemolítica de la FLA₂ sobre eritrocitos de rata a pH 6.0. La fracción en EDTA obtenida por cromatografía de FUF30 3X de S30 de 48 hrs a pH 6.0 presentó actividad hemolítica dependiente del tiempo de incubación cuando se midió a tiempos variables de incubación. Determinamos el porcentaje de hemoglobina liberada en las mezclas de reacción con 25 μ L de eritrocitos de rata en suspensión al 1% frente a 25 μ L de muestra de EDTA con 30 μ g de proteína total. Todas las determinaciones se hicieron en las mismas condiciones y se incubaron durante 60 minutos como se muestra en la gráfica, tiempo en el cual se alcanzó el 100 % de hemólisis. Los símbolos corresponden a la media y desviación estándar de ocho determinaciones en cuatro experimentos independientes.

8.13.7.2 Curva Dosis-Respuesta de Hemólisis de la FLA₂.

La hemólisis producida por la FLA₂ dependiente de calcio a pH 6.0 se incrementó con respecto a la dosis de manera lineal, alcanzando un 100% a la hora de incubación con 30 μ g de proteína total de la fracción de EDTA obtenida de FUF30 3X de S30 de 48 hrs (Fig. 26).

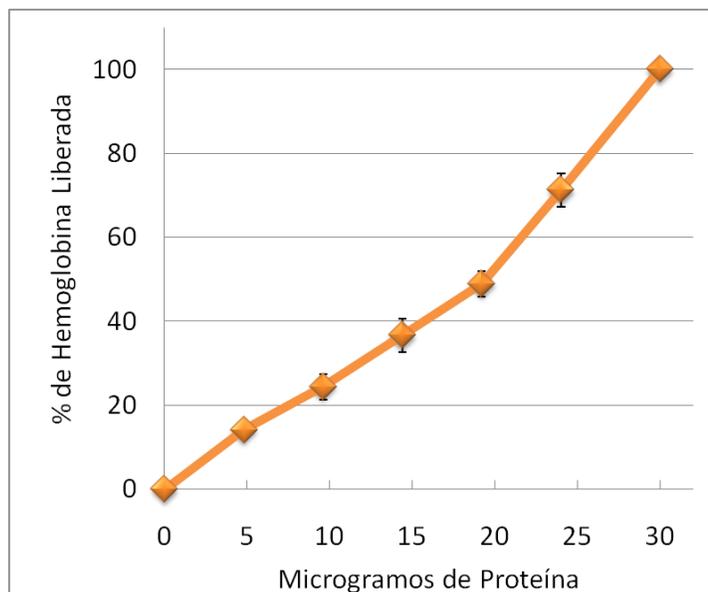


Figura 26. Curva de actividad hemolítica de la FLA₂ sobre eritrocitos de rata a pH 6.0. Después de 1 hora de incubación a 36.5 °C determinamos el porcentaje de hemólisis en mezclas de reacción con una suspensión de eritrocitos al 1% y cantidades variables la FLA₂ aislada por cromatografía de afinidad suspendida en SSB. Cada símbolo corresponde a la media y desviación estándar de 8 determinaciones en 4 experimentos independientes.

8.13.7.3 Efecto del Inhibidor de Rosenthal sobre la Actividad Hemolítica de la FLA₂.

Determinamos el efecto del IR sobre la actividad hemolítica de la fracción en EDTA con FLA₂. Realizamos este estudio con 25 µg de proteína total la cual puede hemolizar hasta el 75% de la suspensión de eritrocitos al 1% después de 1 hora de incubación. Las muestras se preincubaron durante 30 min a 36.5 °C con varias concentraciones de IR. La máxima concentración fue de 120 µM. En la figura 27 podemos observar que este inhibidor disminuye importantemente la liberación de hemoglobina producida por la muestra con FLA₂ a una concentración de 40 µM, en la cual se alcanza una inhibición de aproximadamente el 83 % de la actividad la cual se mantiene aun con mayores concentraciones del IR. Para este ensayo la dosis inhibitoria media fue de 15 µM.

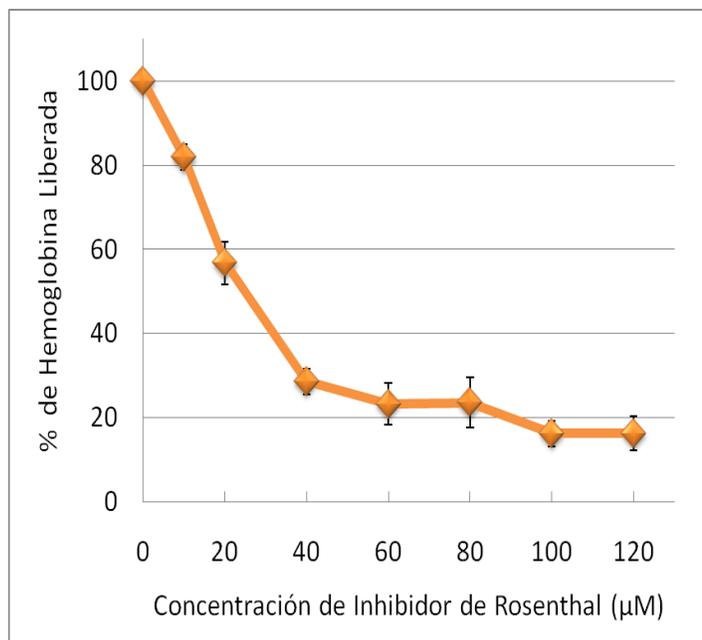


Figura 27. Efecto del IR sobre la actividad hemolítica de FLA₂ en eritrocitos de rata. Determinamos el porcentaje de hemoglobina liberada por 25 μg de proteína total de muestra preincubada con diferentes concentraciones de IR durante 30 min e incubada 1 hora con una suspensión de eritrocitos al 1 %. Cada símbolo corresponde a la media y desviación estándar de seis determinaciones en tres experimentos independientes.

9. DISCUSIÓN

La virulencia de los microorganismos, incluyendo a los protozoarios es un fenómeno muy complejo que depende de dos propiedades generales: invasividad y la toxigenicidad (Fulford and Marciano-Cabral, 1986; Saffer *et al.*, 1989; Parkhomenko y Open'ko, 1990; Peterson, 1996; Bhanot *et al.*, 2005). La virulencia de *Trichomonas* parece depender de ambas propiedades, ya que su efecto destructivo se lleva a cabo por su gran capacidad para proliferar y destruir tejidos del huésped (Escario *et al.*, 2010), así como hacer daño a distancia (Pindak *et al.*, 1993) o de manera contacto-dependiente. En ambos casos las lesiones se han atribuido principalmente a actividades enzimáticas del tipo cisteín-proteinasas (Alvarez-Sanchez *et al.*, 2000). Sin embargo existen diversos reportes de otras actividades enzimáticas como las de las FLA₂, las cuales resultan indispensables en este parásito puesto que es incapaz de sintetizar de novo fosfogliceridos (Beach *et al.*, 1991). A la fecha son pocos los reportes que nos hablan de la presencia de estas actividades en *T. vaginalis* por lo que hasta que se hayan identificado y estudiado plenamente, podrá especularse su papel en algún mecanismo patogénico como es la citotoxicidad y la lisis celular.

Las FLA₂ de bajo peso molecular (secretorias) que han sido ampliamente estudiadas se han purificado principalmente a partir de venenos de serpientes e insectos en donde éstas se encuentran de manera soluble y en abundante cantidad (Heinrikson *et al.*, 1977; Dennis, 1994), sin embargo, se han logrado aislar a partir de organismos tan diversos como venenos de cobras, serpientes de cascabel, víboras, abejas, lagartos, plasma, páncreas, corazón y pulmón humanos, y caracoles marinos (Dennis, 1997).

Vargas-Villarreal y colaboradores en el 2003 demostraron actividad hemolítica en homogenados de *Trichomonas vaginalis*. Dicha actividad encontrada, fue 2.06 veces

mayor a pH 6.0 que a pH 8.0, interesantemente los eritrocitos de rata (Sprague Dawley) fueron más susceptibles a esta actividad, que los eritrocitos humanos. Esta actividad solo se encontró en el extracto total, así como en la fracción P30 del homogenado (Vargas-Villarreal, 2003). Esta fracción P30, está compuesta de vesículas, vacuolas e hidrogenosomas cuando se observo una muestra bajo el microscopio electrónico de transmisión.

Después, en el año 2005 Vargas-Villarreal y colaboradores demostraron que la fracción subcelular S30 también presentaba actividad hemolítica obtenida de un homogenado de *T. vaginalis*, pero esta actuaba de forma indirecta, es decir, requiere de una co-incubación con fosfatidilcolina para que se liberen los ácidos grasos libres y estos puedan destruir la membrana plasmática de los eritrocitos. Dicha actividad, además era disminuida en forma importante por la presencia de un inhibidor específico de FLA₂ como es el Inhibidor de Rosenthal.

Para iniciar este trabajo de tesis, elegimos a la cepa GT-15 de *Trichomonas vaginalis* por ser la cepa que produce mayor rendimiento en los cultivos y porque es la cepa más virulenta que se tiene en cultivo (Padilla-Vaca y Anaya-Velázquez, 1997). Además en esta cepa se han detectado y cuantificado las actividades hemolíticas y fosfolipásicas A₂ (Vargas-Villarreal *et al.*, 2003). De acuerdo con lo anterior, descongelamos una cepa que estaba criopreservada desde hace 13 años en el cepario del laboratorio de Fisiología Celular y Bioquímica del CIBIN y la cepa fue pasada a medio nuevo completo para su crecimiento. Con esto nos aseguramos que la cepa tuviera las características fenotípicas iniciales de dicha cepa.

Se realizaron curvas de crecimiento en medio PEHPS (Said-Fernández *et al.*, 1988) con las cuales se determinó el inóculo y los días de incubación necesarios para tener a *T. vaginalis* cepa GT-15 de manera masiva y en buenas condiciones fisiológicas en nuestro laboratorio, así como para obtener la destreza en el manejo de los cultivos de este protozoario en forma axénica. Con las curvas de crecimiento desarrolladas encontramos un tiempo generación de 10.36 h, un tiempo de duplicación de 7.18 h con un inóculo de

5,000 trofozoítos/mL. Lo anterior no es comparable con otros reportes puesto que no se han utilizado las mismas condiciones experimentales. Sin embargo, existen estudios previos del crecimiento de *T. vaginalis* en medio PEHPS comparándolo con el crecimiento observado en el medio convencional TYI-S-33 en los cuales se obtienen parámetros de crecimiento sin diferencias significativas entre ellos ($P < 0.001$, Castro-Garza *et al.*, 1996). Con los datos obtenidos definimos 2 días de incubación como el tiempo necesario para tener a este parásito en su fase logarítmica y con la mayor cantidad de biomasa posible de este protozoario aun en condiciones fisiológicas (ver figura 5).

En los antecedentes de hemólisis usando el inhibidor de Rosenthal se vio que era un potente inhibidor de la actividad hemolítica (Vargas-Villarreal *et al.*, 2003). De esta manera y en ausencia de datos que indiquen otro mecanismo de acción, los resultados con el IR de la hemólisis producida por las fracciones subcelulares de *T. vaginalis* sugieren que una o varias fosfolipasas A están involucradas en el mecanismo lítico ejercido por dichas fracciones.

Con base en estos antecedentes, usamos al IR como ligando para realizar una columna de afinidad específica para purificar FLA en general. Para comprobar la eficiencia de esta columna de afinidad usamos venenos totales de dos serpientes, *Crotalus basiliscus* y *C. adamanteus* de las cuales sabemos por reportes (Heinrikson *et al.*, 1977) y experiencia previa que sus venenos poseen una gran actividad de FLA₂. Los ensayos realizados con ambos venenos nos permitieron purificar la FLA₂ de manera específica, aun cuando el porcentaje de recuperación para ambos venenos fue bajo (14 y 3% ver Tablas 4 y 5). Además confirmamos su pureza realizando un análisis con SDS-PAGE, donde encontramos una sola banda en el carril 6 (ver figura 4) para el caso de la FLA₂ de *C. adamanteus*. La fracción de *C. basiliscus* no mostró una banda visible con SDS-PAGE (datos no mostrados) y debido a que no existen reportes previos del análisis de la composición de este veneno, se procedió a dejar de lado este resultado puesto que no corresponde con el objetivo de esta tesis investigar la razón del por qué no se identificó banda alguna. Siendo así, con los resultados verificamos que la columna de

afinidad estaba funcionando perfectamente de acuerdo a lo reportado en la literatura (Vargas-Villarreal *et al.*, 1991).

El primer paso en la purificación de una FLA₂ soluble a partir de *T. vaginalis* fue encontrar la fracción subcelular a partir de la cual pudiéramos purificarla y determinar las mejores condiciones para mantener su actividad enzimática durante este proceso.

Probamos dos posibles fracciones subcelulares provenientes de *T. vaginalis* frente al IR para comprobar su efecto inhibitorio y por lo tanto la capacidad de retener alguna FLA₂ en la columna de afinidad: fracción soluble S30 y medio de cultivo usado obtenidos a pH 6.0 y 8.0 (Figura 6). Encontramos que la actividad en la fracción del medio usado fue 4 veces mayor a pH 8.0 que con la obtenida a pH 6.0 y en la fracción S30 fue igual en ambos valores de pH; no observamos una disminución clara de actividad usando 300 μ M del IR en ninguna fracción, por lo cual pudiera estar ocurriendo que: a) el IR se estuviera integrando a las miscelas lipídicas presentes en la mezcla de reacción (S30 y sustrato FC) o b) no ocurrió la interacción entre el IR y la FLA₂ debido a que el estado conformacional del sustrato (el IR) no fuese el apropiado para esta FLA₂ en la fracción con S30.

No se han reportado estudios que amplíen la información acerca del mecanismo específico de acción del Inhibidor de Rosenthal, de tal manera que no es posible determinar qué es lo que está sucediendo en la reacción, sin embargo, se ha comprobado su efecto frente a fracciones subcelulares de *Giardia lamblia*, en los cuales se observó una inhibición específica de la actividad de FLA₂ de entre un 45 y 85 % de la actividad inicial (Vargas-Villarreal *et al.*, 2007), lo cual garantiza que la suspensión con el Inhibidor de Rosenthal integrado en miscelas tiene efecto en esas condiciones y que el nulo efecto inhibitorio en nuestros experimentos es debido a la naturaleza propia de las fracciones subcelulares ensayadas.

Por las características encontradas anteriormente, se eligió al Medio de cultivo usado a pH 8.0 para intentar, por primera vez, la purificación de una FLA₂ soluble mediante

cromatografía de afinidad. Lamentablemente encontramos que en los ensayos de actividad con las muestras de medio de cultivo usado no obtuvimos una actividad importante que nos permitiera aislarla y caracterizarla. Una posibilidad de incrementar la actividad era concentrar nuestra proteína de interés, una FLA₂ y así minimizar cualquier efecto de inhibición de la actividad. Hay que recordar que el medio usado, por sus componentes no definidos puede presentar factores intrínsecos que se sabe que atenúan la virulencia como la alfa-macroglobulina presente en los sueros (Miesch *et al.*, 1971), o la albúmina que secuestra a los ácidos grasos (Bernard y Dubos, 1947).

En base a estos resultados intentamos concentrar la actividad usando cartuchos de ultrafiltración con membrana de corte según peso molecular. Por las características de las FLA₂ en general, se sabe que estas tienen pesos moleculares que van desde los 13 hasta los 18 KDa (Dennis, 1994), por lo cual decidimos usar membranas de corte de 10 y 30 KDa.

Aunque pudimos concentrar la muestra con el corte de 10 KDa 2 veces la actividad de FLA₂ para el medio de 48 hrs y poco más de 3 veces para el medio de 72 hrs, ésta no fue satisfactoria (Fig. 8), y cuando determinamos si el IR, podía disminuir dicha actividad, encontramos que las fracciones retenidas no presentaron disminución en su actividad con el IR (Fig. 9), por lo que concluimos que quizá el tipo de FLA₂ presente en el medio usado no es susceptible al efecto del IR en nuestras condiciones y por lo tanto no sería factible su aislamiento por cromatografía de afinidad.

Aun así, ensayamos la actividad de FLA₂ con membrana de corte de 30 KDa únicamente para el medio de 72 hrs por mostrar éste una mayor actividad de FLA₂ inicial con respecto al de 48 hrs y encontramos que la actividad presente se distribuyó hasta en un 95% en la fracción retenida y un 5% en la fracción ultrafiltrada, y que ninguna de éstas disminuyó en presencia de 100 µM de IR (Fig. 10). Cuando utilizamos la membrana de corte de 10 y 30 KDa consecutivamente tampoco recuperamos actividad importante de FLA₂. Esto confirmó una vez más el nulo efecto del IR sobre las FLA₂ solubles presentes en el medio de cultivo usado de *T. vaginalis*, sin embargo nos abrió la

posibilidad de que la principal actividad de FLA₂ presente en el medio de cultivo estuviera dada por enzimas de un peso molecular mayor al esperado lo cual puede ser por polimerización de monómeros de FLA₂, situación muy común y ampliamente descrita para las FLA₂ de serpientes como *Crotalus durissus terrificus* y *Bothrops neuwiedi pauloensis* (Marchi-Salvador *et al.*, 2008; Magro *et al.*, 2003) y en las FLA₂ bacterianas de *Escherichia coli*, *Campilobacter* y *Helicobacter pylori* (Stanley *et al.*, 2006; Snijder *et al.*, 1999) o que correspondiera a las descritas como citosólicas estudiadas principalmente en humanos, ratas, perros y con pesos moleculares que van desde los 40 hasta los 85 KDa. (Dennis, 1994).

Para determinar si lo anterior era cierto, usamos membranas de ultrafiltración de 50 y 100 KDa y los resultados arrojaron que se disminuía desde un 90 hasta un 100% de la actividad posterior a la ultrafiltración (datos no mostrados) por lo que podemos suponer que el 10% de la actividad o estaba dada por enzimas de peso molecular mayor a 50 KDa, o en la fracción retenida estábamos obteniendo enzimas de pesos moleculares bajos y que se adsorbieron inespecíficamente a la membrana de ultrafiltración. Un caso de este tipo fue reportado por Terao *et al.* (2004) en el que se observó adsorción inespecífica de FLA₂ circulantes en plasma, sobre la membrana de hemodiafiltración veno-venosa en 10 pacientes con falla renal aguda séptica. En nuestras muestras, no se realizó análisis de espectrometría de masas por lo que se desconocen las características de las probables FLA₂ presentes en las fracciones obtenidas.

Aun con los resultados anteriores, probamos la actividad de la fracción retenida de 30 KDa en la columna de afinidad, ya que se sabe que muchas veces la forma de presentación del sustrato (en miscelas o asociado a una fase sólida) que en este caso es el IR, es un punto clave en la interacción que pueda existir entre éste y la enzima (Dennis, 1973). Encontramos muy baja actividad en algunas de las fracciones de cromatografía lo cual era un resultado esperado debido al casi nulo efecto del IR sobre las FLA₂ de las fracciones ensayadas previamente en tubo.(Fig. 11, Tabla VI). Además de esto, hubo pérdida total de la actividad en las fracciones de cromatografía cuando se realizaron ensayos consecutivos de actividad; esto pudo deberse probablemente a una inestabilidad

de la enzima, ya sea por el fenómeno de congelación-descongelación y/o por las características fisicoquímicas del medio en el que se encuentra, las cuales, pudieran no ser las óptimas en su criopreservación. Se han encontrado reportes de que la actividad de FLA₂ disminuye con la temperatura. Este tipo de enzimas se encuentra presente en los cilios del parásito *Tetrahymena piriformis*, involucrada en el recambio fosfolipídico y su actividad se mostró importantemente reducida cuando éstos se sometieron a una temperatura de 15 °C, a diferencia de su alta actividad a los 39°C, por lo cual se postula como un mecanismo regulatorio del recambio fosfolipídico (Ramesha and Thompson, 1984). Por otro lado, en el caso de las FLA₂ en venenos de serpiente, se ha encontrado que componentes propios del veneno protegen de la hidrólisis a sus proteínas, incluidas las FLA₂, cuando se han sometido a condiciones extremas de temperatura durante largos plazos de tiempo (Munekiyo and Mackessy, 1998). Esto nos hace pensar que las condiciones de nuestras fracciones no eran las óptimas para la criopreservación de nuestra FLA₂ por lo que se procedió a intentar la purificación a partir de una fracción diferente.

Debido a que la purificación de una FLA₂ a partir del medio de cultivo usado de *T. vaginalis* no fue factible por las razones ya expuestas anteriormente, se procedió a probar con la fracción S30. Sabíamos por estudios previos en la cepa GT-13 de *T. vaginalis* que esta fracción presentaba dos actividades de FLA₂ a diferentes valores de pH, una a 6.0 y otra a 8.0 (Vargas-Villarreal *et al.*, 2005). Esto nos permite suponer que podrían ser FLA₂ de igual peso molecular pero con diferente PI como sucede en algunas FLA₂ de venenos de serpientes (Heinrikson, 1977) o que simplemente fueran diferentes FLA₂.

Decidimos iniciar la purificación de una FLA₂ utilizando la S30 a pH 8.0 puesto que no existeno datos mas relevantes en parásitos ya que las FLA₂ básicas son de las más letales en los venenos de serpientes (Rodriguez *et al.*, 2006). Cuando corroboramos la actividad de las fracciones obtenidas en tres ensayos por triplicado observamos el mismo efecto como en el medio usado de pérdida de la actividad en el tiempo (datos no mostrados).

Por otro lado la otra fracción que nos quedaba por ensayar era la S30 a pH 6.0. Esta fracción era muy prometedora ya que las *T. vaginalis* crecen mejor alrededor de pH 6.0 y además presenta mayor actividad de FLA₂ que a pH 8.0. Cuando obtuvimos la fracción S30 a pH 6.0, encontramos valores excelentes de DPM's correspondientes a la actividad de FLA₂, y procedimos a realizar un ensayo con la columna de afinidad. La recuperación proteica en la fracción de EDTA fue relativamente buena ya que alcanzamos a tener 33.1 µg de proteína total con 8 056 U/mg de actividad específica (ver Tabla VII).

Este resultado nos mostró que S30 a pH 6.0 posee una FLA₂ factible de ser purificada por cromatografía de afinidad, por lo que procedimos a definir las mejores condiciones para su aislamiento y purificación a homogeneidad y lograr su caracterización parcial.

Una vez que definimos las mejores condiciones para intentar la purificación de la FLA₂ de la S30 obtenida a pH 6.0, realizamos una purificación a una nueva fracción S30 comenzando con 137 mg de proteína total. La fracción obtenida en EDTA en esta cromatografía presentó aproximadamente 12.7 µg de proteína total (según absorbancia a 280 nm) con una actividad específica de 178 425 unidades/mg y un factor de purificación de 328 (ver Tabla VIII).

Para demostrar su pureza, sometimos a las fracciones obtenidas de la columna de afinidad a un análisis de SDS-PAGE y en condiciones de tinción con nitrato de plata cuya sensibilidad abarca hasta el orden de los ng de proteína total (Blum *et al.*, 1986) no observamos ninguna banda. Esto fue probablemente debido a la baja concentración protéica de nuestra muestra analizada la cual teóricamente debía de ser de 31.75 ng, sin embargo, debido a la naturaleza desconocida de las proteínas presentes en nuestra muestra, es probable que la concentración protéica estimada no haya sido la real, sino mucho menor.

De esta fracción eluída con EDTA realizamos un análisis de proteínas por espectrometría de masas acoplado a cromatografía de líquidos de alta resolución.

Para adquirir experiencia en este tipo de análisis, previo al estudio de nuestra muestra, utilizamos un control de enzima FLA₂ ampliamente estudiada y caracterizada que obtuvimos mediante cromatografía de afinidad del veneno total de *C. adamanteus* y la analizamos (Fig.3).

La FLA₂ de *C. adamanteus* eluída de la columna de afinidad y concentrada por ultrafiltración con membrana de 5 KDa se analizó identificándose la presencia de una proteína. En el análisis del espectro de masas encontramos que en el rango de masas de 2 a 100 KDa solo estaba presente un tipo de proteína de peso molecular alrededor de los 15 KDa (14,850 Da) correspondiente a la FLA₂ de *C. adamanteus* (Fig. 15). Este hallazgo coincide con el peso molecular previamente reportado para esta FLA₂ (Heinrikson, 1977).

Cuando empleamos la fracción de EDTA y la tratamos de la misma manera que nuestra muestra control, no observamos ninguna señal a 280 nm, por lo que pensamos que nuestra muestra podía estar demasiado diluída. Otra posibilidad era que estábamos perdiendo nuestra proteína por adsorción inespecífica en la membrana de ultrafiltración, lo cual se ha reportado previamente (Terao *et al.*, 2004) debido a que no se encontró actividad de FLA₂ en la fracción retenida cuando se analizó por radioensayo. Decidimos omitir la ultrafiltración y realizar la introducción directa de la muestra con actividad de FLA₂ en EDTA proveniente de la cromatografía de afinidad en el espectrómetro de masas. Encontramos una sola proteína de peso molecular aproximado a los 13 KDa (ver Fig. 16). Finalmente, de esta manera pudimos relacionar esta proteína presente en nuestra fracción con EDTA con la actividad de FLA₂ dependiente de calcio.

El genoma de *T. vaginalis* presenta características bioquímicas inusuales, como es el tamaño anormalmente grande de 160 Mb y su comparación con otros organismos comunes ha permitido identificar una importante cantidad de proteínas ortólogas y parálogas (Satendra *et al.*, 2012), sin embargo contrario a lo que pudiera pensarse, no se ha encontrado variabilidad genética importante entre cepas (Valadkhani *et al.*, 2011). Para continuar con el análisis de secuencias, sometimos nuestras muestras en EDTA de

T. vaginalis y de *C. adamanteus*, esta última utilizada como muestra control, a digestión con tripsina y las analizamos por CLAR/EM en tándem para la identificación de secuencias parciales. Al hacer un blast de las secuencias obtenidas para *C. adamanteus* plenamente se identificó como una FLA₂. Para nuestra muestra no obtuvimos ninguna secuencia significativa. Una razón probable para esto era la baja concentración protéica y por lo tanto peptídica en nuestra muestra.

Con el fin de incrementar la concentración inicial de FLA₂ para su aislamiento, retomamos la fracción original S30, ultrafiltramos y evaporamos con N₂, y encontramos que en la fracción obtenida denominada FUF30 3X se identificaban dos proteínas: una de alrededor de 8 KDa con un T_R de 5.612 min y otra de aproximadamente 13 KDa con un T_R de 7.019 min. por lo que pudimos obtenerlas de manera separada para su posterior análisis de secuencias peptídicas. Los resultados (Tabla IX) del análisis de bioinformática (software MassLynx (v4.0)). La información fue procesada con el software ProteinLynx global Server, version 2.2, el cual utiliza la base de datos Swissprot-MASCOT), utilizado para la obtención de secuencias peptídicas identificó a la proteína de peso molecular de 8 KDa como una proteína llamada Ubiquitina, la cual es una proteína de eucariotas altamente conservada y ya bien identificada en *T. vaginalis* (Keeling and Doolittle, 1995). Ésta forma parte de un sistema proteolítico no lisosomal dependiente de ATP cuya función es la de marcar y mediar la lisis de proteínas al conjugarse con ellas (Ciechanover and Schwartz, 1994).

Para la proteína de peso molecular de aproximadamente 13 KDa solo obtuvimos una secuencia que nos permitió identificarla como Proteína Hipotética Conservada, sin relación alguna a secuencias de FLA₂ ya identificadas en otros organismos. Incluso el análisis de dominios correspondientes al sitio catalítico fue negativo. Este resultado es interesante puesto que hasta la fecha las FLA₂ más estudiadas presentan un importante grado de secuencias conservadas (Nevalainen *et al.*, 2012)

Para la caracterización parcial de la actividad de la FLA₂, ésta se obtuvo de manera homogénea por cromatografía de afinidad utilizando al inhibidor de Rosenthal como

ligando. Ésta técnica ya había sido previamente utilizada por Vargas-Villarreal *et al.* (1991) quienes lograron aislar la FLA₂ a partir de venenos de *Heloderma horridum horridum* y *Crotalus adamanteus*. El fundamento de éste procedimiento es la interacción específica enzima-sustrato que se da entre la FLA₂ de interés y el inhibidor de Rosenthal el cual es un análogo no hidrolizable de la fosfatidilcolina y que es acoplado a Sefarosa 4B activada con bromuro de cianógeno.

Con el fin de confirmar que la actividad de FLA₂ estaba dada por la proteína de 13 KDa, era necesario aislarla y determinar si poseía esta actividad. Para ello era necesario evaluar si esta proteína era factible de ser purificada mediante cromatografía de afinidad. Realizamos ensayos *in vitro* de la fracción FUF30 3X frente al IR y encontramos que solo 40% de la actividad presente se inhibía frente a este compuesto como podemos apreciar en la figura 18. Este hallazgo nos habla de

En la figura 19 observamos que la actividad de FLA₂ se encontraba presente en las 4 fracciones, sin embargo hubo un incremento significativo de la actividad específica a partir de la primera fracción de lavado con NaCl la cual disminuyó en la fracción de elución específica con EDTA y el lavado final con Ac. Acético. Nos avocamos a trabajar con la fracción obtenida con EDTA, porque esta era la fracción con mayor probabilidad de ser altamente homogénea en su contenido protéico.

Sometimos las 4 fracciones obtenidas de la columna de afinidad al análisis de espectrometría de masas y como lo esperábamos en la fracción con EDTA un único pico correspondiente a la proteína de 13 KDa. El resto de las fracciones también presentó picos correspondientes a proteínas de pesos moleculares presentes en la fracción inicial (8 y 13 KDa) sin embargo estas no fueron consideradas debido a que no cumplen con el requerimiento de calcio para la interacción entre enzima y sustrato, específico de las FLA₂ (Dennis, 1994).

El análisis de la actividad de FLA en fracciones subcelulares de parásitos ha sido estudiado ampliamente por Vargas-Villarreal *et al.* (2005). Ellos reportaron la actividad

temporal de FLA₂ en la fracción subcelular S30 de la cepa GT-13 de *T. vaginalis* a pH 6.0 sin fase lag, y con un comportamiento lineal en el estado preestacionario que se prolonga hasta la hora de incubación. El análisis de la curva temporal para nuestra FLA₂ purificada de peso molecular aproximado a los 13 KDa obtenida en la fracción de elución con EDTA, mostró de igual manera la ausencia de una fase lag, y una fase inicial rápida seguida de un comportamiento lineal con un pico máximo de actividad también de una hora (Fig. 21). En un estudio publicado por Singer *et al.*, (2002) el análisis de las FLA₂ de secreción tanto de humano como de ratón mostró también la ausencia de la fase lag. Lo anterior indica la existencia de una buena unión entre enzima y sustrato y como consecuencia una buena actividad. Probablemente por la acumulación de los productos de hidrólisis que promueven la unión interfacial y la actividad catalítica, lo que se ve reflejado con la presencia de una fase inicial rápida (Berg *et al.*, 2001).

El análisis de la curva dosis-respuesta de la actividad de FLA₂ a pH 6.0 mostró que ésta se incrementó proporcionalmente con concentraciones crecientes de la muestra (Fig. 22).

Como parte de la caracterización parcial de esta enzima, se determinó el efecto del pH sobre la actividad de FLA₂ en la fracción S30 de *T. vaginalis* ya que se ha descrito en la literatura que estas enzimas pueden presentar actividad en diferentes rangos de pH (Dennis 1983, 1991). Cuando se realizó el ensayo con la fracción S30 a diferentes valores de pH se encontró que la actividad de FLA₂, es decir, la actividad en las manchas correspondientes a [¹⁴C]-AGL usando el sustrato [¹⁴C]-FC, presentó un pico de máxima actividad a un pH de 6.0, lo que corresponde a la hidrólisis de 6 pmoles en 1 h de incubación a 37 °C, sin embargo a pH 7.0 aun presentó una actividad importante (Fig. 23).

Se utilizaron diferentes concentraciones de cloruro de calcio para ver el efecto en la actividad. Se ha descrito en la literatura que las actividades de fosfolipasas A, principalmente de A₂ se ven alteradas por las concentraciones de calcio presentes en el medio (Shier, 1979; Dennis 1983; Arni and Ward, 1996, Broekemeier *et al.*, 2002).

Cuando se ensayo la actividad de FLA₂ en presencia de diferentes concentraciones de cloruro de calcio se encontró que requiere calcio para su óptima actividad y presentó su máximo a 1 mM; mayores o menores concentraciones de cloruro de calcio resultaron en una actividad menor entre un 20 y 50 % respectivamente con relación al máximo (Fig. 24).

El efecto hemolítico de *T. vaginalis* se ha relacionado ampliamente con su capacidad de virulencia (Malla *et al.*, 2008; Valadkhan *et al.*, 2003). Vargas-Villarreal *et al.* (2003, 2005) determinaron el efecto hemolítico dependiente de la actividad de FLA₂ de extractos subcelulares de *T. vaginalis* cepa GT-13 utilizando eritrocitos de rata Sprague-Dowley y de humanos. El efecto hemolítico dependiente de FLA₂ reportado para la fracción subcelular S30 fue de tipo indirecto a un pH de 6.0, y éste fué mayor cuando se realizó en presencia de eritrocitos de rata con respecto a la hemólisis observada con eritrocitos de humano. Probamos nuestra fracción con la FLA₂ purificada utilizando eritrocitos de rata Sprague-Dowley por su mayor fragilidad mecánica comparada con la de eritrocitos humanos.

Encontramos que esta fracción de FLA₂ tuvo un efecto hemolítico cuantificable y reproducible, el cual fue dependiente tanto del tiempo de incubación como de la dosis (Fig. 25 y 26). En relación al tiempo de incubación, encontramos que desde los 15 min de incubación hubo un 18 % de liberación de hemoglobina de los eritrocitos lisados, la cual se incrementó linealmente y llegó al 100% de hemólisis en 1 hora de incubación. Estos resultados indican que: a) hay hemólisis tan pronto como la fracción de FLA₂ entra en contacto con las células blanco, b) no se presenta fase Lag, c) la FLA₂ parece ser de acción directa, es decir no requiere de la presencia de factores líticos como AGL y LFC, para llevar a cabo la hemólisis, lo que contrasta con lo encontrado por Vargas-Villarreal en el 2005, en la que S30 presentó actividad hemolítica solo en forma indirecta.

Con respecto a la dosis hemolítica encontramos un incremento de la liberación de hemoglobina proporcional entre 0 y 30 μg de proteína, lo que nos permitió calcular con precisión la DH50 (20 μg).

Después analizamos los efectos del IR (inhibidor no hidrolizable en general de fosfolipasas del tipo A sobre la actividad hemolítica para corroborar la posible participación de la FLA₂. Encontramos que este inhibidor disminuye importantemente la liberación de hemoglobina producida por la muestra con FLA₂ a una concentración de 40 μM , en la cual se alcanza una inhibición de aproximadamente el 83 % de la actividad la cual se mantiene aun con mayores concentraciones del IR (Fig. 27). Para este ensayo la dosis inhibitoria media fue de 15 μM . estos resultados sugieren fuertemente que la FLA₂ de *T. vaginalis* contenida en la fracción de EDTA de la cromatografía de afinidad de FUF30 3X de S30 a pH 6.0, es una citolisina que actua directamente sobre las membranas de las células blanco, debido a su actividad enzimática.

Hasta ahora se han propuesto aisladamente varias moléculas citolíticas para *T. vaginalis* y se han identificado y purificado algunos factores que podrían actuar como tales para producir lesiones en la tricomoniasis o permitir la colonización y posterior invasión de las células epiteliales vaginales de mujeres enfermas principalmente. Es muy posible que todas ellas y aun más, participen en la destrucción tisular y por lo tanto la propiedad citolítica de *T. vaginalis* sea un mecanismo multifactorial en el que posiblemente este implicada la actividad de esta FLA₂ que aquí se ha estudiado. El conocimiento más profundo de esta actividad permitirá determinar la contribución específica de ésta en los mecanismos citolíticos de *T. vaginalis*.

Además es la primera vez que se obtiene una secuencia parcial de una enzima directamente de protozoarios.

10. CONCLUSIONES

T. vaginalis posee una FLA₂ soluble, dependiente de calcio con un peso molecular aproximado de 13 KDa y la cual tiene actividad óptima a pH de 6.0. Esta proteína ha podido ser aislada a homogeneidad y purificada mediante el uso de una columna de afinidad con el inhibidor de Rosenthal como ligando específico para la interacción enzima-sustrato en presencia de calcio.

Este trabajo constituye el primer reporte del aislamiento de una FLA₂ a partir de *T. vaginalis*, su caracterización parcial y el reporte de una secuencia aminoacídica de la misma.

11. PERSPECTIVAS

Como siguiente objetivo nos proponemos obtener mayor información acerca de la secuencia de ésta proteína, identificar el gen y a partir de ello, determinar el papel de ésta proteína en el metabolismo y/o virulencia de este parásito.

12. LITERATURA CITADA

- Acosta A, Rael ED, Maddux NL, Lieb CS. 1994. Detection of alkaline phosphatase in venom by blotting methods. *Toxicon* 32:227-31.
- Afzan MY, Suresh K. 2012. Pseudocyst forms of *Trichomonas vaginalis* from cervical neoplasia. *Parasitology research*. Mar 8. [Epub ahead of print]
- Alvarez-Sánchez ME, Ávila-González L, Becerril-García C, Fattel-Facenda LV, Ortega-López J, Arroyo R. 2000. A novel cysteine proteinase (CP65) of *Trichomonas vaginalis* involved in cytotoxicity. *Microbial Pathogenesis*. Apr;28(4):193-202.
- Arai H, Inoue K, Natori Y, Banno Y, Nozawa Y, Nojima S. 1985. Intracellular phospholipase activities of *Tetrahymena pyriformis*. *Journal of biochemistry*. Jun;97(6):1525-32.
- Arai H, Inoue K, Nishikawa K, Banno Y, Nozawa Y, Nojima S. 1986. Properties of acid phospholipases in lysosome and extracellular medium of *Tetrahymena pyriformis*. *Journal of biochemistry*. Jan;99(1):125-33.
- Arni RK, Ward RJ. 1996. Phospholipase A2—a structural review. *Toxicon* 34:827-41.
- Banerjee S, Vishwanath P, Cui J, Kelleher DJ, Gilmore R, Robbins PW, Samuelson J. 2007. The evolution of N-glycan-dependent endoplasmic reticulum quality control factors for glycoprotein folding and degradation *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Jul 10;104(28):11676-81. Epub 2007 Jul 2.
- Barbour SE, Marciano-Cabral F. 2001. *Naegleria fowleri* amoebae express a membrane-associated calcium-independent phospholipase A2. *Biochimica et Biophysica Acta* 1530:123-133.
- Beach DH, Holz GG Jr, Singh BN, Lindmark DG. 1991. Phospholipid metabolism of cultured *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. *Molecular and biochemical parasitology*. Jan;44(1):97-108.
- Berg OG, Gelb MH, Tsai MD, Jain MK. 2001. Interfacial enzymology: the secreted phospholipase A(2)-paradigm. *Chemical reviews*.. Sep;101(9):2613-54.

- Bhanot P, Schauer K, Coppens I, Nussenzweig V. 2005. A surface phospholipase is involved in the migration of plasmodium sporozoites through cells. *The Journal of Biological Chemistry* 280:6752-60.
- Blum H, Beier H and Gross HJ. 1986. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8: 93-99.
- Broekemeier KM, Iben JR, LeVan EG, Crouser ED, Pfeiffer DR. 2002. Pore formation and uncoupling initiate a Ca²⁺-independent degradation of mitochondrial phospholipids. *Biochemistry* 41:7771-80.
- Carlton JM, Hirt RP, Silva JC, Delcher AL, Schatz M, et al. (2007) Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Science* 315: 207–212.
- Cassaing S, Fauvel J, Bessieres MH, Guy S, Seguela JP, Chap H. 2000. *Toxoplasma gondii* secretes a calcium-independent phospholipase A(2). *International Journal for Parasitology* 30:1137-42.
- Castro-Garza J, Anaya-Velázquez F, Said-Fernández S, González-Garza MT. 1996. Comparable growth of a *Trichomonas vaginalis* strain in PEHPS and TYI-S-33 media. *Archives of medical research. Winter*; 27(4):567-9.
- Cates W. 1999. Estimates of the incidence and prevalence of sexually transmitted diseases in the United States. The American Social Health Association Panel. *Sexually Transmitted Diseases* 26:52-57.
- Chang J, Musser JH, Mc Gregor H. 1987. Phospholipase A2: Function and pharmacological regulation. *Biochemical Pharmacology* 36:2429-2436.
- Ciechanover A, Schwartz AL. 1994. The ubiquitin-mediated proteolytic pathway: mechanisms of recognition of the proteolytic substrate and involvement in the degradation of native cellular proteins. *FASEB J.* 1994 Feb;8(2):182-91.
- Clark CG, Diamond LS. 2002. Methods for cultivation of luminal parasitic protists of clinical importance. *Clinical microbiology reviews.* Jul;15(3):329-41.
- Conrad MD, Gorman AW, Schillinger JA, Fiori PL, Arroyo R, Malla N, Dubey ML, Gonzalez J, Blank S, Secor WE, Carlton JM. 2012. Extensive Genetic Diversity, Unique Population Structure and Evidence of Genetic Exchange in the Sexually Transmitted Parasite *Trichomonas vaginalis*. *PLoS Neglected Tropical Diseases* Mar;6(3):e1573.
- Cornelius DC, Mena L, Lushbaugh WB, Meade JC. 2010. Genetic relatedness of *Trichomonas vaginalis* reference and clinical isolates. *The American journal of tropical medicine and hygiene.* Dec;83(6):1283-6.

- Costamagna SR, Prado-Figueroa M. 2001. On the ultrastructure of *Trichomonas vaginalis*: cytoskeleton, endocytosis and hydrogenosomes. *Parasitología al Día*, 25(3):100-108.
- Crampen M, von Nicolai H, Zilliken F. 1979. Properties and substrate specificities of two neuraminidases from *Trichomonas fetus*. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie*. Dec;360(12):1703-12.
- de Roodt AR, Estévez-Ramírez J, Paniagua-Solís JF, Litwin S, Carvajal-Saucedo A, Dolab JA, Robles-Ortiz LE, Alagón A. 2005. Toxicity of venoms from snakes of medical importance in México. *Gaceta Medica de Mexico*. 2005 Jan-Feb;141(1):13-21.
- Dennis EA. 1973. Kinetic dependence of phospholipase A activity on the detergent Triton X-100. *Journal of Lipid Research*. Mar;14(2):152-9.
- Dennis EA. 1994. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A2. *The Journal of biological chemistry*. May 6;269(18):13057-60.
- Dennis EA. 1997. The growing phospholipase A2 superfamily of signal transduction enzymes. *Trends in biochemical sciences*. Jan;22(1):1-2.
- Dennis EA, Cao J, Hsu YH, Magrioti V, Kokotos G. 2011. Phospholipase A2 enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. *Chemical Reviews* Oct 12;111(10):6130-85. Epub 2011 Sep 12.
- Dijkman R, Beiboer SH, Verheij HM. 1997. An affinity column for phospholipase A2 based on immobilised acylaminophospholipid analogues. *Biochim Biophys Acta*. Jul 12;1347(1):1-8.
- Dyer B. 1990. Phylum Zoomastigina Class Parabasalia. In: *Handbook of Protozoa*, Margulis L, Corliss JO, Melkonian M, Chapman DJ (eds). Boston: Massachussets, pp 252-258.
- Eintracht J, Maathai R, Mellors A, Ruben L. 1998. Calcium entry in *Trypanosoma brucei* is regulated by phospholipase A2 and arachidonic acid. *The Biochemical journal* Dec 15;336 (Pt 3):659-66.
- Engbring J, Alderete JF. 1998. Characterization of *Trichomonas vaginalis* AP33 adhesin and cell surface interactive domains. *Microbiology* 144:3011-3018.
- Escario A, Gómez Barrio A, Simons Diez B, Escario JA. 2010. Immunohistochemical study of the vaginal inflammatory response in experimental trichomoniasis. *Acta tropica*. Apr;114(1):22-30.

- Franken PA, Van den Berg L, Huang J, Gunyuzlu P, Lugtigheid RB, Verheij HM, De Haas GH. 1992. Purification and characterization of a mutant human platelet phospholipase A2 expressed in *Escherichia coli*. Cleavage of a fusion protein with cyanogen bromide. *European journal of biochemistry* Jan 15;203(1-2):89-98.
- Franson RC, Rosenthal MD. PX-52. 1997. A novel inhibitor of 14 kDa secretory and 85 kDa cytosolic phospholipases A2. *Advances in experimental medicine and biology* 400A:365-73.
- Fulford DE, Marciano-Cabral F. 1986. Cytolytic activity of *Naegleria fowleri* cell-free extract. *The Journal of protozoology*. Nov;33(4):498-502.
- Gelbart SM, Thomason JL, Osypowski PJ, Kellett AV, James JA, Broekhuizen FF. 1990. Growth of *Trichomonas vaginalis* in commercial culture media. *Journal of clinical microbiology* May;28(5):962-4.
- Gustafson C, Tagesson C. 1990. Phospholipase C from *Clostridium perfringens* stimulates phospholipase A2-mediated arachidonic acid release in cultured intestinal epithelial cells (INT 407). *Scandinavian journal of gastroenterology*. Apr;25(4):363-71.
- Heinrikson RL, Krueger ET, Keim PS. 1977. Amino acid sequence of phospholipase A2-alpha from the venom of *Crotalus adamanteus*. A new classification of phospholipases A2 based upon structural determinants. *The Journal of biological chemistry* Jul 25;252(14):4913-21.
- Hernández-Romano P, Hernández R, Arroyo R, Alderete JF, López-Villaseñor I. 2010. Identification and characterization of a surface-associated, subtilisin-like serine protease in *Trichomonas vaginalis*. *Parasitology*. Sep;137(11):1621-35. Epub 2010 Jul 6.
- Hook EW. 1999. *Trichomonas vaginalis* no longer a minor STD. *Sexually Transmitted Diseases* 26:288-389.
- Hu F, Hu X, Ma C, Zhao J, Xu J, Yu X. 2009. Molecular characterization of a novel *Clonorchis sinensis* secretory phospholipase A(2) and investigation of its potential contribution to hepatic fibrosis. *Molecular and biochemical parasitology*. Oct;167(2):127-34.
- John J, Squires S. Abnormal forms of *Trichomonas vaginalis*. *Br J Vener Dis*. 1978 Apr;54(2):84-7.
- Keeling PJ, Doolittle WF. 1995. Concerted evolution in protists: recent homogenization of a polyubiquitin gene in *Trichomonas vaginalis*. *Journal of molecular evolution*. Nov;41(5):556-62.

- Kovacs P, Csaba G. 1997. PLA2 activity in *Tetrahymena pyriformis*. Effects of inhibitors and stimulators. *Journal of lipid mediators and cell signaling*. Mar;15(3):233-47.
- Kupferberg Ab, Johnson G, Sprince H. 1948. *Nutritional requirements of Trichomonas vaginalis*. *Proc Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. Mar;67(3):304-8.
- Laemmli, U. K. (1970) *Nature* 227, 680-685
- Lee HY, Hyung S, Lee JW, Kim J, Shin MH, Ryu JS, Park SJ. 2011. Identification of antigenic proteins in *Trichomonas vaginalis*. *The Korean journal of parasitology*. Mar;49(1):79-83. Epub 2011 Mar 18.
- Lockwood BC, North MJ, Scott KI, Coombs GH. 1988. The release of hydrolases from *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 30:135-142.
- Lubick K, Burgess DE. 2004. Purification and analysis of phospholipase A2-like lytic factor of *Trichomonas vaginalis*. *Infection and Immunity* 72:1284-1290.
- Magro AJ, Soares AM, Giglio JR, Fontes MR. 2003. Crystal structures of BnSP-7 and BnSP-6, two Lys49-phospholipases A(2): quaternary structure and inhibition mechanism insights. *Biochemical and biophysical research communications*. Nov 21;311(3):713-20.
- Malla N, Kaul P, Sehgal R, Gupta I. 2008. In vitro haemolytic and cytotoxic activity of soluble extract antigen of *T.vaginalis* isolates from symptomatic and asymptomatic women. *Parasitology research*. May;102(6):1375-8. Epub 2008 Mar 28.
- Marchi-Salvador DP, Corrêa LC, Magro AJ, Oliveira CZ, Soares AM, Fontes MR. 2008. Insights into the role of oligomeric state on the biological activities of crotoxin: crystal structure of a tetrameric phospholipase A2 formed by two isoforms of crotoxin B from *Crotalus durissus terrificus* venom. *Proteins*. Aug 15;72(3):883-91.
- Mata-Cardenas BD, Vargas-Villarreal J, Navarro-Marmolejo L, Said-Fernandez S. 1998 . Axenic cultivation of *Trichomonas vaginalis* in a serum-free medium. *The Journal of parasitology* Jun;84(3):638-9.
- Matin A, Jung SY. 2011. Phospholipase activities in clinical and environmental isolates of *Acanthamoeba*. *The Korean journal of parasitology* Mar;49(1):1-8. Epub 2011 Mar 18.

- McGregor JA, French JI, Jones W, Parker R, Patterson E, Draper D. 1992. Association of cervicovaginal infections with increased vaginal fluid phospholipase A2 activity. *American journal of obstetrics and gynecology* Dec;167(6):1588-94.
- Miesch F, Bieth J, Metais P. 1971. The alpha 1-antitrypsin and alpha 2-macroglobulin content and the protease-inhibiting capacity of normal and pathological sera. *Clinica chimica acta*. Jan;31(1):231-41.
- Mirhaghani A, Warton 1998. A. Involvement of *Trichomonas vaginalis* surface-associated glycoconjugates in the parasite/target cell interaction. A quantitative electron microscopy study. *Parasitology research*. May;84(5):374-81.
- Mitchell S, Poyser NL, Wilson NH. 1977. Effect of p-bromophenacyl bromide, an inhibitor of phospholipase A2, on arachidonic acid release and prostaglandin synthesis by the guinea-pig uterus in vitro. *British journal of clinical pharmacology* Jan;59(1):107-13.
- Muma NA, Rowell PP. 1985. A sensitive and specific radioenzymatic assay for the simultaneous determination of choline and phosphatidylcholine. *Journal of neuroscience methods*. Jan;12(3):249-57.
- Munekiyo SM, Mackessy SP. 1998. Effects of temperature and storage conditions on the electrophoretic, toxic and enzymatic stability of venom components. *Comparative biochemistry and physiology. Biochemistry and molecular biology*. Jan;119(1):119-27.
- Nevalainen TJ, Cardoso JC, Riikonen PT. 2012. Conserved domains and evolution of secreted phospholipases A(2). *Federation of European Biochemical Societies Journal*. Feb;279(4):636-49. doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08453.x. Epub 2012 Jan 9.
- Organización Panamericana de la Salud. 1998. México. La Salud en las Américas, edición de 1998. Disponible en: http://www.paho.org/Spanish/SHA/HIA_1998ed.htm
- Pereañez JA, Núñez V, Patiño AC. 2011. Inhibitory effects of bile acids on enzymatic and pharmacological activities of a snake venom phospholipase A(2) from group IIA. *The protein journal* Apr;30(4):253-61.
- Perumal Samy R, Pachiappan A, Gopalakrishnakone P, Thwin MM, Hian YE, Chow VT, Bow H, Weng JT. 2006. In vitro antimicrobial activity of natural toxins and animal venoms tested against *Burkholderia pseudomallei*. *BMC infectious diseases* Jun 20;6:100.
- Perumal Samy R, Gopalakrishnakone P, Thwin MM, Chow TK, Bow H, Yap EH, Thong TW. 2007. Antibacterial activity of snake, scorpion and bee venoms: a

- comparison with purified venom phospholipase A2 enzymes. *Journal of applied microbiology* Mar;102(3):650-9.
- Peters HA. 1961. Trace minerals, chelating agents and the porphyries. *Federation Proceedings Pt 2*:227-34.
- Petrin D, Delgaty K, Bhatt R, Garber G. 1998. Clinical and Microbiological Aspects of *Trichomonas vaginalis*. *Clinical Microbiology Reviews* 1:300-317.
- Pindak FF, Mora de Pindak M, Gardner Jr. WA. 1993. Contact-independent cytotoxicity of *Trichomonas vaginalis*. *Genitourin Med Journ Genitourinary medicine* Feb;69:35-40.
- Porath J, Axen R, Ernback S. 1967. Chemical coupling of proteins to agarose. *Nature*. Sep 30;215(5109):1491-2.
- Pritham EJ, Putliwala T, Feschotte C. . 2007. Mavericks, a novel class of giant transposable elements widespread in eukaryotes and related to DNA viruses. *Gene Apr 1;390(1-2):3-17*. Epub 2006 Aug 23.
- Ramesha CS, Thompson GA Jr. 1984. The mechanism of membrane response to chilling. Effect of temperature on phospholipid deacylation and reacylation reactions in the cell surface membrane. *The Journal of biological chemistry*. Jul 25;259(14):8706-12.
- Rodriguez JP, De Marzi M, Maruñak S, Malchiodi EL, Leiva LC, Acosta O. 2006. Rabbit IgG antibodies against phospholipase A2 from *Crotalus durissus terrificus* neutralize the lethal activity of the venom. *Medicina (B Aires)* 66(6):512-6.
- Rosenthal AF, Geyer RP. 1960. A synthetic inhibitor of venom lecithinase A. *The Journal of Biological Chemistry* 235:2202-6.
- Saffer LD, Long Krug SA and Schwartzman JD. 1989. The role of phospholipase in host cell penetration by *Toxoplasma gondii*. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. Feb;40(2):145-9.
- Said-Fernández S, Vargas-Villarreal J, Castro-Garza J, Mata-Cárdenas B, Navarro-Marmolejo L, Lozano-Garza G, Martínez-Rodríguez H. 1988. PEHPS Médium: an alternative for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and *E. invadens*. *Transaction Royal Society of Tropical Medical and Hygiene* 82: 249-253.
- Schmid GP, Matheny LC, Zaidi AA, Kraus SJ. 1989. Evaluation of six media for the growth of *Trichomonas vaginalis* from vaginal secretions. *Journal of clinical microbiology* Jun;27(6):1230-3.

- Schwebke JR, Burgess D. 2004. Trichomoniasis. *Clinical Microbiology Reviews* 17(4):794-803.
- Shier WT. 1979. Activation of high levels of endogenous phospholipase A2 in cultured cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76:195-99.
- Singer AG, Ghomashchi F, Le Calvez C, Bollinger J, Bezzine S, Rouault M, Sadilek M, Nguyen E, Lazdunski M, Lambeau G, Gelb MH. 2002. Interfacial kinetic and binding properties of the complete set of human and mouse groups I, II, V, X, and XII secreted phospholipases A2. *The Journal of biological chemistry*. Dec 13;277(50):48535-49. Epub 2002 Sep 30.
- Singh S, Singh G, Sagar N, Yadav PK, Jain PA, Gautam B, Wadhwa G. Insight into *Trichomonas vaginalis* genome evolution through metabolic pathways comparison. *Bioinformatics*. 2012;8(4):189-95. Epub 2012 Feb 28.
- Skispky JP, Barclay M. 1969. Thin-layer chromatography of lipids. In *Methods in Enzymology*, Lowenstein JM (ed). Academic Press. New York, pp. 530-599.
- Snijder HJ, Ubarretxena-Belandia I, Blaauw M, Kalk KH, Verheij HM, Egmond MR, Dekker N, Dijkstra BW. 1999. Structural evidence for dimerization-regulated activation of an integral membrane phospholipase. *Nature*. Oct 14;401(6754):717-21.
- Sorvillo F, Smith L, Kerndt P, Ash L. 2001. *Trichomonas vaginalis*, HIV, and African-Americans. *Emerging Infectious Diseases* 7(6): 927-932.
- Stanley AM, Chuawong P, Hendrickson TL, Fleming KG. 2006. Energetics of outer membrane phospholipase A (OMPLA) dimerization. *Journal of molecular biology*. Apr 21;358(1):120-31. Epub Jan 31.
- Sutton M, Sternberg M, Koumans EH, McQuillan G, Berman S, Markowitz L. 2007. The prevalence of *Trichomonas vaginalis* infection among reproductive-age women in the United States, 2001-2004. *Clin Infect Dis*. Nov 15;45(10):1319-26.
- Ter Kuile BH, Hrdý I, Sánchez LB, Müller M. 2000. Purification and specificity of two alpha-glucosidase isoforms of the parasitic protist *Trichomonas vaginalis*. *The Journal of eukaryotic microbiology*. Sep-Oct;47(5):440-2.
- Terao Y, Saito M, Hara T, Sumikawa K. 2004. Is circulating phospholipase A2 removed by large-pore continuous venovenous hemodiafiltration in septic acute renal failure?. *Renal failure*. Mar;26(2):127-33.
- Vadas P, Pruzanski W. 1986. *Biology of Disease. Role of secretory phospholipases A2 in the pathobiology of disease*. *Laboratory Investigation* 55:391-404.

- Valadkhan Z, Sharma S, Harjai K, Gupta I, Malla N. 2003. In vitro comparative kinetics of adhesive and haemolytic potential of *T.vaginalis* isolates from symptomatic and asymptomatic females. Indian journal of pathology & microbiology.. Oct;46(4):693-9.
- Valadkhani Z, Kazemi F, Hassan N, Aghighi Z, Esmaili I, Talebi M. Gene Diversity of *Trichomonas vaginalis* Isolates. Iranian journal of parasitology. 2011 Aug;6(3):101-6.
- Van den Bosch, H. 1980. Intracellular phospholipases A. Biochemica et Biophysica Acta 604:191-246.
- Vargas-Villarreal J, Martín-Polo JJ, Reinaud E, Alagón AC. 1991. A new affinity adsorbent for the purification of phospholipases A1 and A2 from animal venoms. Toxicon 29:119-24.
- Vargas-Villarreal J, Martínez-Rodríguez HG, Castro-Garza J, Mata-Cárdenas BD, González-Garza MT, Said-Fernández S. 1995. Identification of *Entamoeba histolytica* intracellular phospholipase A and lysophospholipase L1 activities. Parasitology Research 81:320-3.
- Vargas-Villarreal J, Olvera-Rodríguez A, Mata-Cárdenas BD, Martínez-Rodríguez H, Said-Fernández S, Alagón-Cano A. 1998. Isolation of an *Entamoeba histolytica* intracellular alkaline phospholipase A2. Parasitology Research 84:310-314.
- 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.
- Wainszelbaum M, Isola E, Wilkowsky S, Cannata JJ, Florin-Christensen J. 2001. Lysosomal phospholipase A1 in *Trypanosoma cruzi*: an enzyme with a possible role in pathogenesis of Chagas' disease. Biochemical Journal 355:765-70.
- Weinstock, H., S. Berman, and W. Cates, Jr. 2004. Sexually transmitted diseases among American youth: incidence and prevalence estimates, 2000. Perspectives on sexual and reproductive health 36:6–10.
- Wikiel H, Zhao L, Gessner T, Bloch A. 1994. Differential effect of growth- and differentiation-inducing factors on the release of eicosanoids and phospholipids from ML-1 human myeloblastic leukemia cells. Biochimica et Biophysica Acta 1211:161-70.
- Wiltshire CJ, Sutherland SK, Fenner PJ, Young AR. 2000. Optimization and preliminary characterization of venom isolated from 3 medically important jellyfish: the box

(*Chironex fleckeri*), Irukandji (*Carukia barnesi*), and blubber (*Catostylus mosaicus*) jellyfish. *Wilderness and Environmental Medicine* 11:241-50

Zizza P, Iurisci C, Bonazzi M, Cossart P, Leslie CC, Corda D, Mariggio S. 2012. Phospholipase A2 IV α regulates phagocytosis independent of its enzymatic activity. *The Journal of biological chemistry* Mar 5. Publicación electrónica antes de impresión: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M111.309419>

Global Prevalence and Incidence of Selected Curable Sexually Transmitted Infections. World Health Organization; Geneva: 2001.
www.who.int/docstore/hiv/GRSTI/006.htm

RESUMEN CURRICULAR

Brenda Leticia Escobedo Guajardo

Candidata para el Grado de

Doctora en Ciencias con Especialidad en Microbiología

Tesis: AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE UNA FOSFOLIPASA

A₂ DE Trichomonas vaginalis.

Campo de Estudio: Microbiología y Parasitología

Datos Personales: Nacida en Monterrey Nuevo León el 20 de Febrero de 1979, hija de Juan Antonio Escobedo Flores y Ma. De Jesús Guajardo Guajardo.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Químico Clínico Biólogo en el 2002, Facultad de Medicina. Maestría en Ciencias con Acentuación en Microbiología, grado obtenido en el 2004, Facultad de Ciencias Biológicas.

Experiencia Profesional: Químico clínico en laboratorio del Hospital San José de Monterrey y en el Centro Médico Los Angeles, desde febrero del 2003 hasta febrero del 2004. Becario de Investigación en el Centro de Investigación Biomédica del Noreste, Instituto Mexicano del Seguro Social desde marzo del 2005 hasta marzo del 2007 y Técnico en Investigación desde el 1° de Octubre del 2009 a la fecha.