

Tesis de Posgrado

Caracterización de un sistema de enzimas lipolíticas del medio de cultivo de *Tetrahymena*

Florin-Christensen, Jorge

1988

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Florin-Christensen, Jorge. (1988). Caracterización de un sistema de enzimas lipolíticas del medio de cultivo de *Tetrahymena*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2139_FlorinChristensen.pdf

Cita tipo Chicago:

Florin-Christensen, Jorge. "Caracterización de un sistema de enzimas lipolíticas del medio de cultivo de *Tetrahymena*". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1988. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2139_FlorinChristensen.pdf

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Carrera del Doctorado en Ciencias Biológicas

CARACTERIZACION
DE UN SISTEMA DE ENZIMAS LIPOLITICAS
DEL MEDIO DE CULTIVO DE
Tetrahymena

TESIS DOCTORAL

Jorge FLORIN-CHRISTENSEN

Director: Leif RASMUSSEN, dr.phil.

- 1988 -

2.139
Ej. 2

Parte de los resultados expuestos en esta Tesis han sido publicados en los siguientes artículos:

Florin-Christensen, J., Florin-Christensen, M., Knudsen, J., Rasmussen, L. Cytolytic Activity Released from Tetrahymena. J. Protozool. 32: 657-660, 1985.

Florin-Christensen, J., Florin-Christensen, M., Rasmussen, L., Knudsen, J. An Acid Phospholipase C from Tetrahymena Culture Medium. Comp. Biochem. Physiol. 85 B: 143-148, 1986.

Florin-Christensen, J., Florin-Christensen, M., Rasmussen, L., Knudsen, J., Hansen, H.O. Phospholipase A₁ and Triacylglycerol Lipase: Two Novel Enzymes from Tetrahymena Extracellular Medium. Comp. Biochem. Physiol. 85 B: 149-155, 1986.

Florin-Christensen, J., Florin-Christensen, M., Knudsen, J., Rasmussen, L. Phospholipases and Phosphonolipids in a Ciliate: An Attack and Defence System? TIBS Trends Biochem. Sci. 11(9): 354-355, 1986.

Los trabajos descriptos en esta Tesis fueron emprendidos en el Instituto de Anatomía y Citología de la Universidad de Odense, Dinamarca. Se llevaron a cabo algunos experimentos en el Instituto de Bioquímica de la misma Universidad y en el Instituto de Zoología de la Universidad de Münster, Alemania Federal. Las etapas finales se desarrollaron en la Cátedra de Biología Celular, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, en el Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE), La Plata, y en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP).

Agradezco a las siguientes personas por sus diferentes aportes al desarrollo de esta Tesis:

- Dr Leif Rasmussen, Instituto de Anatomía y Citología, Universidad de Odense, Dinamarca.
 - Dres Jens Knudsen y Hans Otto Hansen, Instituto de Bioquímica, Universidad de Odense.
 - Dr Arno Tiedtke, Instituto de Zoología, Universidad de Münster, Alemania Federal.
 - Dr Julio M. Azcurra, Cátedra de Biología Celular, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.
 - Dr Rodolfo R. Brenner, INIBIOLP.
 - Dr Gustavo Rossi, CEPAVE.
 - Dr Roy Weber, Instituto de Biología, Universidad de Odense.
- Agradezco también la asistencia técnica de Annelise V. Andersen y Erling Knudsen.

Las siguientes Instituciones me concedieron las becas que hicieron posibles estos estudios:

- Ministerio de Relaciones Exteriores (Udenrigsministeriet) de Dinamarca.
- Consejo Estatal de Investigaciones de las Ciencias Naturales (Statens Naturvidenskabelig Forskningsråd, SNF), Dinamarca.
- Sociedad Dano-Argentina (Dansk-Argentinsk Forening), Hillerød, Dinamarca.
- European Molecular Biology Organization (EMBO).

- Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina.

En 1983 y 1984 desarrollé mi trabajo como Adjunktvikar (Junior lecturer) en la Universidad de Odense, por lo cual agradezco también a las autoridades de dicha Universidad.

La Fundación Carlsberg, Copenhagen, y el SNF aportaron fondos para cubrir los gastos de laboratorio.

Resumen

En esta Tesis se describe el hallazgo de actividad hemolítica, así como también de tres actividades lipolíticas en el medio extracelular del protozoo ciliado Tetrahymena thermophila. Las enzimas halladas son una fosfolipasa C (EC.3.1.4.3), una fosfolipasa A₁ (EC.3.1.1.32) y una triacilglicerol lipasa (EC.3.1.1.3). Estas enzimas fueron purificadas mediante precipitación fraccionada con sulfato de amonio y cromatografía de intercambio iónico, de filtración en geles y de interacción hidrofóbica en decil Sepharose 4B. Se encontró así que la fosfolipasa C copurifica con actividad hemolítica, no así la triacilglicerol lipasa ni la fosfolipasa A₁, aunque esta última es capaz de acelerar la acción hemolítica de la fosfolipasa C. Se halló además un segundo factor hemolítico no asociado a fosfolipasas, cuya acción es inhibida por colesterol y que, junto con la fosfolipasa C, puede dar cuenta de la acción hemolítica causada por el medio extracelular de Tetrahymena. Este segundo factor podría actuar en forma semejante a ciertas citolisinas bacterianas que causan hemólisis por interacción con el colesterol de las membranas. Las tres enzimas lipolíticas fueron caracterizadas y sus propiedades indican que provienen del sistema lisosomal. El hallazgo de las actividades aquí descritas proporciona una explicación para el enigmático rol de los fosfolípidos, un tipo especial de fosfolípidos que predominan en la membrana plasmática de Tetrahymena. Estos compuestos presentan un enlace directo carbono-fósforo que los hace particularmente resistentes a la hidrólisis enzimática por fosfolipasa C. Poseen, además, un enlace éter en la posición *sn*-1, que les confiere resistencia a la acción de fosfolipasa A₁. Es decir, Tetrahymena, una célula carente de pared celular u otras estructuras protectoras, sería capaz de tolerar sus propias secreciones líticas gracias a este tipo peculiar de fosfolípidos. Otras observaciones presentadas aquí pueden estar relacionadas con particularidades de las membranas de este ciliado. Así debe destacarse la baja proporción de triacilglicerol en la membrana plasmática, contrastando con lo observado para membranas internas de Tetrahymena. Este hecho puede estar vinculado con la secreción de la triacilglicerol lipasa. Otro aspecto notable es que esta célula carece totalmente de colesterol, el que es reemplazado por tetrahymanol. Esto puede explicar que el segundo factor hemolítico hallado no actúe sobre la membrana de Tetrahymena y sí sobre la de los eritrocitos. En esta Tesis se propone que la secreción de enzimas y las particularidades de la membrana representan una coadaptación que puede conferir a estos ciliados una ventaja evolutiva, al ser capaces de lizar otras células siendo ellos mismos resistentes. Otros experimentos presentados aquí sugieren, por último, que las actividades lipolíticas secretadas pueden desempeñar un rol destacado en la digestión extracelular e incorporación de fosfolípidos exógenos en este ciliado.

Indice

1. Introducción

1.1. <u>Tetrahymena</u> como modelo de célula eucariota	1
1.2. Ubicación taxonómica	3
1.3. Componentes celulares de <u>Tetrahymena</u> : Aspectos morfológicos y fisiológicos.	4
1.3.1. Forma y tamaño	4
1.3.2. Ciliatura y aparato oral	5
1.3.3. Poro anal	5
1.3.4. Sistema de la vacuola contráctil	5
1.3.5. Mucocistos	5
1.3.6. Córtex	6
1.3.7. Núcleos	7
1.3.8. Otras estructuras celulares	7
1.3.9. Vacuolas alimenticias	8
1.4. Particularidades de la composición lipídica de las membranas de <u>Tetrahymena</u> .	9
1.5. Secreción de hidrolasas ácidas en <u>Tetrahymena</u> .	13
1.6. Ecología de <u>Tetrahymena</u>	14
1.7. Fosfolipasas	16
1.7.1. Generalidades	16
1.7.2. Las acilhidrolasas	16
1.7.2.1. Fosfolipasas A ₁	16
1.7.2.2. Fosfolipasas A ₂	17
1.7.3. Las fosfohidrolasas	18
1.7.3.1. Fosfolipasas C	18
1.7.3.2. Fosfolipasas D	19
1.7.4. Fosfolipasas y membranas	19
1.7.5. Fosfolipasas lisosomales	20
1.7.6. Fosfolipasas en <u>Tetrahymena</u>	22
1.8. Lipasas	24
1.8.1. Generalidades	24
1.8.2. Lipasas lisosomales	24

2. Materiales y Métodos

2.1. Materiales	26
2.2. Cultivos	28
2.2.1. Cepas	28
2.2.2. Medios de cultivo	28
2.2.2.1. Medio PPY	28
2.2.2.2. Medio PPY-NaCl	29
2.2.2.3. Medio definido	30
2.2.3. Medición de la densidad de los cultivos	31
2.3. Medición de actividad citolítica	31
2.3.1. Preparación de suspensiones de eritrocitos	31
2.3.2. Determinación del número de unidades hemolíticas	31
2.3.3. Cinética de la hemólisis	32
2.3.4. Interacción "in vivo" entre <u>Tetrahymena</u> y glóbulos rojos	32
2.4. Medición de actividades enzimáticas	33
2.4.1. Detección de actividades lipolíticas	33
2.4.2. Medición de actividad fosfolipasa C	35
2.4.3. Medición de actividad fosfolipasa A ₁	35
2.4.4. Medición de actividad TG lipasa	36
2.4.5. Preparación de sustratos marcados	37
2.4.6. Determinación colorimétrica de hidrolasas ácidas	38
2.4.6.1. Medición de fosfatasa ácida	38
2.4.6.2. Medición de actividad β -hexosaminidasa	38
2.4.6.3. Medición de actividad fosfodiesterasa	39
2.5. Purificación de actividades lipolíticas	39
2.5.1. Medio de partida	39
2.5.2. Métodos de purificación utilizados	39
2.5.2.1. Precipitación con sulfato de amonio	39
2.5.2.2. Cromatografía de intercambio iónico	40
2.5.2.3. Cromatografía de interacción hidrofóbica	41

2.5.2.4. Cromatografía de filtración en gel	42
2.5.2.5. Equipo para la cromatografía de proteínas	43
2.5.3. Purificación de la fosfolipasa C	44
2.5.4. Purificación de la fosfolipasa A	44
2.5.5. Purificación de la TG lipasa	46
2.6. Electroforesis en gel de poliacrilamida	48
2.7. Determinaciones de proteínas	48
2.8. Recolección y análisis de datos	48

3 . Resultados

3.1. Actividad citolítica en el medio extracelular de <u>Tetrahymena</u>	49
3.1.1. Detección de la actividad	49
3.1.2. Caracterización de la actividad	51
3.1.2.1. pH óptimo	51
3.1.2.2. Diálisis	53
3.1.2.3. Tratamiento con tripsina	53
3.1.2.4. Termolabilidad	53
3.1.2.5. Efecto de iones bivalentes y Na ₂ EDTA	54
3.1.2.6. Efecto de fosfolípidos	54
3.1.2.7. Efecto de albúmina de suero bovino y ovoalbúmina	56
3.1.3. Actividad citolítica en distintas cepas	56
3.1.4. Liberación de actividad citolítica en distintos medios	57
3.1.5. Interacción "in vivo" entre células de <u>Tetrahymena</u> y eritrocitos de carnero	58
3.2. Actividades lipolíticas en el medio extracelular de <u>Tetrahymena thermophila</u>	61
3.2.1. Detección	61
3.2.2. Precipitación de las enzimas lipolíticas con sulfato de amonio	65

3.3. Purificación y caracterización de la fosfolipasa C (EC. 3.1.4.3)	67
3.3.1. Purificación de la fosfolipasa C y propiedades de la preparación obtenida	67
3.3.2. Caracterización de la fosfolipasa C	73
3.3.2.1. pH óptimo	73
3.3.2.2. Efecto de iones bivalentes y Na ₂ EDTA	74
3.3.2.3. Termolabilidad	74
3.3.2.4. Especificidad de sustrato	75
3.3.2.5. Parámetros cinéticos	76
3.4. Actividad hemolítica no asociada a fosfolipasas	79
3.5. Purificación y caracterización de la fosfolipasa A	80
3.5.1. Purificación de la fosfolipasa A y características de la preparación	80
3.5.2. Caracterización de la fosfolipasa A	84
3.5.2.1. Especificidad posicional	84
3.5.2.2. pH óptimo	85
3.5.2.3. Efecto de CaCl ₂ y Na ₂ EDTA	86
3.5.2.4. Especificidad de sustrato	86
3.5.2.5. Estimación del Mr	87
3.5.2.6. Actividad hemolítica	89
3.5.2.7. Parámetros cinéticos	89
3.6. Purificación y caracterización de la triacilglicerol lipasa (EC. 3.1.1.3)	90
3.6.1. Purificación de la actividad y características de la preparación	90
3.6.2. Caracterización de la TG lipasa	93
3.6.2.1. Especificidad posicional y de sustrato	93
3.6.2.2. pH óptimo	95
3.6.2.3. Efecto de CaCl ₂ y Na ₂ EDTA	96
3.6.2.4. Inhibidores de la TG lipasa	96
3.6.2.5. Estimación del Mr	96
3.6.2.6. Parámetros cinéticos	97

3.7. Rol de las enzimas lipolíticas secretadas en la incorporación y degradación de fosfatidilcolina exógena en cultivos de <u>Tetrahymena thermophila</u>	97
4 . D i s c u s i ó n	104
5 . R e f e r e n c i a s	113

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

Se utilizaron las mismas abreviaturas y símbolos que las empleadas en las publicaciones comprendidas en esta Tesis. En el caso de los lípidos, se escriben entre paréntesis los nombres recomendados por la Comisión IUPAC-IUB sobre Nomenclatura Bioquímica (J. Lip. Res. 19: 114-129, 1978).

TG: triacilglicerol

DG: diacilglicerol

MG: monoacilglicerol

FFA: ácido graso libre (ácido graso)

PC: fosfatidilcolina (3-sn-fosfatidilcolina)

LPC: lisofosfatidilcolina. En los casos en que es requerido, se especifica la posición (sn-1 o sn-2) esterificada por el ácido graso, como en 2-oleoil-LPC, siguiendo a van den Bosch (ref. 76). (De acuerdo a IUPAC-IUB, ésta sería una 1-lisofosfatidilcolina)

PE: fosfatidiletanolamina (3-sn-fosfatidiletanolamina)

LPE: lisofosfatidiletanolamina

PS: fosfatidilserina (3-sn-fosfatidilserina)

AEPL: aminoetilfosfonolípido

SM: esfingomielina

2-AEP: ácido 2-aminoetilfosfónico

TLC: cromatografía en capa fina

TRIS: 2-amino-2-hidroximetilpropano-1,3-diol

EDTA: etilendiaminotetraacetato

SDS: dodecilsulfato de sodio

Mr: masa molecular relativa (también llamada peso molecular)

P: nivel de significación, determinado mediante el test t de Student.

1 . I n t r o d u c c i ó n

1.1. Tetrahymena como modelo de célula eucariota

Distintas especies del protozoo ciliado Tetrahymena, en particular, T.pyriformis y T.thermophila, se utilizan en numerosos laboratorios para estudios bioquímicos, nutricionales, farmacológicos, de biología celular y de biología molecular. La extraordinaria profusión de las investigaciones sobre estos organismos se debe a ciertas características que los hacen especialmente adecuados para estudios de laboratorio:

a) Son células animales que pueden cultivarse en forma axénica, es decir, sin ningún otro organismo presente (1).

b) Se cultivan fácilmente, no sólo en medios complejos, como proteosa peptona, sino también en medios químicamente definidos (2,3).

c) Son probablemente las células animales con tiempo de generación (= tiempo de duplicación) más corto, pudiendo ser éste menor que dos horas (4,5).

d) Los cultivos alcanzan altas densidades (10^6 células/ml) (5).

e) La genética de estos organismos es muy bien conocida. Se han desarrollado técnicas para la producción y aislamiento de mutantes con alta eficiencia (6). Existe gran diversidad de líneas celulares mutantes disponibles. Actualmente, se dispone de cepas nulisómicas para los distintos cromosomas, lo cual permite la rápida ubicación de loci génicos (7).

f) Mediante procedimientos simples, es posible sincronizar cultivos de Tetrahymena (8,9,10). Esto es especialmente importante para estudios sobre el ciclo celular.

g) La conjugación masiva también es inducible habiendo sido las condiciones necesarias definidas con mucha precisión (11). Esto ha sido utilizado para el estudio de las interacciones célula-célula y para estudios sobre meiosis.

1.2. Ubicación taxonómica

El protozoo Tetrahymena thermophila pertenece al phylum Ciliophora. Los organismos de este phylum están caracterizados por poseer cilias simples o estructuras ciliares compuestas en, por lo menos, un estadio de su ciclo vital. Aún cuando falten las cilias, poseen siempre una infraciliatura característica. Otro rasgo distintivo de los ciliados es la presencia de dos tipos de núcleos, macronúcleo y micronúcleo. El primero se expresa fenotípicamente y el segundo, germinativo, interviene en la reproducción sexual y da lugar a la formación de macronúcleos en la progenie, luego de la conjugación. La reproducción puede ser asexual, por división transversal, o sexual, típicamente por conjugación. Poseen en general vacuola contráctil. Su nutrición es heterotrófica. Aunque la mayoría de las especies son de vida libre, existen muchas especies comensales y otras parásitas, facultativas y obligatorias (13).

A continuación, se presenta la ubicación taxonómica del suborden Tetrahymenina, al cual pertenece el género Tetrahymena, de acuerdo a un reciente esquema clasificatorio de los protozoos (13).

Reino	<u>Animalia</u>
Subreino	<u>Protozoa</u>
Phylum	<u>Ciliophora</u> Doflein, 1901
Clase	<u>Oligohymenophorea</u> de Puytorac et al, 1974
Subclase	<u>Hymenostomatia</u> Delage & Hérouard, 1896
Orden	<u>Hymenostomatida</u> Delage & Hérouard, 1896
Suborden	<u>Tetrahymenina</u> Fauré-Fremiet, en Corliss, 1956

El género Tetrahymena Furgason, 1941 pertenece a la familia Tetrahymenidae Corliss, 1952 (14,15). Los integrantes de esta familia poseen ciliatura bucal tetrahymenal típica, es decir, una membrana ondulante a la derecha y tres membranelas a la izquierda, en vista oral. La ciliatura del cuerpo es uniforme. Tienen una o dos hileras de cilias post-orales, las

cuales son estomatógenas, es decir, participan en la generación del aparato bucal en una de las células hijas, durante la división celular.

El género Tetrahymena comprende organismos piriformes, pequeños, con 17 a 42 hileras ciliares o meridianos. Poseen 2 meridianos post-orales. La sutura pre-oral (zona en la que convergen las hileras ciliares) es derecha. El citostoma es pequeño, piriforme, se encuentra cerca del extremo anterior y su eje es paralelo al eje del cuerpo; posee un pequeño borde ectoplásmico sobre su margen izquierdo. Tienen una sola vacuola contráctil. El macronúcleo es ovoide y el micronúcleo puede faltar (14).

Se reconocen 14 especies pertenecientes al género Tetrahymena, de las cuales, las mejor caracterizadas han sido: T.pyriformis, T.chironomi, T.setifera, T.rostrata, T.stegomyae, T.corlissi, T.limacis, T.vorax, T.paravorax y T.patula. Las cuatro especies restantes requieren revisión de acuerdo a Corliss (16).

En 1976, T.thermophila fue separada de la especie T.pyriformis por Nanney y McCoy (17). T.thermophila era llamada antes de esta separación T.pyriformis syngen I. Su morfología es muy similar a la de T.pyriformis, pero posee micronúcleo y tiene reproducción sexual. La temperatura óptima de crecimiento (tiempo de generación mínimo) de T.thermophila es de 37°C y tolera hasta 40°C. La designación T.pyriformis se reserva para la progenie del ciliado aislado originalmente por Lwoff en 1923 (1). Estos organismos son amiconucleados, no teniendo reproducción sexual. Su temperatura óptima de cultivo es de 28°C y mueren por encima de los 35°C.

1.3. Componentes celulares de Tetrahymena: Aspectos morfológicos y fisiológicos

1.3.1. Forma y tamaño. Tienen forma de pera (de ello deriva el nombre "pyriformis"), con un largo de unos 50 µm y un ancho de unos 30 µm (18).

1.3.2. Ciliatura y aparato oral. Las ciliias, con una longitud de 5 a 8 μm están distribuidas usualmente en 17 a 21 hileras longitudinales (meridianos primarios) a lo largo de todo el cuerpo (19). Cada meridiano tiene aproximadamente 45 kinetosomas, todos los cuales llevan ciliias (11). La formación de vacuolas alimenticias tiene lugar a través del aparato oral. Este está ubicado anteriormente y define la superficie ventral del animal. Es una depresión poco profunda con tres membranelas ciliares paralelas a la izquierda y una membrana de ciliias fusionadas, la membrana ondulante, a la derecha. En el fondo de la cavidad puede observarse material fibroso y microtúbulos, formando la llamada fibra profunda, que se extiende hacia el interior de la célula (20). Se ha obtenido un mutante que forma un aparato oral defectuoso a 37°C (temperatura restrictiva), siendo incapaz de formar vacuolas a dicha temperatura. A 30°C, su aparato oral es normal y forma vacuolas (21).

1.3.3. Poro anal. La egestión de vacuolas conteniendo el material no digerido se efectúa a través de un único sitio, localizado en la superficie ventral posterior de la célula, llamado poro anal, citoprocto o citopigio (23).

1.3.4. Sistema de la vacuola contráctil. Es una estructura compleja, con función osmorreguladora. Consiste en un par de poros que se abren en la superficie posterior, un sistema de túbulos ramificados y una vacuola que se llena (diástole) y vacía (sístole) a intervalos regulares, dependiendo de la osmolaridad del medio (20).

1.3.5. Mucocistos. Son pequeñas vesículas secretorias de forma cilíndrica, ubicadas debajo de la membrana celular en hileras (meridianos secundarios) que se alternan con los meridianos primarios. El contenido de estas vesículas está altamente condensado y exhibe un ordenamiento regular calificado como paracristalino (23). Los mucocistos se descargan por fusión de sus membranas con la membrana plasmática (exocitosis). Han sido utilizados como modelo para el estudio del comportamiento de las membranas durante la

exocitosis (24,25). Una vez descargados, el contenido de los mucocistos se decondensa, ocupando ahora un volumen 1000 veces mayor. Estas estructuras conservan, sin embargo, su forma y su organización regular (23).

El rol de estas organelas es desconocido y se han aislado mutantes bloqueados en su secreción y que no muestran impedimentos en su crecimiento y multiplicación (26). Se ha propuesto que los mucocistos participan en la formación de quistes de resistencia en T.rostrata (27). Aunque este es un proceso que no se ha encontrado en T.pyriformis o T.thermophila, Tiedtke describió la aparición de una cápsula mucosa formada con material proveniente de los mucocistos cuando estas células son expuestas al colorante Alcian Blue (28). Nuestras propias observaciones indican que los mutantes bloqueados en la exocitosis de mucocistos poseen una eficiencia de filtración de partículas igual a la del tipo salvaje (Florin-Christensen, J., Florin-Christensen, M., Rasmussen, L., observaciones no publicadas), indicando que los mucocistos no participarían en esta función.

1.3.6. Córtex. La membrana plasmática de Tetrahymena es continua con la membrana que recubre las cilias. Por debajo de la misma se encuentra el sistema de sacos alveolares, estructuras membranosas extendidas longitudinalmente, formados por una membrana externa y otra interna que se fusionan a lo largo de los meridianos primarios y secundarios (29). Se ha propuesto para estos sacos la función de reservorios intracelulares de Ca^{++} (30). Por debajo de los sacos alveolares se encuentra un complejo sistema de microtúbulos y fibras que conectan los corpúsculos basales de las cilias entre sí, y una capa ectoplásmica, constituida por material amorfo (29). Por delante de cada cilia, se halla una invaginación de la membrana celular, el saco parasomal. A este nivel, la capa ectoplásmica se halla interrumpida, por lo cual los sacos parasomales son, junto con el citoprocto, los únicos sitios donde la membrana plasmática está en contacto directo con el citoplasma (29). Los sacos parasomales son sitios de activa endocitosis (pinocitosis). Pueden verse con

frecuencia foseas recubiertas (coated pits) y, en su cercanía, vesículas recubiertas (coated vesicles) (31).

1.3.7. Núcleos. T.thermophila posee un macronúcleo, ubicado en posición central, y un micronúcleo, adyacente a él. Este último está ausente en T.pyriformis. Ambos núcleos están rodeados por envolturas de doble membrana, con abundantes poros. El micronúcleo tiene un complemento diploide de DNA, distribuido en 5 cromosomas (22). El macronúcleo contiene 23 veces la cantidad de DNA del micronúcleo y 90% de las secuencias presentes en el micronúcleo se hallan representadas en el macronúcleo. La información contenida en el DNA micronuclear no se expresa durante el crecimiento vegetativo. El único rol conocido del micronúcleo es el de ser reservorio genético para nuevos micro y macronúcleos para la progenie que deriva de la conjugación. El macronúcleo contiene la información para la transcripción y traducción genética durante el crecimiento vegetativo, y por lo tanto determina el fenotipo de la célula(11).

Los genes ribosomales, que se encuentran entre los genes eucariotas mejor caracterizados, se hallan representados en número de 300 copias en el macronúcleo, en tanto que en el micronúcleo existe una sola copia. Las copias del macronúcleo se hallan unidas de a dos formando palindromes casi perfectos (11).

1.3.8. Otras estructuras celulares. Tetrahymena posee 500 a 1000 mitocondrias (11). Su forma varía de esférica a elongada (20). Cada mitocondria contiene varias moléculas de DNA que codifican el RNA ribosomal y los tRNA mitocondriales y algunas proteínas mitocondriales (11).

Los lisosomas se identificaron en Tetrahymena en un período temprano en el desarrollo del concepto de esta organela en las células eucariotas (32). Por fusión con vacuolas alimenticias dan fagolisosomas o lisosomas secundarios. Una subpoblación de los lisosomas, separada por centrifugación en gradientes de sacarosa, parece estar destinada a secreción al medio extracelular (33).

En Tetrahymena, como en otras células eucariotas, se han descrito dos sistemas de membranas, el retículo endoplásmico rugoso (RER), que posee ribosomas asociados, y el retículo endoplásmico liso (SER), sin ellos. Este último está relacionado con estructuras similares al aparato de Golgi, que se encuentran en elevado número, distribuidas en toda la extensión de la célula. Asociadas a estas estructuras, se hallan vesículas que parecen provenir del SER. Se ha sugerido que este sistema interviene en la segregación y empaquetamiento de hidrolasas (20).

1.3.9. Vacuolas alimenticias. Se forman por endocitosis a nivel de la cavidad oral. Las tres membranelas orales y la membrana ondulante, mediante fuerte agitación, generan una corriente de partículas hacia la cavidad oral, las cuales van llenando la vacuola en formación. Cuando ésta alcanza aproximadamente 5 μm se incorpora al citoplasma por endocitosis. En células de cultivos en fase logarítmica se forma una vacuola cada tres minutos, aproximadamente, pudiéndose contar un promedio de 30 vacuolas por célula (34). Luego de la interiorización de la vacuola, se ha documentado en Tetrahymena que su contenido sufre un descenso en el pH y, a continuación, ocurre fusión con lisosomas primarios que aportan hidrolasas ácidas (35). En otro ciliado, Paramecium caudatum, se han descrito vesículas de contenido muy ácido (acidosomas), que se fusionan con las vacuolas alimenticias y serían las responsables del descenso de pH (36). Los acidosomas no fueron observados en Tetrahymena (35).

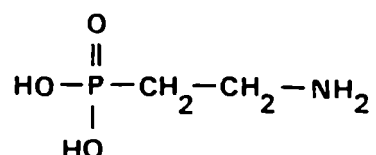
En ciertas circunstancias, como al transferir las células a un medio no nutritivo o al elevar la tensión de dióxido de carbono, se producen vacuolas autofágicas. En ellas pueden identificarse mitocondrias, ribosomas, material nuclear, etc. secuestrados. Estas vacuolas sufren un proceso digestivo similar a las vacuolas alimenticias (37).

El material vacuolar no digerido es descargado al exterior por exocitosis a nivel del citoprocto (35).

1.4. Particularidades de la composición lipídica de las membranas de Tetrahymena

Los lípidos de Tetrahymena han sido objeto de gran número de estudios. Dos notables peculiaridades de este organismo son la presencia de fosfolípidos entre sus lípidos polares y la de tetrahymanol entre sus lípidos neutros.

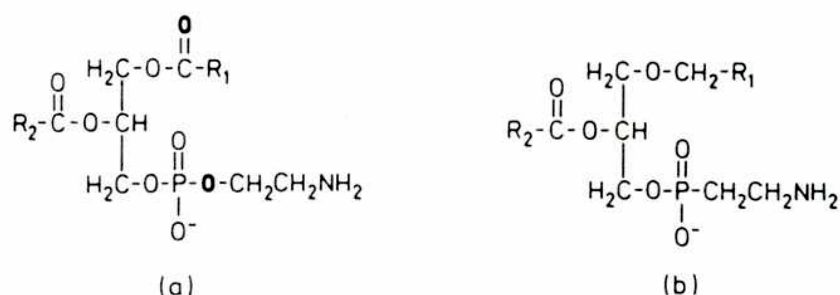
El nombre fosfolípidos ha sido acuñado por Baer y Stanacev (38) para referirse a lípidos que poseen un enlace directo carbono-fósforo en su molécula. Este tipo de unión fue observada por primera vez por Horiguchi y Kandatsu en 1959 (39). Estos autores aislaron e identificaron el ácido 2-aminoetilfosfónico (2-AEP) de ciliados de rumen bovino. La siguiente figura muestra la estructura de este compuesto.



El 2-AEP fue luego observado en Tetrahymena (40) y Liang y Rosenberg (41) demostraron que, en este organismo, se encuentra formando parte de un lípido polar, análogo de la fosfatidiletanolamina, al que se denomina 2-aminoetilfosfolípido (AEPL). El 2-AEP se encuentra además unido a ceramidas, pero en una proporción mucho menor (42). Una característica importante de los fosfolípidos es su marcada resistencia a la hidrólisis enzimática. Esto ha sido comprobado utilizando fosfolípidos sintéticos expuestos a fosfolipasa C (43) y también fue observado respecto de fosfolípidos naturales de Tetrahymena, expuestos a fosfolipasas endógenas del mismo organismo (44).

Un segundo rasgo distintivo del AEPL es la presencia de un enlace éter reemplazando al éster normalmente presente en la posición sn-1 (45). El esqueleto del AEPL es así un gliceriléter, comúnmente alcohol quimílico, es decir que el alcohol de cadena larga, unido en unión éter es de 16 carbonos. La unión éter presente en el AEPL puede conferir estabilidad a las membranas por su mayor resistencia química. Esto ha sido recientemente destacado por Pagano y Sleight (46).

En la figura que se muestra a continuación se compara AEPL y fosfatidiletanolamina. Se han destacado en esta última los dos átomos de oxígeno que están ausentes en el AEPL y que dan lugar a la diferencia entre ambos compuestos.



(a) Phosphatidylethanolamine, (b) 2-aminoethylphosphonolipid.

En 1970, Kennedy y Thompson descubrieron que la membrana superficial de *Tetrahymena* (= membrana plasmática), es decir la membrana directamente expuesta al medio extracelular, se encuentra altamente enriquecida en AEPL respecto de la composición lipídica global de la célula y de la de membranas internas aisladas del mismo organismo. Para el aislamiento de los lípidos de la membrana superficial se utilizó una preparación de cilias purificadas ya que éstas están cubiertas exclusivamente por dicha membrana (47). Casi simultáneamente, Smith dió a conocer una observación similar (48). Estos resultados fueron luego confirmados por Nozawa y Thompson (49). En la siguiente Tabla se muestra la composición lipídica para varias fracciones subcelulares, de acuerdo a estos dos últimos autores (46).

Table I Phospholipid Composition of Various Membrane Fractions from *T. pyriformis* WH-14 Cells*

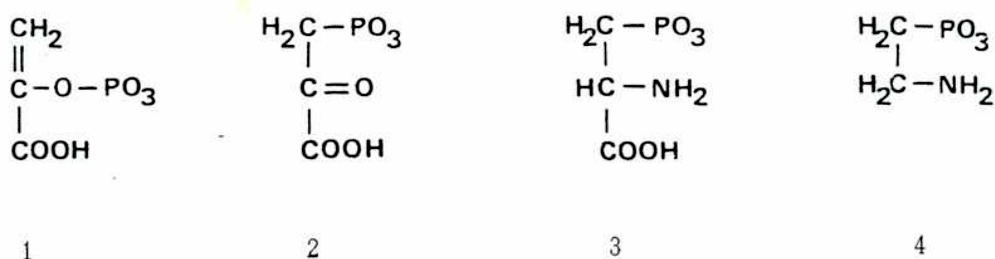
Membrane fractions	C-P bond (% of lipid phosphorus)	Total phospholipids (mole%)*						Tetrahymanol (moles/mole lipid phosphorus)	Glycerol ethers (moles/100 moles of lipid phosphorus)
		LysoPC	PC	LysoAEPL and lysoPE	PE	AEPL	CL		
Whole cells	29	2	33	0	37	23	5	0.057	29.7
Cilia	67	1	28	9	11	47	1	0.30	52.6
Ciliary supernatant	44	8	19	13	16	35	1	0.16	23.1
Pellicles	42	5	25	3	34	30	2	0.084	32.8
Mitochondria	26	2	35	0	35	18	10	0.048	24.7
Nuclear membranes	—	6	31	6	26	23	3	0.036	—
Microsomes	33	1	35	3	34	23	1	0.041	18.3
Postmicrosomal supernatant	26	5	34	4	30	22	2	0.016	27.4

* Data from Nozawa and Thompson (1971a) and Thompson *et al.* (1971).

* PC, phosphatidylcholines; PE, phosphatidylethanolamines; AEPL, 2-aminoethylphosphonolipid; and CL, cardiolipin.

La resistencia de los fosfolípidos al ataque enzimático dio pie a especulaciones sobre un posible rol defensivo de los mismos (47). Estas conjeturas carecían, sin embargo, de soporte experimental. El rol de los fosfolípidos, por consiguiente, siguió siendo considerado como desconocido (51, 52, 53).

La biosíntesis del AEPL sigue una ruta aún no completamente aclarada. Se ha propuesto (54, 55) que el enlace carbono-fósforo aparece por reordenamiento interno en un residuo de fosfoenolpiruvico a ácido 3-fosfono-pirúvico, seguido de una transaminación a ácido 2-amino-3-fosfonopropiónico que, finalmente, se decarboxila a 2-AEP. Las estructuras de estos compuestos se hallan esquematizadas en la siguiente figura.



1. ácido fosfoenolpirúvico
2. ácido fosfono-pirúvico
3. ácido 2-amino-3-fosfono-propiónico
4. ácido 2-aminoetil-fosfónico

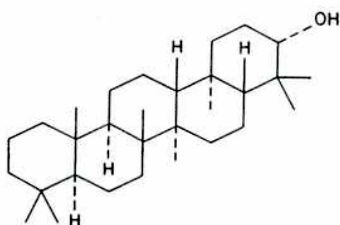
Recientemente, Takada y Horiguchi (56) han demostrado la existencia de ácido 3-fosfonopirúvico en homogenatos de T. pyriformis, dando apoyo al modelo de reordenamiento intramolecular descripto.

Una vez formado, el enlace C-P no se degrada in vivo (51). La notable resistencia química de este enlace ha permitido desarrollar un método para la medición del fósforo presente como fosfato y como fosfonato en materiales biológicos. En este método se utiliza una hidrólisis enérgica con 6N HCl a 125°C durante 48 h, que libera ortofosfato de los ésteres de ácido fosfórico, pero no afecta a los fosfonatos. La

diferencia con el fósforo total, medida después de mineralizar la muestra, es el fósforo presente como fosfonato (57).

Las células de Tetrahymena no producen esteroides, como el colesterol, estigmasterol o ergosterol, pero, en su lugar, contienen el triterpenoide pentacíclico tetrahymanol. Este es el principal lípido neutro presente en las células en crecimiento activo. Su distribución también se muestra en la Tabla reproducida en la página 10. Obsérvese que el tetrahymanol se halla, igual que los fosfolípidos, notablemente enriquecido en la membrana superficial (50).

En la siguiente figura se muestra la estructura de este compuesto.



(esquema tomado de ref. 146)

1.5. Secreción de hidrolasas ácidas en Tetrahymena

Tetrahymena thermophila libera incesantemente hidrolasas ácidas al medio extracelular, entre ellas, fosfatasas, nucleasas, glucosidasas y proteasas (58,59,60). Recientemente, se demostró que estas enzimas pueden cumplir un papel decisivo en la nutrición de T.thermophila. La primera indicación de este hecho se obtuvo en un trabajo independiente de esta Tesis, en el cual demostramos que el mutante NP1, bloqueado en la formación de vacuolas alimenticias, puede utilizar ésteres de fosfato como única fuente del fosfato requerido para su crecimiento y proliferación. Como estos ésteres no permean las membranas celulares, la conclusión fue que eran hidrolizados afuera de las células con anterioridad a su incorporación; o sea que se ponía en evidencia el aprovechamiento de digestión extracelular por exoenzimas en T.thermophila (61).

Müller (33), utilizando centrifugación en gradientes de sacarosa, demostró que estas enzimas provienen de la más densa de dos poblaciones de partículas conteniendo hidrolasas ácidas (lisosomas). Estos resultados sugieren que en T.thermophila hay dos tipos de lisosomas: unos destinados a la digestión intracelular y otros destinados a la secreción.

La vía de liberación de las hidrolasas ácidas es aún desconocida. Recientemente, hemos analizado la conexión entre la liberación de enzimas y una cantidad de procesos en los cuales ocurre endocitosis, exocitosis y reciclado de membranas en T.thermophila. Así hemos podido establecer que la liberación de enzimas es independiente de la formación o egestión de vacuolas alimenticias, de la exocitosis de mucocistos y del funcionamiento de la vacuola contráctil (62).

La liberación de hidrolasas ácidas probablemente tiene lugar por exocitosis. En efecto, los procesos secretorios que ocurren por exocitosis tienen la característica de ser estimulados por una elevación del Ca^{++} libre citoplásmico y, además, son selectivos, es decir, se verifica liberación del contenido de las vesículas secretorias, pero no de

componentes citoplásmicos. Utilizando los ionóforos de Ca^{++} A23187 e Ionomicina y la enzima isocitrato dehidrogenasa como marcador citoplásmico, hemos demostrado ambas características para la liberación de enzimas en T.thermophila (63).

Además de las hidrolasas secretadas, Tetrahymena posee hidrolasas sobre su membrana plasmática. La primera indicación de esto fue obtenida por Zdanowski y Rasmussen para actividad peptidasa (64). Eisen y Tallan sugirieron la presencia de actividad proteasa sobre la membrana de esta célula (65). Tiedtke utilizó un método inmunocitoquímico para demostrar la presencia de β -hexosaminidasa uniformemente distribuida sobre la superficie celular de T.thermophila (66) Finalmente, nuestros propios experimentos han mostrado la presencia de fosfatasa y también de β -hexosaminidasa, ambas ácidas, sobre la membrana celular (Florin-Christensen, M., Florin-Christensen, J. & Rasmussen, L., observaciones no publicadas).

1.6. Ecología de Tetrahymena

El género Tetrahymena ofrece un notable ejemplo de diversidad de modos de vida, con especies usualmente halladas en la Naturaleza como parásitas, en un extremo, y especies que típicamente se encuentran llevando vida libre, en el otro. Un número de especies poseen características intermedias, pudiéndoselas hallar en la Naturaleza tanto como parásitas o como formas de vida libre. Corliss ha propuesto cuatro categorías para las distintas especies de Tetrahymena (16):

1) Formas de vida libre. Comprenden especies que nunca son halladas como parásitas. Pueden desarrollar sólo un parasitismo muy limitado cuando se las inyecta en la cavidad de organismos hospedadores. Se incluyen en esta categoría T.setifera, T.patula, T.vorax y T.paravorax. Es interesante el caso de T.vorax y T.paravorax que poseen formas que se alimentan de bacterias (microstomadas) las cuales, en determinadas condiciones, como por ejemplo al ser transferi-

das a un medio no nutritivo, desarrollan un enorme aparato bucal (formas macrostomadas) y devoran a sus congéneres (canibalismo) (16,67).

2) Formas facultativamente parásitas. Estas especies generalmente llevan un modo de vida libre pero, para ellas, el parasitismo es también una condición natural. Estos ciliados pueden llevar vida parasitaria por tiempo ilimitado. Este es el caso de T.pyriformis y T.rostrata. T.thermophila cae también dentro de esta categoría. Para T.pyriformis, los hospedadores son frecuentemente larvas acuáticas de insectos y la infección es usualmente fatal (19,68). En su vida libre, T.pyriformis es la más cosmopolita de las especies de Tetrahymena. Se la ha hallado además en el mayor número de ambientes distintos, incluyendo aguas dulces (lagunas y arroyos), aguas salobres (marismas), aguas termales y suelos. También se la ha hallado como organismo coprófilo (69,70,71).

3) Formas de vida libre facultativa. Son formas típicamente halladas como parásitas pero capaces de llevar vida libre en la Naturaleza y en forma experimental, por períodos ilimitados. Una especie de este grupo es T.chironomi, frecuente parásita de larvas de quironómidos, que posiblemente penetre a través de lesiones en la cutícula de los insectos durante la muda, causando la muerte del hospedador (68). T.corlissi también está comprendida en este grupo y parasita vertebrados acuáticos (72,73).

4) Formas parásitas. Los integrantes de esta categoría son típicamente parásitos obligatorios, transcurriendo la mayor parte de su ciclo vital dentro de un hospedador. Poseen una fase de vida libre pero, posiblemente, de muy corta duración. Comprende dos especies: T.stegomyae, parásita de larvas de mosquitos, cuya infección es letal para el hospedador (74) y T.limacis, parásita de gasterópodos terrestres, cuya infección es benigna o no patógena (68,75).

1.7. Fosfolipasas

1.7.1. Generalidades

La hidrólisis enzimática de los glicerofosfolípidos es catalizada por diversas enzimas que atacan los distintos enlaces éster de estas moléculas. Los dos tipos básicos de fosfolipasas son, así, las acilhidrolasas - fosfolipasas A₁, A₂ y B - que hidrolizan las uniones de los ácidos grasos con el glicerol, y las fosfohidrolasas - fosfolipasas C y D - que clivan las uniones éster del ácido fosfórico. La siguiente figura muestra los sitios de acción de las distintas enzimas (76).

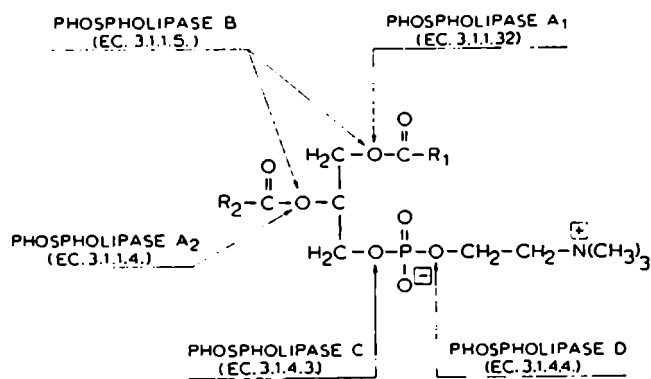


Fig. 1. Sites of attack of phospholipasas on phosphatidylcholine.

(esquema tomado de ref. 76)

Debe tenerse en cuenta que algunas fosfolipasas pueden desempeñar metabólicamente roles de transacilasas, en el caso de las acilhidrolasas, o de transfosfatidilasas, en el caso de las fosfolipasas C y D (77).

1.7.2. Las acilhidrolasas

1.7.2.1. Fosfolipasas A₁

Las enzimas con esta actividad se hallan muy difundidas tanto en células procarióticas como eucarióticas. Las distintas enzimas muestran propiedades muy variadas. Así, en hígado de rata se encuentra actividad fosfolipasa A₁ soluble y asociada a membrana. La primera tiene pH óptimo ácido y no

depende de Ca^{++} y la segunda es alcalina y Ca^{++} -dependiente (78). Las fosfolipasas A_1 muestran, con frecuencia, actividad lisofosfolipasa (76,79,80,81). Por ello, tienen la capacidad de deacilar totalmente las moléculas de fosfolípido, rindiendo ácidos grasos y el correspondiente glicerofosfo-diéster, soluble en agua (glicerofosfocolina, etc.). Las enzimas con esta capacidad se denominan fosfolipasas B (76). Esta actividad lisofosfolipasa es inhibida por detergentes, que actuarían sobre el sustrato impidiendo la degradación de los lisocompuestos (76). Las fosfolipasas A_1 con actividad lisofosfolipasa ejercen su acción deacilante atacando primero la posición sn-1 para dar el 2-acil-lisofosfolípido y luego, hidrolizando este compuesto. Existe otro tipo de fosfolipasa B que es capaz de atacar las dos posiciones, sn-1 y sn-2, del fosfolípido, dando los dos posibles lisoderivados, los que luego son hidrolizados por la misma enzima. Este es el caso de la fosfolipasa B de Penicilium notatum (82). Las lisofosfolipasas que actúan sobre la posición sn-1 y sn-2 se refieren como lisofosfolipasas L_1 y L_2 , respectivamente. Debido a las migraciones que puede sufrir el resto ácido graso en lisocompuestos, no siempre es posible establecer una distinción clara entre estas dos actividades (77). Por último, las fosfolipasas A_1 muestran en muchos casos amplia especificidad de sustrato, mostrando actividades esterasa y lipasa (76,79).

1.7.2.2. Fosfolipasas A_2

Las fosfolipasas A_2 , que hidrolizan el enlace éster de la posición sn-2 de glicerofosfolípidos, son dependientes de Ca^{++} , tienen una especificidad posicional muy estricta y no atacan los lisoderivados. En consecuencia, producen cantidades equimolares de lisofosfolípido y ácido graso a partir del fosfolípido atacado. Se las encuentra en venenos de serpiente, abeja y escorpión (76,83). En los mamíferos, se encuentra una fosfolipasa A_2 pancreática soluble, con función digestiva. En hígado de rata se observaron también fosfolipasas A_2 intracelulares en membrana plasmática, microsomas,

Golgi y mitocondrias. Excepto la lisosomal, todas tienen pH óptimo alcalino y son estimuladas por Ca^{++} . Se purificó fosfolipasa A_2 de eritrocitos de carnero y de plaquetas humanas (76,78).

Las fosfolipasas A_2 pueden cumplir importantes roles fisiológicos. Uno de ellos es la liberación de ácido araquidónico que es precursor de prostaglandinas, prostaciclina, tromboxano AII y leucotrienos (84). La regulación de esta actividad parece depender de la disponibilidad de Ca^{++} (76,78,84) y también puede estar vinculada a receptores hormonales a través de proteínas G (85). Recientemente, se ha propuesto que la fosfolipasa A_2 puede tener una función protectora de membranas, hidrolizando selectivamente ácidos grasos que han sufrido peroxidación (86).

Las técnicas para la determinación de las actividades fosfolipasas A han sido objeto de una revisión por van den Bosch (87).

1.7.3. Las fosfohidrolasas

1.7.3.1. Fosfolipasas C

La fosfolipasa C es una fosfodiesterasa cuya acción libera diacilglicerol y un éster de ácido fosfórico. Esta actividad fue descubierta por Macfarlane y Knight en medios de cultivo del agente de la gangrena gaseosa, Clostridium perfringens (88). Esta es una de las principales fuentes de fosfolipasa C. La enzima, también conocida como toxina α , ha sido purificada y se ha demostrado que posee actividad hemolítica y acción letal contra ratón (89).

Otra importante fuente de enzima es el medio de cultivo de Bacillus cereus. En este caso, la fosfolipasa C es una metaloenzima que lleva dos átomos de Zn^{++} por cada molécula de proteína (90). Esta enzima carece de acción hemolítica (91).

En mamíferos se ha hallado fosfolipasa C lisosomal (92,93) y también se ha encontrado fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol, asociada a la membrana plasmática. Esta

Última posee importante función regulatoria, al dar lugar a la liberación de dos segundos mensajeros, diacilglicerol e inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3). El diacilglicerol es un activador de la protein quinasa C y el IP_3 induce incrementos del Ca^{++} libre citoplásmico, por liberación de este ión del retículo endoplásmico (94,95,96). Una fosfolipasa C también específica para fosfatidilinositol pero, aparentemente, independiente de la anterior, es capaz de solubilizar proteínas que están ancladas en la membrana plasmática por unión a través de enlaces covalentes a una molécula de fosfatidilinositol (97,98).

1.7.3.2. Fosfolipasas D

Las fosfolipasas D producen, a partir de los glicerofosfolípidos, ácido fosfatídico y el correspondiente alcohol (colina, etanolamina, serina, etc.). Estas enzimas son abundantes en ciertas fuentes vegetales (76). Es posible que su función sea la de catalizar transfosfatidilación. Esta reacción se ha aprovechado para preparar fosfolípidos, en base a fosfatidilcolina y un alcohol adecuado (por ejemplo, serina para obtener fosfatidilserina) (99).

1.7.4. Fosfolipasas y membranas

Las fosfolipasas han sido de gran utilidad en el estudio de las membranas biológicas cuyos fosfolípidos, como se sabe, están organizados sustancialmente en bicapas (100). Los eritrocitos humanos y de otras especies fueron el modelo más usado y los estudios se efectuaron con fosfolipasas altamente purificadas. Así, se observó que al tratar eritrocitos intactos con fosfolipasa A_2 de veneno de cobra (Naja naja) no hay hemólisis y, sin embargo, se produce la hidrólisis de gran parte de la fosfatidilcolina (PC), pero no de la fosfatidiletanolamina (PE) o la fosfatidilserina (PS). En contraste, al tratar fantasmas de glóbulos rojos en los que la enzima tiene acceso a la capa interna, se observa hidrólisis de todos los fosfolípidos sensibles a la acción de

esta enzima. Similarmente, cuando se tratan glóbulos rojos intactos con esfingomielinasa de Staphylococcus aureus, que tampoco es hemolítica, se obtiene hidrólisis de más del 80% de la esfingomielina (SM) del eritrocito (101). De estos experimentos y otros similares (100) se concluyó que la capa externa y la capa interna de la membrana tienen distinta composición. En la primera predominan PC y SM y, en la segunda, PE y PS. Esta organización expone los fosfolípidos de colina (PC y SM), que son más estables al medio extracelular y reserva los aminofosfolípidos (PE y PS), más reactivos, para la capa expuesta al medio intracelular, sobre el que la célula ejerce un control más estrecho (102). Resultados obtenidos aplicando otras metodologías, como el empleo de reactivos para grupos amino que no permean membranas, condujeron a las mismas conclusiones (102). Recientemente, se ha descrito un complejo enzimático, al que se denominó flipasa, que puede dar cuenta de la generación de la asimetría en los fosfolípidos de membrana (103).

La comparación de la acción de fosfolipasas sobre membranas de eritrocitos intactos con la hidrólisis de fosfolípidos en capas monomoleculares, sometidos a distintas presiones laterales de superficie, permitió llegar a interesantes conclusiones. Se observó que, de distintas fosfolipasas, sólo aquellas que pueden hidrolizar fosfolípidos a presiones laterales de superficie mayores que 31 dyn/cm, pueden atacar a los fosfolípidos en membranas intactas (100,104). Estos resultados sugieren que la capacidad de atacar membranas está relacionada con la capacidad de las enzimas de penetrar en las capas de fosfolípidos. Además sugieren que el empaquetamiento de los fosfolípidos en la capa externa es tal que resulta comparable a una capa monomolecular sometida a una presión lateral de superficie del orden de 31 dyn/cm.

1.7.5. Fosfolipasas lisosomales

La degradación de fosfolípidos por enzimas lisosomales fue objeto de numerosos estudios, en la mayor parte de los casos llevados a cabo sobre lisosomas purificados de hígado de

ratas previamente inyectadas con Tritón WR 1339 (tritosomas). Este detergente se acumula en los lisosomas, alterando su densidad y permitiendo su purificación por centrifugación en gradientes de sacarosa (78). Mellors y Tappel (105) hallaron en estos lisosomas fosfolipasas A_1 y A_2 ácidas, no dependientes de Ca^{++} . Estos autores también encontraron actividades lisofosfolipasas L_1 y L_2 . La acción conjunta de estas enzimas podía dar lugar, así, a la deacilación completa de PC. Un resultado semejante fue obtenido por Fowler y de Duve (106) quienes observaron además que los fosfodiésteres glicerofosfocolina y glicerofosfoetanolamina no son atacados por enzimas lisosomales. En este trabajo también dan cuenta de la presencia de actividad esfingomielinasa en lisosomas. Franson et al (107) separaron, por filtración en Sephadex G 50, actividades fosfolipasas A_1 y A_2 lisosomales y observaron que ambas son ácidas e independientes de Ca^{++} . Hostetler et al (108) purificaron cinco isoenzimas con actividad fosfolipasa A_1 de lisosomas de hígado de rata, todas las cuales resultaron ácidas y no mostraron requerimiento de Ca^{++} . Estas enzimas son estimuladas por Tritón X-100 y por Cl_2Hg . Dawson et al (109) estudiaron la degradación de fosfatidilinositol por enzimas lisosomales y encontraron que, además del camino de deacilación, existe degradación por una fosfolipasa C específica para este fosfolípido. Esta vía resultó ser la predominante para el fosfatidilinositol, cuando se analizó la degradación de lípidos microsomales (110). Hostetler, en 1980, demostró la existencia de una fosfolipasa C lisosomal con amplia especificidad de sustrato, de pH óptimo ácido y que no requiere Ca^{++} para su actividad (111). Esta enzima recibió la atención de otros autores porque la misma puede ser también responsable de la actividad esfingomielinasa, cuya deficiencia es causa de la enfermedad de Niemann-Pick (112-115).

La degradación de PC y PE por el sistema lisosomal fue estudiada detalladamente por Kunze et al (116). Estos autores encontraron que la vía predominante implica la acción secuencial de fosfolipasa A_1 , seguida de lisofosfolipasa. Los liso-

derivados pueden ser también atacados por una fosfolipasa C. El monoacilglicerol liberado es luego deacilado por una lipasa. La lisofosfolipasa C y la fosfolipasa C son posiblemente una misma enzima (116).

1.7.6. Fosfolipasas en Tetrahymena

La presencia de fosfolipasas en homogenatos de Tetrahymena fue observada por primera vez por Eichel (117). Este autor encontró que, en preparaciones de mitocondrias, se generaba un agente inhibidor de la fosforilación oxidativa que identificó como lisofosfatidilcolina. Thompson halló importante degradación de lípidos endógenos en homogenatos y en células sometidas a diversas manipulaciones. Demostró la formación de lisocompuestos y sugirió también la presencia de fosfolipasa C. Estos estudios lo llevaron a proponer la utilización de condiciones de cultivo y cepas en las que la degradación de lípidos por fosfolipasas endógenas afectara en un mínimo las investigaciones sobre el metabolismo lipídico en Tetrahymena (118,119).

El tema fue explorado nuevamente por Arai *et al* (120), quienes estudiaron la actividad fosfolipasa de homogenatos de este ciliado como función del pH. Hallaron una actividad fosfolipasa A, alcalina, dependiente de Ca^{++} , que está asociada principalmente con las membranas corticales. A pH ácido, describieron la formación, independiente de Ca^{++} , de LPC, DG y MG, a partir de PC, sugiriendo la presencia de fosfolipasas A y C ácidas. Los mismos autores, en un trabajo posterior (121), utilizando métodos de fraccionamiento celular, aislaron lisosomas de este organismo y hallaron fosfolipasa A y fosfolipasa C asociadas a los mismos. Observaron un aumento de la actividad específica de estas enzimas en los lisosomas, respecto del homogenato total. Este aumento fue acompañado de un aumento paralelo de actividad fosfatasa ácida. Estos resultados sugieren fuertemente que las fosfolipasas A y C ácidas pertenecen al sistema lisosomal. El estudio de la degradación de PC por los lisosomas aislados mostró, además, acumulación de tres productos, principalmente

FFA, LPC y MG. Si en los medios de incubación se incluía un detergente, se observó, en cambio, acumulación de DG, FFA y LPC, esta última, en proporción algo menor. Basados en estos resultados, Arai *et al* sugirieron que el efecto del detergente es la estimulación de la acción de la fosfolipasa C sobre PC, lo que conduciría a la acumulación de DG. En ausencia de detergente, la fosfolipasa C actuaría preferencialmente sobre LPC, rindiendo MG.

Finalmente, en otro trabajo del mismo laboratorio (122) se investigó la degradación de fosfolípidos exógenos marcados radiactivamente, agregados a suspensiones de *Tetrahymena*. Los autores, que utilizaron células lavadas de su medio de cultivo y transferidas a un medio nuevo, muestran evidencias indicando que los fosfolípidos son incorporados a fagolisosomas. La mayor parte de la radiactividad suministrada como PC se recupera en TG. En este estudio también se demuestran actividades MG- y DG-acil-transferasas asociadas a microsomas. Estos resultados junto con las observaciones del trabajo anterior, llevaron a la conclusión que los fosfolípidos son degradados en los lisosomas a MG y FFA, los cuales son incorporados al citoplasma y reesterificados a TG sobre membranas por la vía del monoacilglicerol. Apoyando esta conclusión, este trabajo demuestra finalmente una incorporación 1:1 en TG entre [¹⁴C] glicerol y [³H] oleato cuando estos precursores se suministran como partes integrantes de una molécula doblemente marcada de PE, en la cual el [³H] oleato ocupa la posición sn-1.

1.8. Lipasas

1.8.1. Generalidades

Las lipasas son un tipo particular de esterasas, caracterizadas por actuar en la interfase de un sistema heterogéneo, compuesto por el medio acuoso y el sustrato lipídico. En la mayor parte de los casos, las lipasas inician la hidrólisis de TG atacando los enlaces que ocupan los alcoholes primarios (posiciones sn-1 y sn-3). Los DG y, especialmente, los MG formados son degradados más lentamente, lo que conduce a la acumulación de estos últimos (123).

La lipasa pancreática, que interviene en la digestión de TG es, posiblemente, la mejor caracterizada. Actúa con una pequeña proteína auxiliar, la colipasa, que ayuda a anclar a la lipasa a la interfase, aumentando su actividad. La degradación intestinal de TG comienza en el duodeno, hacia donde se secreta la lipasa y sales biliares emulsificantes. Por acción de la lipasa, se originan FFA y MG, que son absorbidos por las microvellosidades del epitelio. A partir de estos productos, en las células de este epitelio, se resintetizan los TG por el camino del monoacilglicerol. Este camino involucra actividades acil-CoA-sintetasa, MG-acil-transferasa y DG-acil-transferasa. Los TG formados son finalmente liberados hacia los canales linfáticos formando parte de los quilomirones (123).

1.8.2. Lipasas lisosomales

Hayase y Tappel (124) demostraron la presencia de TG lipasa en lisosomas aislados de hígado de ratas inyectadas previamente con Tritón WR 1339. Al igual que las fosfolipasas lisosomales, esta actividad es escasamente afectada por el Ca^{++} y el Na_2 EDTA. Es inhibida por Tritón X-100 y por reactivos que bloquean grupos tioles.

Las lipasas lisosomales son, característicamente, inhibidas por la clorpromazina (125,126).

Existen numerosas lipasas en el hígado de rata (126), pero la lipasa lisosomal parece ser la más importante en la degradación intracelular de TG en hepatocitos (127).

2. Materiales y Métodos

2.1. Materiales

Se detallan a continuación los materiales empleados en este trabajo, seguidos de sus fabricantes.

- Proteosa peptona y extracto de levadura: Difco Laboratories (Detroit,MI,USA) y Oxoid (Inglaterra); extracto de levadura, también de Laboratorios Britania (Argentina).
- Frascos tipo Fernbach para cultivo: Jena Schott (Mainz, Alemania Federal).
- Cámara de conteo: Sedgewick Rafter Counting Cell S50 (Graticules Ltd.,Tonbridge,Inglaterra).
- Asolectina: American Lecithin Co. (Woodside,NY,USA).
- Silica Gel HR60 y sulfato de amonio: Merck (Darmstadt, Alemania Federal).
- Standards de lípidos: Nu Chek Prep. Inc.: (Elysian, MN, USA).
- Fosfolipasa C de Bacillus cereus: Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Alemania Federal).
- Fosfolípidos radiactivos: 1,2-di-[1- ¹⁴C] estearoil-sn-glicero-3-fosfocolina y 1-palmitoil-2-[1- ¹⁴C] oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina: The Radiochemical Center (Amersham, Inglaterra).
- Hydrocount: J.T.Baker Chemicals B.V. (Deventer,Holanda).
- CM y DEAE celulosa: Whatman, H. Reeve Angel and Co. (Londres, Inglaterra).
- Sepharose 6B, Sephadex G75, Sephadex G50 y Blue Dextran 2000: Pharmacia (Uppsala, Suecia).
- Filtros de nitrocelulosa de 0,22 μ m: Millipore (Millipore AB, Vedbæk, Dinamarca).
- Fosfatidilcolina de soja tipo II-S, albúmina de suero bovino libre de ácidos grasos, standards proteicos para determinaciones de peso molecular, p-nitrofenilfosforilcolina, p-nitrofenilfosfato, drogas para medio definido, standards de lípidos, Tritón X-100, Tris-HCl, Tris base

libre, clorpromazina, lipasa pancreática y fosfolipasa D de semilla de maní: Sigma Chemical Co. (St.Louis,MO,USA).

- p-nitrofenil- β -D-glucosamínido: Serva (Heidelberg, Alemania Federal).

- Contador de centelleo líquido, Beckman LS 8000.
- Espectrofotómetro, Pye Unicam 2000.
- Centrífuga refrigerada, IEC PR 6000.
- Centrífuga de alta velocidad, Sorvall
- Colector de fracciones Ultrorac, con monitor para UV y registrador, LKB.
- Bomba peristáltica Varioperpex, LKB.
- Columnas para cromatografía, Quickfit y Pharmacia.
- Microcentrífuga de alta velocidad, Ole Dich.

2.2. Cultivos

2.2.1. Cepas

En estos estudios se utilizó el protozoo ciliado Tetrahymena thermophila, cuya temperatura óptima de cultivo (tiempo de generación mínimo) es 37°C. Este organismo también puede cultivarse a 30°C. Se emplearon las cepas tipo salvaje DIII, BIII y CU399 y las cepas mutantes NP1 y MS-1. CU 399 es un heterocarionte cuyo macronúcleo determina el fenotipo de la cepa BIII y cuyo micronúcleo posee una mutación recesiva de resistencia a cicloheximida (128). NP1, derivado de la cepa DIII, tiene una mutación macronuclear que le produce incapacidad para formar vacuolas alimenticias cuando se la cultiva a 37°C (21). La cepa MS-1, derivada de CU 399, está bloqueada constitutivamente en la secreción de enzimas lisosomales al medio extracelular. Este fenotipo está causado por una mutación micronuclear recesiva en un gen único (128). Se realizaron algunos estudios con otra especie, Tetrahymena pyriformis, cepa GL, que es la cepa originalmente aislada por André Lwoff en 1922 (1). Esta se cultiva en los mismos medios que T.thermophila a 28°C, siendo la temperatura de 37°C, letal.

2.2.2. Medios de cultivo

Para los distintos experimentos, se emplearon tres medios de cultivo:

2.2.2.1. Medio PPY. Es un medio líquido complejo, compuesto por proteosa peptona, extracto de levadura y sales, de acuerdo a Plesner, Rasmussen y Zeuthen (129). Su composición se indica en la siguiente Tabla.

Composición del medio PPY.

Compuestos	Cantidades para 100 ml de medio
Proteosa peptona	0,75 g
Extracto de levadura	0,25 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	10 mg
CaCl ₂ · 2H ₂ O	5 mg
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) · 6H ₂ O	2,5 mg
CuCl ₂ · 2H ₂ O	0,5 mg
FeCl ₃ · 6H ₂ O	0,12 mg
MnCl ₂ · 4H ₂ O	0,05 mg
ZnCl ₂ · H ₂ O	0,005mg

Para su esterilización, este medio se autoclava a 121°C durante 30 min.

Las distintas cepas se mantuvieron en tubos de ensayo conteniendo 4 ml de medio PPY, a temperatura ambiente, y se hicieron repiques cada semana. Para el mantenimiento de las cepas por periodos prolongados, se utilizaron medios con menor valor nutritivo o de nutrientes menos fácilmente accesibles, como cerebro de rata o garbanzos, autoclavados en agua destilada. En este caso sólo es necesario repicar cada 2-3 meses

En medio PPY, el tiempo de generación es de 2,5 a 3 h y la densidad final alcanzada en cultivos estáticos es aproximadamente de 8×10^5 células/ml y en cultivos con agitación recíproca o rotatoria es de 10^6 células/ml.

2.2.2.2. Medio PPY-NaCl

Este medio tiene la misma composición que el medio PPY, con el agregado de 0,15 M NaCl. Se utilizó para estudiar la interacción "in vivo" entre Tetrahymena y glóbulos rojos, y también para la obtención de medio extracelular para la caracterización de la actividad hemolítica y la purificación de las actividades lipolíticas. Se utilizaron células que estaban adaptadas a crecer en este medio después de seis repiques. Para los cultivos se usaron frascos tipo Fernbach

de 450 ml o de 2 l, conteniendo 75 o 300 ml de medio, respectivamente, que se mantuvieron a 37°C, sin agitación. La densidad inicial fue de 5×10^3 células/ml y la final, $4,5 \times 10^5$ células/ml.

Las células adaptadas a la presencia de NaCl muestran un tiempo de generación de 5 h y alcanzan una densidad final igual a la mitad de la de cultivos no suplementados. Sin embargo, el pH de los cultivos adaptados permanece aproximadamente neutral, en contraste con el de los cultivos no suplementados, donde el pH aumenta con la edad, produciéndose efectos deletéreos en las células. Así, los cultivos en NaCl se mantienen sin células muertas o rotas por al menos el doble de tiempo que los no suplementados (4-5 días contra 2-3 días, respectivamente), lo cual contribuye a la acumulación de mayores cantidades de actividades hemolítica y lipolíticas. También se observó que estas actividades son más estables en el medio suplementado. Las células crecidas en presencia de NaCl tienen movilidad y forma normales, excepto por un ligero aplanamiento debido a las condiciones hipertónicas.

2.2.2.3. Medio definido

Para el estudio de la secreción de actividades hemolítica y lipolíticas, se utilizaron también cultivos crecidos a 30°C en tubos de ensayo conteniendo 2 ml de medio químicamente definido. La composición del medio fue de acuerdo a Rasmussen y Modeweg-Hansen (130). El medio se prepara mezclando cantidades adecuadas de soluciones stock de cada uno de los grupos de compuestos (aminoácidos, vitaminas, etc.). La mezcla se ajusta a pH 7 con HOK 0,1 N y se esteriliza por pasaje a través de membranas filtrantes de nitrocelulosa estériles de 0,22 μ m.

En este medio, el tiempo de generación es de 3 h y la densidad final alcanzada es de aproximadamente 4×10^5 células/ml.

2.2.3. Medición de la densidad de los cultivos

Se utilizó un contador electrónico de células de acuerdo al diseño del Dr L. Rasmussen, Universidad de Odense, Dinamarca. Este instrumento registra pulsos originados en elevaciones bruscas de impedancia, que ocurren cuando, mediante una bomba peristáltica se hace pasar la suspensión celular a través de un tubo, cuyo extremo posee un orificio calibrado de diámetro adecuado (75 a 100 μm). Al pasar una célula por dicho tubo, el orificio es parcialmente obstruido, dando lugar al mencionado aumento brusco de la impedancia entre el interior y el exterior del tubo. El aparato se calibró periódicamente mediante conteo directo bajo microscopio, utilizando una cámara de conteo Sedgwich Rafter de 1 ml. El instrumento utilizado mostró una gran estabilidad, no habiendo sido necesario efectuar ajustes en más de dos años seguidos de uso.

2.3. Medición de actividad citolítica

2.3.1. Preparación de suspensiones de eritrocitos

Para estudiar la actividad citolítica se emplearon eritrocitos de carnero y humanos. La sangre se obtuvo en forma aséptica y se guardó a 4°C en solución estéril de Alsever modificada. Esta consistió en 8 g/l de citrato de sodio, 4,2 g/l de NaCl, 20,5 g/l de glucosa y 0,55 g/l de ácido cítrico. La solución se esterilizó por filtración y se usaron 2 partes por cada parte de sangre. Los glóbulos rojos se separaron por centrifugación a 2500 rpm por 10 min en una centrífuga clínica de mesa y se lavaron tres veces con 20 mM Tris-HCl/ 0,15 M NaCl, pH 7,0 (buffer TBS), para ser finalmente resuspendidos en el mismo buffer.

2.3.2. Determinación del número de unidades hemolíticas

Se preparó una suspensión de eritrocitos en buffer TBS en una concentración tal que al lisarlos por dilución al décimo en agua destilada, resultaran en una absorbancia de 0,3 a 540

nm. Se hicieron diluciones seriadas de la muestra en estudio en 20 mM acetato de sodio/ 0,15 M NaCl, pH 5,5. Se agregó 0,1 ml de la suspensión de eritrocitos preparada a 0,9 ml de cada dilución. Los tubos se incubaron a 37°C por 1 h. Se centrifugaron luego durante 30 s en una microcentrífuga de alta velocidad y la hemoglobina liberada fue valorada espectrofotométricamente a 540 nm. Se preparó una curva de calibración de hemoglobina en las mismas condiciones para determinar porcentajes del total liberado. Por interpolación, se determinó la dilución de la muestra que daba lugar a 50% de liberación de hemoglobina. Esta dilución contiene, por definición 1 unidad hemolítica por ml (1 HU/ml). La inversa del factor de dilución expresa así el número de HU presentes en la muestra sin diluir.

2.3.3. Cinética de la hemólisis

Se obtuvieron también datos cuantitativos de la actividad hemolítica, usando un espectrofotómetro con cuveta termostaticada a 37°C, con registrador incorporado. En éste, se registró la variación con el tiempo de la absorbancia a 500 nm al exponer una suspensión de eritrocitos a muestras de medio extracelular de Tetrahymena. En este caso, la concentración de eritrocitos se ajustó de tal manera que la absorbancia aparente a 500 nm fuera de 0,9, usando como blanco medio sin glóbulos rojos. En estas condiciones, a medida que los glóbulos rojos son lisados, la suspensión se vuelve más transparentes, por lo cual la absorbancia aparente decrece.

2.3.4. Interacción "in vivo" entre Tetrahymena y glóbulos rojos.

Estos experimentos se llevaron a cabo con células cultivadas en medios suplementados con 0,15 M NaCl, ya que los medios sin suplementar son hipotónicos y causan lisis osmótica de los glóbulos rojos. Los eritrocitos son estables en estos medios por al menos 48 h, tienen forma normal y no aparecen crenados. Se utilizaron cultivos de Tetrahymena de las cepas BIII, DIII y el mutante derivado de esta última,

NP1, bloqueado en la formación de vacuolas alimenticias, crecidos durante 24 h a 37°C. Los cultivos fueron inoculados a una densidad de 2×10^4 células/ml y a las 24 h se hallaban en fase logarítmica. Los experimentos se llevaron a cabo directamente con alícuotas de los cultivos o con suspensiones de los ciliados lavados y resuspendidos en buffer TBS, a los que se agregaron eritrocitos lavados en este mismo buffer. La concentración final de eritrocitos fue 0,5% (v/v). Las incubaciones se realizaron a 37°C. La valoración de los resultados se efectuó por observación directa por microscopía de campo claro o de contraste de fase de muestras extraídas a distintos tiempos, o bien centrifugando alícuotas de las suspensiones celulares y valorando espectrofotométricamente la hemoglobina liberada, a 540 nm.

2.4. Medición de actividades enzimáticas

2.4.1. Detección de actividades lipolíticas

Para la detección de las actividades lipolíticas, se utilizó como sustrato asolectina, un extracto de lípidos de semilla de soja, que contiene aproximadamente partes iguales de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina + fosfatidilinositol, y un 5% de lípidos neutros (mono, di y triglicéridos y ácidos grasos), de acuerdo al fabricante. Se preparó una suspensión de asolectina de 30 mg/ml en agua destilada, que se dispersó por sonicación con un sonicador Branson (50 W, 20 min, temperatura ambiente). El ensayo consistió en 40 μ l del sustrato así preparado, 40 μ l de buffer acetato de sodio 0,5 M, pH 5,0, y 320 μ l de muestra a estudiarse. Después de 1 h de incubación a 37°C, se extrajeron los lípidos de acuerdo a Bligh y Dyer (131). Para ello, se agregó a cada tubo 1,5 ml de cloroformo/metanol (1:2), agitando hasta que quedara formada una sola fase, seguido de 0,5 ml de cloroformo y 0,5 ml de HCl 0,1 N. Las fases inferiores, conteniendo los lípidos, se separaron y evaporaron bajo nitrógeno. Los lípidos fueron separados por

cromatografía en capa fina (thin layer chromatography, TLC). Para ello, las muestras se sembraron en placas de Silica Gel HR 60, preparadas en el laboratorio. Los cromatogramas se desarrollaron usando, como mezclas de solventes, cloroformo/metanol/ ácido acético/ agua (50:25:7:3, v/v), para separar los distintos fosfolípidos, y hexano/ dietiléter/ metanol/ ácido acético (90:20:3:2, v/v), para separar lípidos neutros. Las manchas se visualizaron por exposición a vapores de yodo. En las placas de lípidos neutros, un gran aumento de ácidos grasos, con disminución de fosfolípido indicó la presencia de fosfolipasa A; el aumento de diacilglicerol, de fosfolipasa C y la disminución de triacilglicerol, de triacilglicerol lipasa. La fosfolipasa A también se detectó por un aumento de lisofosfatidilcolina y lisofosfatidiletanolamina, en las placas de lípidos polares.

Se observó que es posible efectuar un doble desarrollo de la placa, utilizando primero la mezcla para separación de fosfolípidos, la cual se permite llegar hasta la mitad de la placa, y luego, la mezcla para separación de lípidos neutros, la que se deja ascender hasta el extremo superior. Este método se basa en que los lípidos neutros corren en el frente con el primer sistema y se separan con el segundo en la mitad superior de la placa. Los lípidos polares se separan con el primer sistema en la mitad inferior de la placa, no siendo su posición detectablemente afectada por los solventes del segundo sistema. De este modo, es posible confirmar la presencia de fosfolipasa A en una muestra dada, al evidenciar en la misma tanto aumento de ácidos grasos como producción de lisocompuestos.

El análisis de los productos de degradación de la asolecina resultó muy útil para detectar las distintas actividades en los eluatos de las columnas empleadas en las etapas de purificación, ya que en una misma muestra pueden detectarse las tres actividades lipolíticas. Sin embargo, para la caracterización de las enzimas fue necesario el empleo de fosfolípidos marcados radiactivamente, que hicieran posible un análisis cuantitativo de los productos.

2.4.2. Medición de actividad fosfolipasa C

Se utilizó como sustrato 1,2-di-[1-¹⁴C] estearoíl-sn-glicero-3-fosfocolina, que se diluyó con fosfatidilcolina de semilla de soja a una actividad específica de 0,06 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$. La concentración de fosfolípido fue de 3,2 $\mu\text{mol}/\text{ml}$. Esta mezcla se dispersó con un sonicador Branson (50 W, 3 min, T° ambiente). Los ensayos consistieron en 100 μl de muestra a estudiar, 50 μl de sustrato y 50 μl de buffer acetato de sodio 0,25 M, llevado a pH 5 con ácido acético 0,25 M y que contenía 4% de Tritón X-100 (v/v). El detergente fue agregado por su efecto activador de la actividad fosfolipasa C al doble. Luego de incubar por 1 a 3 h a 37°C, las reacciones se terminaron agregando 0,75 ml de cloroformo/ metanol (1:2, v/v) y se extrajeron los lípidos según Bligh y Dyer. A cada muestra se agregó como carrier 0,5 mg de 1,2-diacilglicerol, obtenido por hidrólisis enzimática de fosfatidilcolina de huevo con fosfolipasa C de Bacillus cereus, para facilitar la posterior visualización de la mancha correspondiente. Los lípidos se separaron en placas de TLC de Silica Gel HR 60, utilizando la mezcla de solventes para lípidos neutros descrita en 2.4.1. Las manchas se hicieron visibles por exposición a vapores de yodo y se marcaron las correspondientes a 1,2-diacilglicerol. Luego de evaporar el yodo en estufa a 110°C durante 5 min, se recogieron las porciones de Silica Gel conteniendo el mencionado lípido, en viales de centelleo líquido, los que después de agregarles 0,5 ml de agua y 5 ml de Hydrocount, fueron contados en un contador de centelleo líquido Beckman 8000. Las eficiencias de conteo se determinaron para cada lote de líquido de centelleo preparado, mediante el método del standard externo.

En algunos experimentos se utilizó como sustrato 1-palmitoíl-2-[1-¹⁴C] oleoíl-sn-glicero-3-fosfocolina. El ensayo fue en lo demás igual al ya descrito.

2.4.3. Medición de actividad fosfolipasa A₁

Para medir esta actividad se utilizaron los dos sustratos

radiactivos mencionados en el punto 2.4.2., que se diluyeron a actividad específica de $0,01 \mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$, añadiéndoles fosfatidilcolina de semilla de soja tipo II-S de Sigma. Esta observó que este tipo de fosfatidilcolina comercial daba lugar a degradaciones 20 veces mayores de los fosfolípidos radiactivos respecto de los ensayos llevados a cabo utilizando fosfatidilcolina altamente purificada (tipo III-S de Sigma). Las mezclas de sustrato consistieron en 12 mg/ml de fosfatidilcolina tipo II-S (conteniendo 2 nmoles de fosfatidilcolina pura) y $0,2 \mu\text{Ci/ml}$ de uno de los fosfolípidos radiactivos. Estas mezclas fueron dispersadas por sonicación en un sonicador Branson (50 W , 3 min , T° ambiente) Los ensayos consistieron en $50 \mu\text{l}$ de sustrato, $50 \mu\text{l}$ de una solución al 10% de albúmina de suero bovino libre de ácidos grasos en agua destilada, $50 \mu\text{l}$ de buffer acetato de sodio, $\text{pH } 4.5$ y $50 \mu\text{l}$ de muestra a estudiar. Luego de la incubación a 37°C durante 15 min , se terminaron las reacciones y los lípidos se extrajeron y cromatografiaron del modo como se describe en 2.4.1. Las porciones de Silica Gel conteniendo las manchas correspondientes a lisofosfatidilcolina, fosfatidilcolina y ácidos grasos libres fueron recogidas en viales de centelleo y contadas como se describe en 2.4.2.

2.4.4. Medición de actividad triacilglicerol lipasa

Esta actividad se midió por la hidrólisis de tri-[$1\text{-}^{14}\text{C}$] oleoilglicerol. El sustrato se preparó usando una modificación del método de Nilsson-Ehle y Ekman (132). La fosfatidilcolina de huevo, usada por estos autores, fue reemplazada por fosfatidilcolina de soja tipo II-S para emulsificar la trioleína. Al igual que en el caso de la fosfolipasa A, se encontró aquí también que este fosfolípido producía un marcado efecto estimulador sobre la degradación de triacilglicerol. se observó que la dispersión de trioleína con goma arábica o Tritón X-100 no era efectiva para ensayar la triacilglicerol lipasa de Tetrahymena. El sustrato contenía $20,4 \text{ mM}$ de trioleína con una actividad específica de $0,022 \mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$.

Esta se obtuvo diluyendo el tri-[1-¹⁴C] oleoílglicerol con trioleoílglicerol "frío" (de Sigma). Las mezclas de reacción consistieron en 40 μ l de sustrato, 50 μ l de 0,5 M acetato de sodio, pH 4,5, 90 μ l de 0,3 M NaCl y 20 μ l de muestra a estudiar. Después de incubar durante 5 a 60 min, las reacciones se terminaron y los lípidos se extrajeron y cromatografiaron como se indica en 2.4.1., utilizando la mezcla de solventes para separar lípidos neutros. Se recogió la Silica Gel conteniendo mono-, di- y triacilglicerol y ácidos grasos libres, y se contaron como se describió en 2.4.2.

Tanto el ensayo de esta actividad como el de la fosfolipasa A₁ y el de la fosfolipasa C fueron lineales con el tiempo y la concentración de enzima. Todos los ensayos se llevaron a cabo por duplicado. Los valores blanco, que corresponden a sustrato incubado en las mismas condiciones pero sin enzima, fueron sustraídos.

2.4.5. Preparación de sustratos marcados

Para la obtención de fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina marcadas radiactivamente se utilizaron semillas de soja en germinación. La marcación se hizo impregnando semillas con una solución de [1-¹⁴C] acetato, de acuerdo al método descrito por Hoelzl y Wagner (133). Las semillas se trituraron luego en licuadora y se extrajeron finalmente por el método de Bligh y Dyer. La fase inferior se concentró por evaporación al vacío y los fosfolípidos se separaron primeramente por precipitación con acetona a 0°C, seguida de centrifugación a 2500 xg por 15 min. El pellet de fosfolípidos se disolvió en cloroformo y se utilizó para sembrar placas de TLC preparativas (0,5 mm), que se desarrollaron utilizando la mezcla descrita para separación de lípidos polares en la sección 2.4.1. Las porciones de Silica Gel conteniendo fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina se separaron de las placas, y los lípidos se eluyeron con cloroformo/ metanol/ agua (5:5:1, v/v) de acuerdo a Christie (134) Para la obtención de datos cuantitativos se midió el fósforo

en los fosfolípidos por el método de Ames, luego de mineralización (135), y la radiactividad liberada como ácidos grasos, luego de saponificación total, de acuerdo a Kates (136). En base a estos datos es posible calcular la actividad específica de los ácidos grasos (dpm/nmol), puesto que, en un fosfolípido, por cada nmol de fósforo, existen 2 nmoles de ácidos grasos. De esta forma, es posible expresar las actividades enzimáticas en nmoles por unidad de tiempo por unidad de proteína, a partir de mediciones de radiactividad asociada a ácidos grasos.

2.4.6. Determinación colorimétrica de hidrolasas ácidas.

Se midieron las actividades fosfatasa ácida, β -hexosaminidasa (N-acetil- β -D-glucosaminidasa) y una actividad fosfodiesterasa, utilizando sustratos que llevan acoplado p-nitrofenol de tal forma que éste es liberado por la acción de las enzimas y puede cuantificarse espectrofotométricamente después de una alcalinización del medio, la que además sirve para interrumpir la reacción.

2.4.6.1. Medición de la fosfatasa ácida

La mezcla de reacción consistió en 100 μ l de p-nitrofenilfosfato 25 mM, en buffer acetato de sodio 0,25 M, pH 4,5 y 100 μ l de muestra. Después de incubar a 37°C por 5 a 15 min, las reacciones se terminaron agregando 1 ml de buffer glicina 0,4 M, ajustado a pH 10,4 con NaOH. Las muestras se leyeron en espectrofotómetro a 410 nm. Paralelamente, se preparó una curva de calibración con p-nitrofenol en las mismas condiciones. Una unidad (1 U) se definió como la cantidad de enzima que libera 1 μ mol de p-nitrofenol por minuto a 37°C.

2.4.6.2. Medición de actividad β -hexosaminidasa

La mezcla de reacción consistió en 100 μ l de p-nitrofenil-N-acetil- β -D-glucosamínido 12 mM en buffer acetato de sodio 0,25 M, pH 4,5 y 100 μ l de muestra. Los tubos se incubaron a 37°C por 15 a 30 min, luego de lo cual las reacciones se

terminaron y cuantificaron como se indica para la fosfatasa ácida.

2.4.6.3. Medición de actividad fosfodiesterasa

El sustrato utilizado en este caso fue p-nitrofenil-fosforilcolina, con el cual se preparó una solución 40 mM en glicerol 75% (v/v)/acetato de sodio 0,25 M, pH 5,0. Para los ensayos se usaron 100 μ l de este sustrato y 100 μ l de muestra. Luego de incubación a 37°C por 30 a 60 min, se procedió como en los casos anteriores.

2.5. Purificación de actividades lipolíticas

2.5.1. Medio de partida

Se utilizó medio extracelular de Tetrahymena thermophila, cepa DIII, cultivadas en PPY-NaCl a 37°C durante 70-80 h. La cosecha del medio se hizo por centrifugación a 2500 rpm durante 3 min, a 10°C, en rotor de ángulo fijo, en una centrífuga PR 6000 IEC.

2.5.2. Métodos de purificación utilizados

2.5.2.1. Precipitación de las enzimas con sulfato de amonio

Este método se basa en el fenómeno de "salting out" por el cual las proteínas pierden solubilidad al aumentar la fuerza iónica del medio. Debido a que las distintas proteínas responden en forma diferencial a la concentración de sal agregada, el método puede explotarse para su separación.

Se procedió de dos modos:

a) Se preparó una solución saturada de sulfato de amonio, que se llevó a pH 7,0 con NH_4OH . Distintos volúmenes de esta solución se usaron para preparar mezclas con la muestra de modo de obtener diferentes grados de saturación. Las mezclas así preparadas se mantuvieron a 4°C, durante 1 h, luego de lo

cual se centrifugaron a 16000 xg durante 30 min a 4°C, utilizando el rotor SS64 de una centrífuga Sorvall de alta velocidad. Después de descartar los sobrenadantes, se lavaron con cuidado las paredes del tubo de centrífuga con agua destilada, para eliminar restos de la solución de sulfato de amonio. Se disolvieron los precipitados en buffer Tris-HCl 10 mM, pH 7,4, y se estudió en ellos la presencia de actividades lipolíticas, de la forma ya descrita.

b) Se hizo el agregado de sal sólida hasta lograr el porcentaje de saturación de sulfato de amonio deseado. Previamente, se agregó a las muestras una solución concentrada de Tris-HCl, pH 7,4, para obtener una concentración final de 50 mM. El agregado de sulfato de amonio se realizó lentamente bajo agitación permanente. Una vez disuelta la sal, se dejó reposar la mezcla durante 1 h a 4°C y se procedió luego como en el caso anterior.

El agregado de sulfato de amonio en solución saturada para la precipitación de proteínas tiene la desventaja de aumentar grandemente los volúmenes que deben ser centrifugados. Por ello, a pesar de que se trata de un procedimiento más suave que el agregado de sal sólida, se utilizó solamente para los experimentos preliminares.

2.5.2.2. Cromatografía de intercambio iónico

Un intercambiador iónico consiste en una matriz insoluble, a la cual están unidos covalentemente grupos cargados. Estos grupos están asociados con "contra-iones", es decir iones de carga opuesta, móviles. Los contra-iones pueden ser intercambiados con otros iones de igual carga, sin afectar la matriz. Existen intercambiadores cargados positivamente que tienen contra-iones cargados negativamente disponibles para el intercambio, por lo cual reciben el nombre de intercambiadores aniónicos. En el caso opuesto, se los llama intercambiadores catiónicos. Ejemplo del primer caso es la dietilaminoetil (DEAE) celulosa, y del segundo, la carboximetil (CM) celulosa.

La cromatografía de intercambio iónico se basa en la

adsorción de las proteínas a la matriz debido a su carga eléctrica. Por este motivo, es importante fijar el pH de las soluciones pues éste determina la carga neta de las proteínas. El uso de intercambiadores aniónicos se realiza normalmente a pH 7 o superior, ya que así las proteínas están cargadas negativamente. Con intercambiadores catiónicos, se utilizan buffers con pH 5 o menos porque las proteínas deben estar cargadas positivamente.

Una vez aplicada la muestra, la matriz con las proteínas unidas puede entonces lavarse con buffer para eliminar el material proteico no adsorbido. Se logra de este modo una primera purificación. Luego, se lleva a cabo la elución gradual de las proteínas, es decir el desprendimiento de las proteínas adsorbidas. Esto se logra por el agregado de una sal o aumentando la concentración del buffer. Los iones así agregados compiten con las proteínas adsorbidas, desplazándolas. Para lograr que las distintas proteínas vayan eluyendo separadamente, el aumento de la fuerza iónica se hace gradualmente mediante un gradiente, ya que la desorción de las diferentes proteínas, debido a desplazamiento por contraiones de la sal utilizada, ocurre a distintas concentraciones salinas. La separación de proteínas a lo largo del gradiente es así el segundo principio de purificación de este método.

La matriz de los intercambiadores debe ser regenerada luego de cada corrida, a fin de eliminar los materiales que puedan haber quedado adsorbidos. Esto se hace por exposición a, ya sea soluciones de muy alta fuerza iónica, como NaCl 2M, o álcalis o ácidos. Luego debe equilibrarse la columna con el buffer inicial. La muestra debe estar dializada contra este buffer. Esto es importante especialmente cuando la muestra proviene de una precipitación con sulfato de amonio pues, en este caso, la sal presente podría prevenir la adsorción.

2.5.2.3. Cromatografía de interacción hidrofóbica

Se trata de un tipo particular de cromatografía de afinidad basada en la asociación de regiones hidrofóbicas de las

proteínas con ligandos hidrofóbicos, immobilizados sobre una matriz soluble hidrofílica. Así, puede unirse una cadena alifática de 4 a 16 carbonos a una matriz activada de Sepharosa mediante CNBr. Para ello, se utilizan las correspondientes aminas primarias alifáticas (butilamina, etc.). La interacción hidrofóbica es intensificada por una alta fuerza iónica. En este tipo de cromatografía, la aplicación de la muestra se hace en presencia de alta concentración salina y la elución se verifica disminuyendo gradualmente la fuerza iónica. Otros procedimientos de elución utilizan detergentes o agentes caotrópicos, pero sin duda la disminución de la fuerza iónica es el método de elección, pues es poco desnaturalizante y las sales se eliminan fácilmente de la muestra, por diálisis.

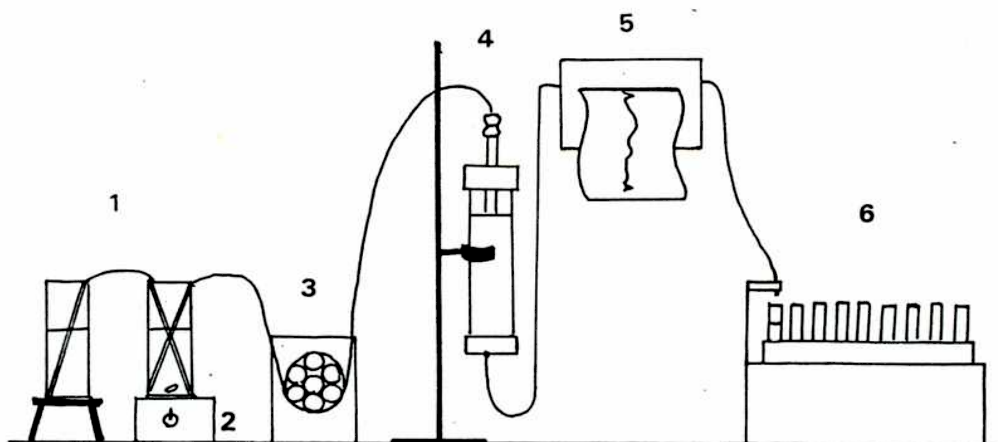
2.5.2.4. Cromatografía de filtración en gel

Este tipo de cromatografía se basa en la distribución del solvente entre una fase fija, que es la retenida en la estructura porosa de una matriz insoluble, y una fase móvil. La separación ocurre en este caso debido a que las sustancias que pueden penetrar en los poros de la matriz y pasar a la fase fija avanzan a distinta velocidad que aquéllas que no penetran en los mismos. Estas últimas se mueven a la velocidad a la cual se hace circular el solvente a través de la columna y emergen en el volumen de exclusión (void volume). Para identificar este volumen se utiliza Blue Dextran 2000. Esta sustancia permite, además, controlar la calidad del empaquetamiento de la columna, condición que es crítica para la utilización de este método. En efecto, al aplicar el Blue Dextran 2000, debe poder observarse un anillo perfecto que debe migrar sin distorsionarse a todo lo largo de la columna. Si ello no se verifica, la columna debe empaquetarse nuevamente. Es importante preparar la columna a la temperatura a la cual se van a efectuar las corridas y usar buffers desgasados, para evitar la formación de burbujas. Estos se preparan sometiéndolos a vacío en un kitasato conectado a una trompa de agua.

2.5.2.5. Equipo utilizado para la cromatografía de proteínas

La cromatografía de proteínas requiere tres elementos básicos para su realización eficiente: una bomba peristáltica para impulsar los buffers a través de las columnas con las velocidades seleccionadas óptimas, un colector de fracciones y columnas de diseño adecuado. Así, las columnas para filtración en geles deben ser largas, en tanto que las destinadas a intercambio iónico son normalmente cortas y anchas. Se requiere también un mezclador para la formación de gradientes, aunque éste puede reemplazarse por dos probetas y cánulas para conectarlas por sifón. Un agitador magnético o un agitador de hélice es también requerido. Otro elemento de gran utilidad es un monitor de la absorbancia en el UV, conectado a un registrador, que informe sobre la concentración de proteína, etc., en las distintas fracciones recogidas.

La siguiente figura muestra un esquema de los elementos utilizados.



1. formador de gradientes
2. agitador magnético
3. bomba peristáltica
4. columna
5. monitor de UV conectado a registrador
6. colector de fracciones

Los procedimientos rutinariamente seguidos para la purificación de la fosfolipasa C, la fosfolipasa A y la triacilglicerol lipasa se describen a continuación. Todos los pasos fueron llevados a cabo a una temperatura de 0-4°C.

2.5.3. Purificación de la fosfolipasa C

Se partió de 1,2 l de medio extracelular, los cuales fueron llevados a 243 g/l (40% de saturación) de sulfato de amonio, por agregado de sal sólida. Luego de 1 h a 4°C, se recogió la proteína precipitada por centrifugación a 27000 xg, por 30 min. El precipitado se disolvió en 75 mM NaCl/ 10 mM Tris-HCl (pH 7,1) y se dializó durante 3 h contra el mismo buffer, para eliminar posibles restos de sulfato de amonio. Esta muestra se sembró en una columna de DEAE celulosa de 7,5 cm de alto x 2,5 cm de diámetro, la cual se había equilibrado con el mismo buffer. Se utilizaron 0,125 l de buffer para lavar la columna, luego de lo cual, se realizó la elución con un gradiente lineal de NaCl, obtenido mezclando, en un mezclador para gradientes, 2 volúmenes de lecho de 75 mM NaCl/ 10 mM Tris-HCl (pH 7,1) y 2 volúmenes de 1 M NaCl/ 10 mM Tris-HCl (pH 7,1). El flujo fue de 90 ml/h. Se recogieron fracciones de 10 ml. Aquéllas que contenían el pico de fosfolipasa C se reunieron y se concentraron por diálisis contra sacarosa sólida. La muestra concentrada se sembró en una columna de filtración en gel de Sepharose CL 6B de 35 x 2,5 cm. La columna estaba equilibrada con 10 mM Tris-HCl, pH 7,1 y con este buffer se efectuó la elución. El flujo fue de 24 ml/h. Se recogieron fracciones de 6,5 ml. Aquéllas conteniendo el pico de actividad fosfolipasa C se reunieron y esta preparación fue utilizada para la caracterización de la actividad.

2.5.4. Purificación de la fosfolipasa A

El sobrenadante de la precipitación con sulfato de amonio utilizada para la purificación de la fosfolipasa C se llevó a 390 g/l de esta sal (60% de saturación) y después de 1 h a

4°C, se centrifugó a 27000 xg por 30 min. El precipitado se disolvió en 5 mM acetato de sodio, pH 5,0 y se dializó durante 12 h contra 50 volúmenes de este buffer. Se llevó a cabo una cromatografía de intercambio iónico en CM celulosa de esta muestra en una columna de 20 x 2,5 cm, equilibrada con el mismo buffer. Luego del lavado de la columna con 0,75 l de buffer, la elución se llevó a cabo con un gradiente lineal de NaCl, formado por 3 volúmenes de lecho de 5 mM acetato de sodio, pH 5,0, y 3 volúmenes de 0,5 M NaCl/ 5 mM acetato de sodio, pH 5,0. El flujo fue de 90 ml/h y se recogieron fracciones de 9,5 ml.

El siguiente paso de purificación consistió en una cromatografía de interacción hidrofóbica, para lo cual se reunieron aquellas fracciones del eluato de CM celulosa con actividad fosfolipasa A y se llevaron a 243 g/l de sulfato de amonio y 10 mM Tris-HCl, pH 7,1, por agregado de sulfato de amonio sólido y cantidad suficiente de una solución concentrada de Tris-HCl. El pH se ajustó a 7,1 con NaOH y la muestra se centrifugó a 27000 xg durante 30 min. El sobrenadante se sembró en una columna de decil-Sepharosa 4B de 14 x 2,5 cm, equilibrada con 243 g/l sulfato de amonio/ 10 mM Tris-HCl, pH 7,1. La decil-Sepharosa 4B se preparó de la forma descrita por Shaltiel (137). Luego de lavar la columna con 0,47 l de este buffer, se llevó a cabo la elución con un gradiente decreciente de sulfato de amonio, obtenido mezclando 0,35 l de 243 g/l sulfato de amonio/ 10 mM Tris-HCl, pH 7,1, con 0,35 l de 10 mM Tris-HCl, pH 7,1. El flujo fue de 50 ml/h. Se recogieron fracciones de 9,3 ml y aquéllas conteniendo el pico de fosfolipasa A se reunieron y dializaron durante 12 h contra 50 volúmenes de 10 mM Tris-HCl, pH 7,1.

Seguidamente, se llevó a cabo una cromatografía de intercambio iónico en una columna de DEAE celulosa de 12,5 x 2,5 cm, equilibrada con 10 mM Tris-HCl, pH 7,1. Luego de sembrar la muestra dializada, la columna se lavó con 0,5 l de este buffer. La elución se efectuó con un gradiente lineal de NaCl resultante de la mezcla de 2,5 volúmenes de lecho de 10 mM Tris-HCl, pH 7,1 con 2,5 volúmenes de 0,3 M NaCl/ 10 mM Tris-

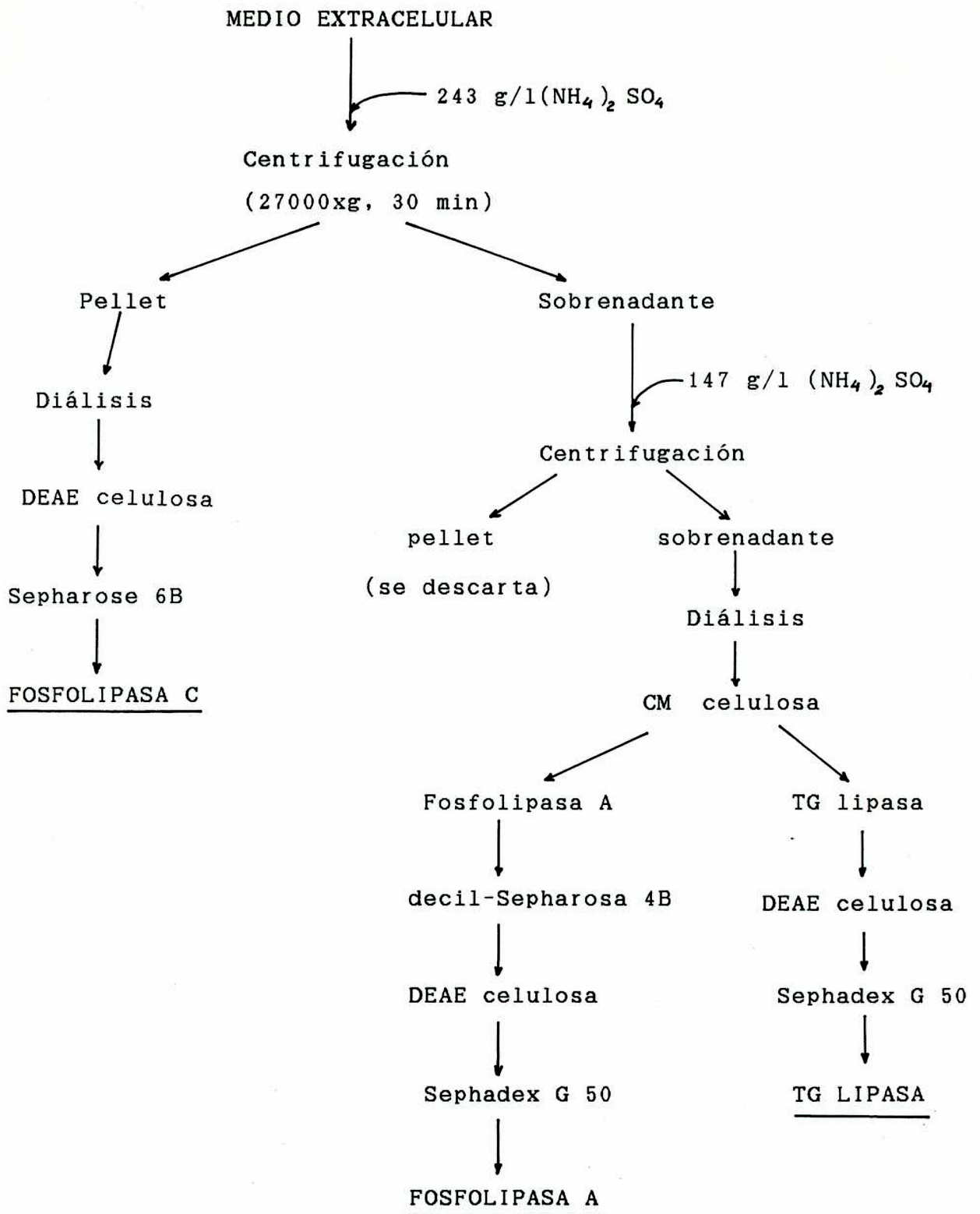
HCl, pH 7,1. El flujo fue de 50 ml/h y las fracciones, de 9,5 ml. Aquéllas con el pico de actividad se reunieron y concentraron por diálisis contra sacarosa sólida hasta un volumen de 10 ml.

Finalmente, se realizó una filtración en gel de esta muestra en una columna de Sephadex G 50 de 80 x 2,5 cm, con un flujo de 24 ml/h, utilizando como buffer de elución, 0,15 M NaCl/ 20 mM Tris-HCl, pH 7,1. Las fracciones con actividad fosfolipasa A fueron reunidas y el "pool" resultante fue utilizado para la caracterización de la enzima.

2.5.5. Purificación de la triacilglicerol lipasa

Los pasos de precipitación con sulfato de amonio e intercambio iónico en CM celulosa fueron comunes con la purificación de la fosfolipasa A. La columna de CM celulosa separa la actividad fosfolipasa A de la triacilglicerol lipasa. Las fracciones conteniendo esta última se reunieron y dializaron durante 6 h contra 50 volúmenes de 10 mM Tris-HCl, pH 7,1. Con esta muestra se llevó a cabo una cromatografía de intercambio iónico en DEAE celulosa y una filtración en gel en Sephadex G 50, en las mismas condiciones antes descritas para la purificación de la fosfolipasa A. Las fracciones eluidas de Sephadex G 50 conteniendo el pico de actividad lipasa fueron reunidas y esta muestra se usó en la caracterización de la actividad.

A continuación se esquematizan los pasos seguidos en la purificación de las tres actividades lipolíticas.



2.6. Electroforesis en geles de poliacrilamida

La pureza de las preparaciones de enzimas, así como su peso molecular, se determinaron por electroforesis en geles de 12,5% de poliacrilamida, con gel espaciador de 4%, en presencia de 0,1% de dodecilsulfato de sodio (SDS), de acuerdo al método de Laemmli (138). Las muestras se dializaron durante 6 h contra agua destilada, se liofilizaron, se disolvieron luego en 10 mM Tris-HCl, conteniendo 1 mM Na EDTA, 1% SDS, 5% β -mercaptoetanol y 10% glicerol, y se incubaron a 80°C durante 10 min. A cada muestra se agregaron 0,5 μ l de una solución al 1% de azul de bromofenol, para visualizar el frente de corrida. Se sembraron de 20 a 40 μ g de proteína por muestra. Se aplicó una corriente de 60 V hasta que las muestras penetraron en el gel espaciador y luego una corriente de 120 V hasta que el frente del colorante hubo migrado hasta 1-2 cm del borde inferior del gel. La tinción se realizó con Coomassie Blue.

Para las estimaciones de peso molecular, los geles se calibraron con los siguientes standards proteicos: inhibidor de tripsina de semilla de soja (Mr 20100), anhidrasa carbónica (Mr 29000), ovoalbúmina (Mr 45000), albúmina de suero bovino (Mr 68000) y fosforilasa B (Mr 97000).

2.7. Determinaciones de proteínas

Para monitorear la concentración de proteína en los eluatos de columnas, se midió la absorbancia a 280 nm.

Para determinación de proteínas en las sucesivas preparaciones obtenidas durante la purificación de las enzimas, se utilizó el método de Lowry *et al* (139).

2.8. Recolección y análisis de datos

Todos los datos obtenidos son resultado de al menos 4 experimentos separados. Todas las determinaciones se hicieron por duplicado. Los datos fueron analizados mediante tests t de Student de dos colas para comparación de medias.

3. Resultados

3.1. Actividad citolítica en el medio extracelular de Tetrahymena

3.1.1. Detección de la actividad

En este estudio se ha hallado actividad citolítica en el medio extracelular de cultivos de Tetrahymena thermophila. Esta actividad fue inicialmente observada al poner en contacto glóbulos rojos de carnero con cultivos de estos ciliados en medio PPY-NaCl. Se observó así que, al cabo de pocos minutos de incubación a 37°C, la suspensión de glóbulos rojos era completamente lisada. La lisis tuvo lugar en forma similar cuando se utilizaron glóbulos rojos humanos.

En un paso posterior se observó que el medio libre de células mostraba la misma actividad. Estos resultados se observaron tanto al emplear cultivos cuyo medio estaba suplementado con 0,15 M NaCl durante el crecimiento de las células como en cultivos de medio sin suplementar. A estos últimos se les añadió NaCl previo a la incubación con los glóbulos rojos, para evitar la lisis osmótica de los mismos. En medios no inoculados, usados como control, los glóbulos rojos no sufren hemólisis, indicando que este fenómeno no es debido a componentes del medio de cultivo sino que aparece como consecuencia del crecimiento de los ciliados.

Se obtuvieron registros continuos de la variación de la absorbancia aparente que acompaña a la hemólisis a 500 nm, en un espectrofotómetro con portacubeta termostaticada a 37°C. La Fig.1 ilustra un registro típico obtenido, en este caso, con medio de la cepa BIII cultivada en PPY-NaCl. La preparación de la suspensión de eritrocitos utilizada se describe en la sección 2.3.1. La absorbancia aparente es alta en un principio debido a la presencia de glóbulos rojos en suspensión y va disminuyendo a medida que estos son lisados. Puede observarse un período inicial en el cual no hay cambios en la absorbancia aparente, el período prolítico (p), seguido de un período de rápidos cambios, el período lítico. Hemos

denominado s a la pendiente en el punto de la curva correspondiente a un 50% de variación en la absorbancia. Efectuando diluciones del medio extracelular con medio no inoculado, se observó que p es inversamente proporcional a la concentración del factor citolítico y s , directamente proporcional.

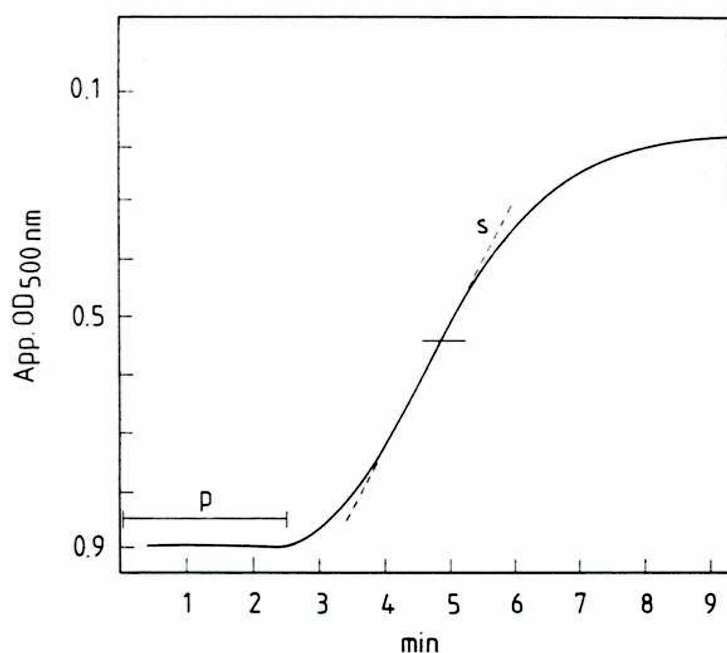


Fig.1: Cinética de la hemólisis producida por medio extracelular de Tetrahymena thermophila, cepa BIII. El medio fue cosechado después de 72 h de crecimiento de estos ciliados a 37°C en PPY-NaCl. El gráfico muestra un registro continuo de la variación de la absorbancia aparente a 500 nm de una suspensión de eritrocitos de carnero expuesta a este medio, leída contra medio sin glóbulos rojos. Las líneas marcadas p y s corresponden a la duración del período prolítico y a la pendiente de la curva en el punto correspondiente a un 50% de cambio en la absorbancia, respectivamente.

3.1.2. Caracterización de la actividad

En los estudios llevados a cabo para caracterizar la actividad citolítica, se utilizó medio extracelular de T.thermophila cepa DIII, cultivadas durante 72 h a 37°C en medio PPY-NaCl.

3.1.2.1. PH óptimo

Para estudiar este aspecto, se separaron alícuotas de un mismo lote de medio extracelular las cuales fueron ajustadas a distintos valores de pH entre 5 y 8, por agregado de Tris (base libre) 0,2 M o ácido acético 0,2 M. Las muestras ajustadas se llevaron finalmente a un mismo volumen con NaCl 0,15 M. Se agregaron eritrocitos de carnero a cada muestra y se hicieron registros continuos a 500 nm, midiéndose en cada caso p y s.

Los resultados obtenidos se muestran en la Fig.2. Puede observarse que s disminuye al elevarse el pH y p aumenta, indicando que la actividad tiene pH óptimo ácido. Como control, se utilizó medio sin inocular, ajustado a los distintos valores de pH de igual modo. Se comprobó que los eritrocitos no lisan en estos medios. A valores de pH más bajos que los utilizados, los glóbulos rojos se tornan inestables lo cual impide hacer mediciones en esas condiciones.

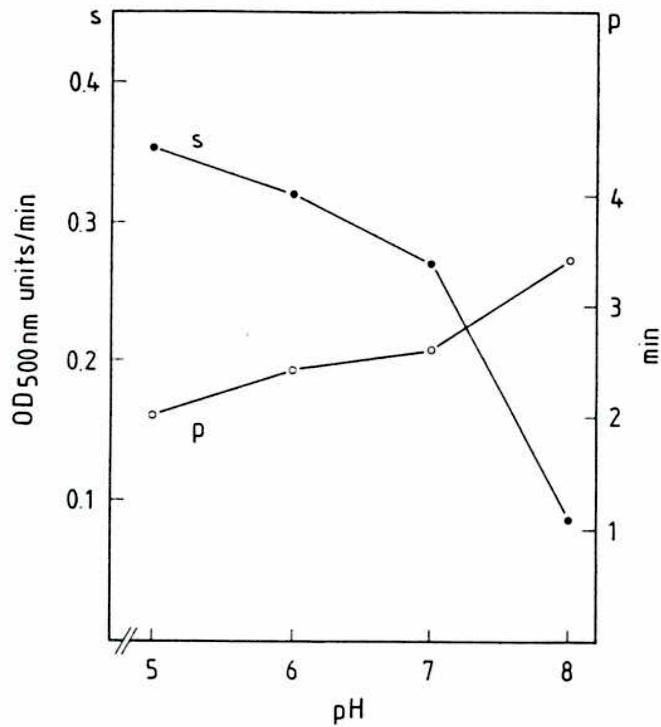


Fig.2. Actividad hemolítica en función del pH. Se hallan graficados los valores de la duración del período prolítico, p, y la pendiente s a varios valores de pH. Se ajustó el pH del medio extracelular de *T.thermophila* a los distintos valores por agregado de Tris base libre 0,2 M o ácido acético 0,2 M. Los eritrocitos expuestos a medio sin inocular, ajustado a los distintos valores de pH de igual modo, no muestran hemólisis. A valores de pH más bajos que 5 los eritrocitos se vuelven inestables, impidiendo así las mediciones.

3.1.2.2. Diálisis

Se llevó a cabo la diálisis de una alícuota de medio extracelular contra 1000 volúmenes de 10 mM Tris-HCl, pH 7,0, durante 12 h a 4°C. luego de lo cual se determinó la actividad hemolítica del contenido de la bolsa de diálisis por diluciones seriadas, como se describe en la sección 2.3.2. Como control se utilizó una muestra sin dializar a la que se agregó Tris-HCl, pH 7,0 en una concentración final de 10 mM. Se observó que la actividad hemolítica se recupera enteramente en el contenido de la bolsa de diálisis.

En un segundo experimento, se introdujeron 10 ml de medio en una bolsa de diálisis que se colocó en un tubo conteniendo 10 ml de 20 mM Tris-HCl/ 0,15 M NaCl, pH 7,2. Se permitió luego equilibrar los contenidos con agitación por 12 h a 4°C y se estudió la actividad hemolítica en los líquidos contenidos dentro y fuera de la bolsa. En este caso se observó que la actividad hemolítica estaba totalmente confinada al interior de la bolsa. Estos resultados indican que la actividad hemolítica se debe a factor(es) no dializable(s).

3.1.2.3. Tratamiento con tripsina

El efecto de la tripsina sobre la actividad hemolítica se estudió tratando una alícuota de medio extracelular con 3 mg/ml de esta enzima. Previamente, se ajustó el pH a 8,0 con Tris (base libre) 0,2 M. La incubación fue por 1 h a 37°C. A continuación se llevó el pH a 5,0 por agregado de cantidad suficiente de ácido acético 0,2 M. Como control se trató otra alícuota de medio del mismo modo pero omitiendo la tripsina. En ambos casos se determinó la actividad hemolítica por diluciones seriadas. Este experimento demostró que la actividad hemolítica es destruida totalmente por la tripsina. Posteriormente, se observó que es suficiente una incubación de 10 min a 37°C para lograr el mismo resultado.

3.1.2.4. Termolabilidad

La sensibilidad de la actividad hemolítica a temperaturas elevadas fue investigada exponiendo muestras de medio extra-

celular, ajustadas a pH 5,0 con ácido acético 0,2 M, a 60°C y 100°C durante diversos periodos de tiempo. Se observó que la exposición a 60°C por 10 min reduce la actividad hemolítica a la mitad de su valor inicial. El mismo tiempo a 100°C suprime totalmente la actividad. A pH alcalino (pH 8,0 ajustado con Tris base libre 0,2 M) la termolabilidad se acentúa, observándose pérdida del 80% de la actividad hemolítica luego de una incubación a 60°C por 10 min.

3.1.2.5. Efecto de iones bivalentes y Na₂EDTA

Se estudió en distintas alícuotas de medio el efecto sobre la actividad hemolítica del agregado de 10 mM de Cl₂Ca, Cl₂Mg, Cl₂Sr y Cl₂Mn y de 5 mM de Na₂EDTA. Los resultados se expresan en la Tabla 1 como unidades hemolíticas (HU) por ml. En ningún caso pudo observarse inhibición significativa de la lisis.

Tabla 1. Efecto de iones bivalentes y quelantes sobre la actividad citolítica del medio extracelular de T.thermophila.

	Control	Cl ₂ Ca 10mM	Cl ₂ Mg 10mM	Cl ₂ Sr 10mM	Cl ₂ Mn 10mM	Na ₂ EDTA 5mM
Actividad hemolítica (HU/ml)	25 ± 3	26 ± 4	24 ± 2	26 ± 3	24 ± 4	27 ± 5

3.1.2.6. Efecto de fosfolípidos

Se investigó la acción de fosfolípidos sobre la actividad hemolítica del medio. Se pudo así observar que 50 µg/ml de fosfatidilcolina de huevo (Sigma tipo XI-E) suprimen la lisis causada por un medio conteniendo 25 HU/ml durante un período prolongado (más de 3 h). Este resultado se ilustra en la Fig.3. Se requieren, en cambio, 120 µg/ml de asolectina para lograr el mismo efecto.

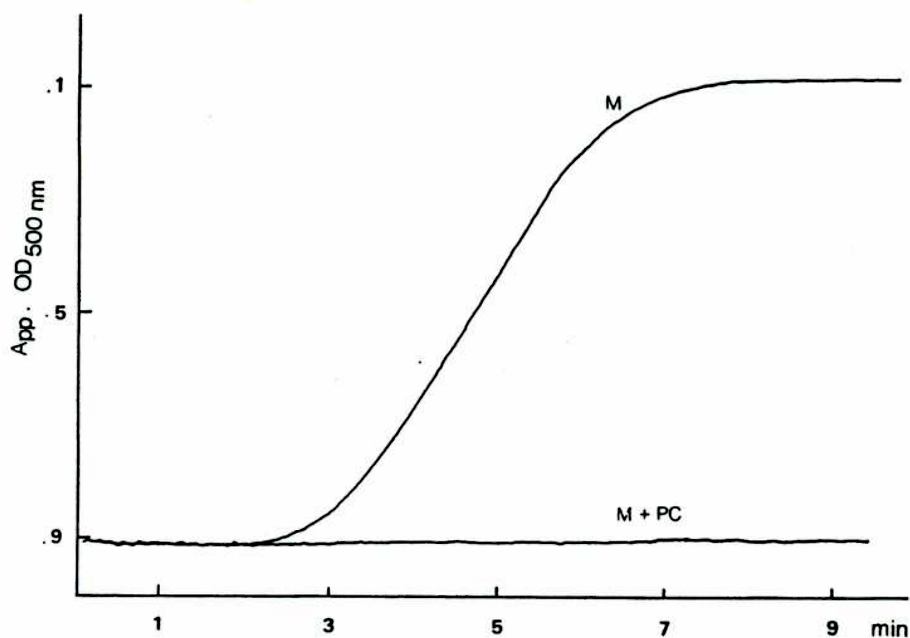


Fig. 3. Efecto de la fosfatidilcolina en la actividad hemolítica. Registro continuo a 37°C de la variación de la absorbancia aparente a 500 nm de dos suspensiones de eritrocitos: una expuesta a medio extracelular de *T.thermophila* (M), y otra expuesta a medio extracelular con agregado de 50 µg/ml de fosfatidilcolina de huevo (M+PC).

3.1.2.6. Efecto de albúmina de suero bovino y ovoalbúmina

Estas dos proteínas, probadas en concentraciones de 0,1 a 10 mg/ml fueron totalmente inefectivas para prevenir la hemólisis.

3.1.3. Actividad citolítica en distintas cepas

Pudo demostrarse actividad citolítica en todas las cepas tipo salvaje de Tetrahymena thermophila estudiadas. Existen, sin embargo, diferencias considerables entre las mismas. Los valores de actividad hemolítica obtenidos después de 60 h de cultivo en PPY-NaCl se detallan en la Tabla 2, donde también se muestran las actividades de dos enzimas lisosomales, normalmente secretadas al medio por estos ciliados, fosfatasa ácida y β -hexosaminidasa. Las cepas BIII, DIII y CU 399 tienen fenotipo salvaje. MS-1 es un mutante bloqueado en la secreción de enzimas lisosomales, derivado de CU 399.

Tabla 2. Actividad hemolítica, fosfatasa ácida y β -hexosaminidasa en el medio extracelular de cultivos de 60 h en PPY-NaCl de distintas cepas de T.thermophila. La determinación de las actividades se describe en las secciones 2.3.2. y 2.4.6.

	DIII	BIII	CU399	MS-1
Actividad hemolítica (HU/ml)	22 \pm 3	8 \pm 1.2	9 \pm 2.5	0
Fosfatasa ácida (mU/ml)	230 \pm 19	160 \pm 12	172 \pm 15	12 \pm 3
β -hexosaminidasa (mU/ml)	203 \pm 18	142 \pm 11	157 \pm 12	8 \pm 1

Obsérvese que la cepa DIII secreta cantidades de enzimas lisosomales significativamente mayores ($P < 0,01$) y también mayor actividad hemolítica ($P < 0,01$) que las cepas BIII y CU399. Los resultados obtenidos con el mutante no secretor MS-s, que muestran ausencia de actividad hemolítica en el

medio junto con muy bajas actividades de fosfatasa ácida y β -hexosaminidasa, son coincidentes en este sentido. Estas observaciones ponen en evidencia la existencia de un estrecho paralelismo en la liberación de actividad hemolítica y de hidrolasas lisosomales.

La cepa GL de T.pyrriformis también libera actividad hemolítica al medio extracelular. La misma es, sin embargo, inferior a la producida por las cepas de T.thermophila. El cultivo de T.pyrriformis se llevó a cabo a 28°C en medio PPY. Después de 60 h, se encontró una actividad hemolítica de $3 \pm 0,4$ HU/ml.

3.1.4. Liberación de actividad citolítica en distintos medios

Se efectuó un estudio comparativo de la liberación de actividad citolítica por T.thermophila cepa DIII a distintos medios de cultivo y a medio no nutritivo (10 mM Tris-HCl, pH 7,2). Los experimentos se llevaron a cabo cultivando paralelamente las células en los distintos medios en frascos de Fernbach a 37°C. En el caso de las suspensiones en medio no nutritivo, las células fueron cultivadas en PPY por 48 h y luego, lavadas y resuspendidas en 10 mM Tris-HCl, pH 7,2, en la densidad original. En todos los casos se midió la actividad hemolítica en los sobrenadantes por diluciones seriadas y se hicieron conteos celulares para eliminar las diferencias debidas a las distintas densidades alcanzadas. Los resultados se muestran en la Tabla 3, expresados como HU por 10^6 células.

Tabla 3. Liberación de actividad hemolítica por T.thermophila DIII en distintos medios. MS = medio sintético

	PPY 48h	PPY-NaCl 48h	MS 48h	10mM Tris, pH 7.2	
				2h	4h
Actividad hemolítica (Hu. 10^6 células)	12 ± 2.1	10.5 ± 1.8	11 ± 2.4	7 ± 1.3	11 ± 3.1
Densidad (células/ml)	8×10^5	4.5×10^5	6×10^5	8×10^5	8×10^5

Se observa que la liberación de actividad citolítica se produce independientemente del medio en que las células fueron cultivadas. En el medio no nutritivo, al cabo de 4 h se obtiene una actividad hemolítica similar a la presente en el medio de cultivo. En este período de tiempo, las células liberan, además, grandes cantidades de enzimas lisosomales, llegando, en el caso de la β -hexosaminidasa, hasta un 70% de la actividad contenida en las células al iniciarse la incubación.

3.1.5. Interacción "in vivo" entre células de Tetrahymena y eritrocitos de carnero

Este estudio se llevó a cabo agregando eritrocitos de carnero directamente a porciones de cultivos de distintas cepas del ciliado, cultivadas en PPY-NaCl. Al comparar los resultados con los obtenidos con los mismos medios, una vez eliminadas las células de Tetrahymena por centrifugación, se encontró que la hemólisis es siempre más rápida cuando los ciliados están presentes. Este resultado se muestra en la Fig.4, donde se emplea el mutante NP1, bloqueado en la formación de vacuolas, para evitar el efecto de la fagocitosis de los glóbulos rojos. En un experimento paralelo, se comprobó que la exposición a glóbulos rojos no induce la liberación de enzimas lisosomales, tomando como índice la actividad β -hexosaminidasa. Estos resultados sugieren que la mayor actividad citolítica observada en presencia de células de T.thermophila es debida a la existencia de actividad situada sobre la membrana plasmática.

El proceso de lisis puede seguirse directamente bajo microscopía de campo claro y de contraste de fase. En la Fig.5 se muestra un conjunto de fotografías sucesivas en las que se observa la rápida desaparición de glóbulos rojos en una suspensión de T.thermophila, cepa NP1.

Bajo microscopía de contraste de fase se observa que durante la lisis los glóbulos rojos adquieren una apariencia muy brillante y, a continuación, se tornan muy oscuros. Finalmente se aclaran volviéndose indistinguibles del medio.

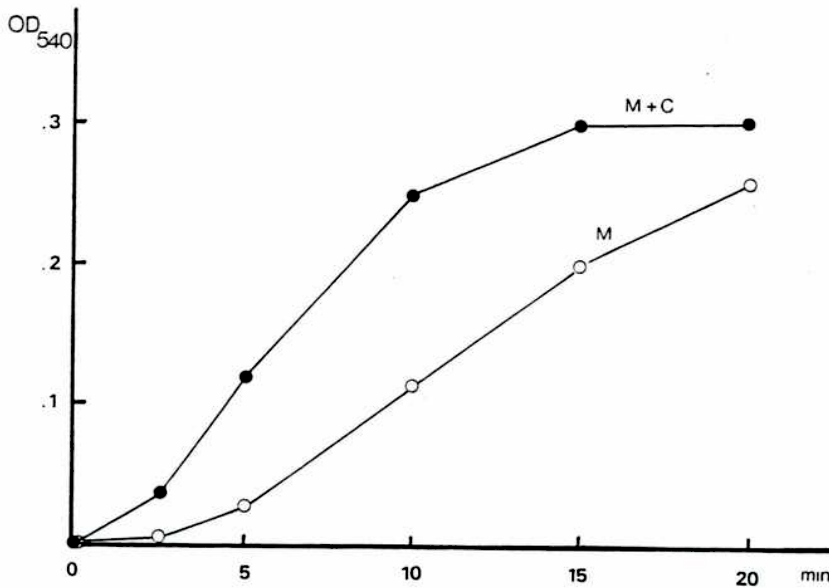


Fig.4. Actividad hemolítica en presencia de células de *T.thermophila*. Se utilizaron dos cultivos paralelos de *T.thermophila*, cepa NP1 (no formadora de vacuolas), crecidos en PPY-NaCl durante 36 h a 37°C. A uno de los cultivos se agregó una suspensión de eritrocitos de carnero (0.5%, concentración final) y se extrajeron alícuotas a distintos tiempos. Estas fueron centrifugadas y la hemoglobina liberada fue valorada por lectura de los sobrenadantes a 540 nm. Los valores obtenidos están representados en la curva M+C. Al cabo de los 20 min de incubación de este primer cultivo, se centrifugó el segundo cultivo y se agregó una suspensión de eritrocitos igual a la anterior al sobrenadante. A distintos tiempos se extrajeron alícuotas, procediendo de igual modo que en el caso anterior. Estos valores están representados en la curva M. Todas las incubaciones fueron a 37°C.

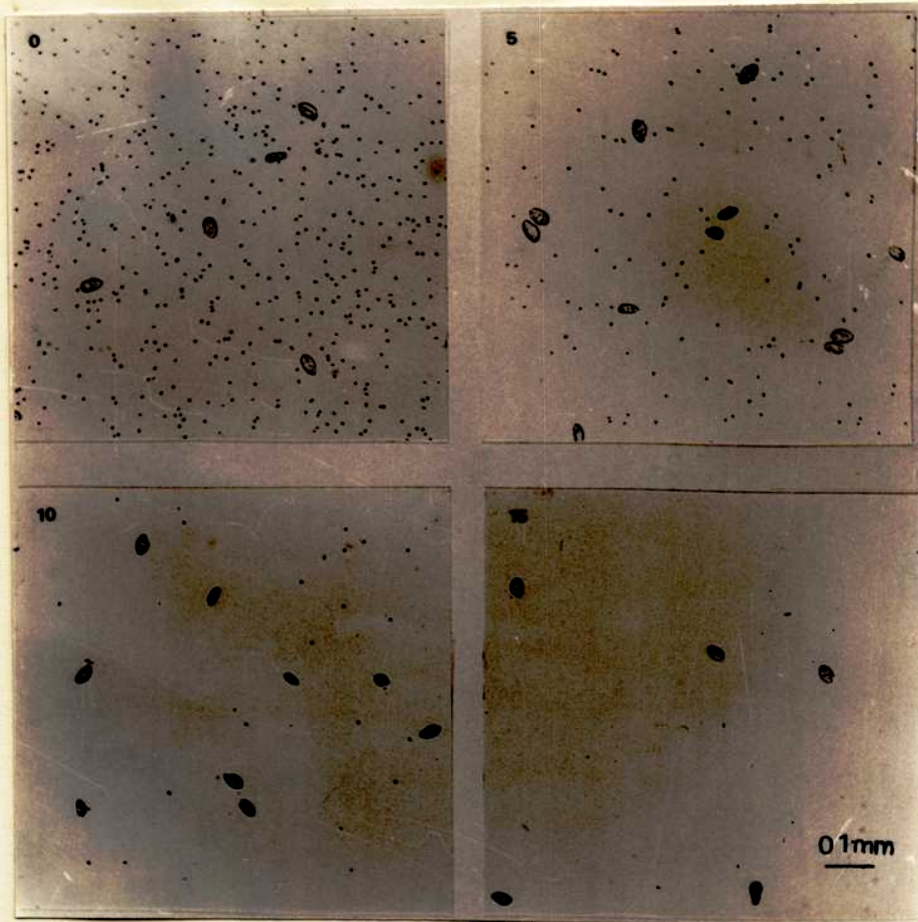


Fig.5. Observación de la actividad hemolítica de un cultivo de T.thermophila por microscopía de campo claro. Fotografías tomadas luego de 0, 5, 10 y 15 min de exposición de una suspensión de eritrocitos de carnero (0.5% conc. final) a un cultivo de la cepa NP1, crecido en PPY-NaCl a 37°C durante 24 h. El cultivo se encontraba en su fase logarítmica, con una densidad de 2.3×10^5 células/ml. Menos del 5% de las células formaban vacuolas alimenticias en estas condiciones.

3.2. Actividades lipolíticas en el medio extracelular de *Tetrahymena thermophila*

3.2.1. Detección

Las características de la actividad citolítica encontrada en el medio extracelular de *Tetrahymena* (no dializable, destruída por tripsina, termolábil, pH dependiente) hicieron suponer que se trataba de una enzima. La inhibición por fosfolípidos, por otra parte, sugirió la posibilidad que fuera una fosfolipasa. Por ello, se estudió la presencia de fosfolipasas en este medio, ya que no existía información previa al respecto. Con este fin, se incubó a 37°C durante toda la noche una alícuota de medio extracelular de la cepa BIII de *T. thermophila* con 3 mg/ml de asolectina dispersada por sonicación. Como control, se utilizó medio sin inocular. Se observó que, al cabo de la incubación, la suspensión de asolectina, opalescente en un comienzo y de igual aspecto en el control, se había enturbiado notablemente, mostrando un precipitado blanco. Los lípidos de esta muestra se extrajeron de acuerdo a Bligh y Dyer y se separaron por cromatografía en capa fina (thin layer chromatography = TLC) con una mezcla de solventes para lípidos neutros (ver sección 2.4.1.). El resultado obtenido se muestra en la Fig.6 donde puede verse aparición de diacilglicerol (DG) y ácidos grasos libres (free fatty acids, FFA), indicando la presencia de actividad fosfolipasa C y, posiblemente, fosfolipasa A.

En un experimento posterior se realizó una incubación más breve (1h a 37°C) con 3 mg/ml de fosfatidilcolina (PC) de semilla de soja y se separaron esta vez lípidos polares y lípidos neutros. Los resultados se muestran en la Fig.7 donde, además, se compara la actividad lipolítica de los medios extracelulares de las cepas BIII y DIII. Estas cepas, como se mencionó en la sección 3.1.3., difieren en la liberación de actividad citolítica al medio. Obsérvese en la placa de lípidos polares la aparición de lisolecitina en las muestras de ambas cepas, comprobándose en forma indudable la presencia de fosfolipasa A. En la placa de lípidos neutros se observó nuevamente aumento de FFA y además aparecen,

especialmente en el caso de la cepa DIII, manchas correspondientes a DG y monoacilglicerol (MG). El DG indica actividad fosfolipasa C y el MG puede resultar de la acción combinada de ésta y fosfolipasa A. Nótese que las diferencias más conspicuas entre las dos cepas se encuentran a nivel de DG y MG, que son más abundantes en la muestra correspondiente a DIII.

Cuando la incubación se realizó con medio extracelular del mutante no secretor MS-1, no se observó ninguna acción lipolítica.

En los estudios que se describen a continuación se detallan los resultados de la purificación y caracterización de las tres actividades lipolíticas halladas en el medio extracelular de Tetrahymena: fosfolipasa C, fosfolipasa A y triacilglicerol lipasa.

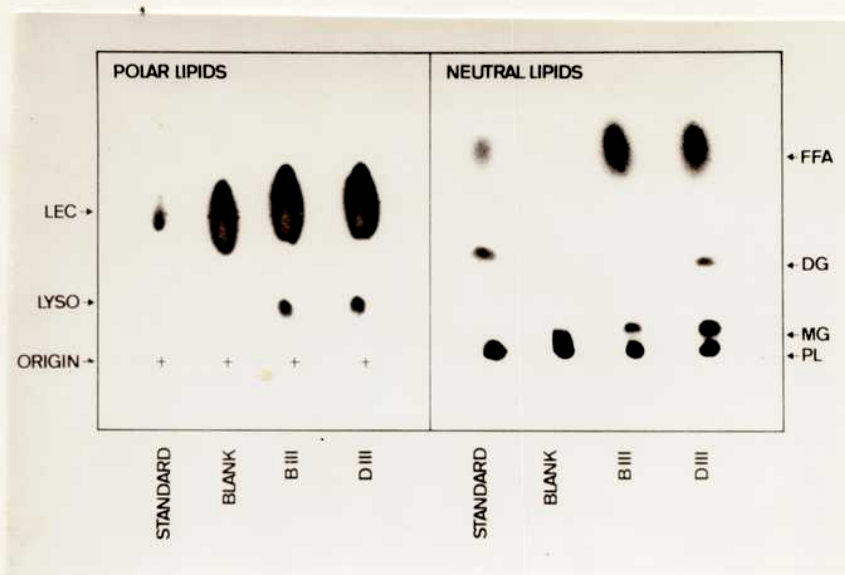


Fig.7. Degradación de fosfatidilcolina por medio extracelular de dos cepas de *T.thermophila*, BIII y DIII. Se incubó medio extracelular de las cepas BIII y DIII, proveniente de cultivos de 48 h a 37°C en PPY, con 3 mg/ml de fosfatidilcolina de semilla de soja durante 1 h a 37°C. Al cabo de este tiempo, los lípidos se extrajeron y se separaron por TLC utilizando mezclas de solventes para resolver lípidos polares (placa izquierda) y lípidos neutros (placa derecha), como se describe en 2.4.1. Como blanco se utilizó medio sin inocular, incubado con el mismo sustrato. LYSO: lisofosfatidilcolina; LEC: fosfatidilcolina (lecitina). Las demás abreviaturas se definen en la Fig.6.

3.2.2. Precipitación de las enzimas lipolíticas con sulfato de amonio

Con el objeto de caracterizar las actividades lipolíticas halladas en el medio de Tetrahymena y de esclarecer su relación con la actividad citolítica, se emprendió la tarea de purificar las enzimas. Como paso inicial, se llevó a cabo una precipitación con distintas concentraciones de sulfato de amonio. Se utilizó para ello medio extracelular de la cepa DIII, cultivadas durante 72 h en PPY-NaCl. La proteína precipitada con 114, 243, 390 y 561 g/l de sulfato de amonio (ver sección 2.5.2.1. para detalles experimentales) se redisolvió en 0,05 M acetato de sodio, pH 5,0, y se incubó con 3 mg/ml de asolectina durante 1h a 37°C. La elección de este pH se debió a que experimentos preliminares mostraron que el aumento de FFA, DG y MG es máximo a valores ácidos de pH. Al cabo de la incubación, los lípidos se extrajeron y separaron por TLC como se describe en la sección 2.4.1. La Fig.8 muestra los resultados obtenidos al desarrollar los cromatogramas con mezclas de solventes para separar lípidos neutros (A) y lípidos polares (B). En la placa A puede observarse que cantidades sustanciales de actividad generadora de DG precipita ya a una concentración de 243 g/l de sulfato de amonio, que corresponde a 40% de saturación de esta sal (muestra 2). Se ve, por otra parte, que a 390 g/l (60% de saturación) precipita gran parte de la actividad productora de FFA (muestra 3) y lisofosfatidilcolina (LPC, placa B). Nótese también en la placa B la disminución de fosfatidilcolina (PC) y fosfatidiletanolamina (PE) que acompaña el aumento de LPC y lisofosfatidiletanolamina (LPE) en las muestras 3 y 4. Por último, es importante destacar que a 390 g/l de sulfato de amonio precipita también una actividad lipasa que degrada triacilglicerol (TG), lo que se demuestra por la desaparición de la mancha correspondiente a este lípido en las muestras 3 y 4 (placa A). Esta lipasa no había sido detectada en los estudios anteriores debido al bajo contenido en TG del lote de asolectina usado en esa oportunidad.

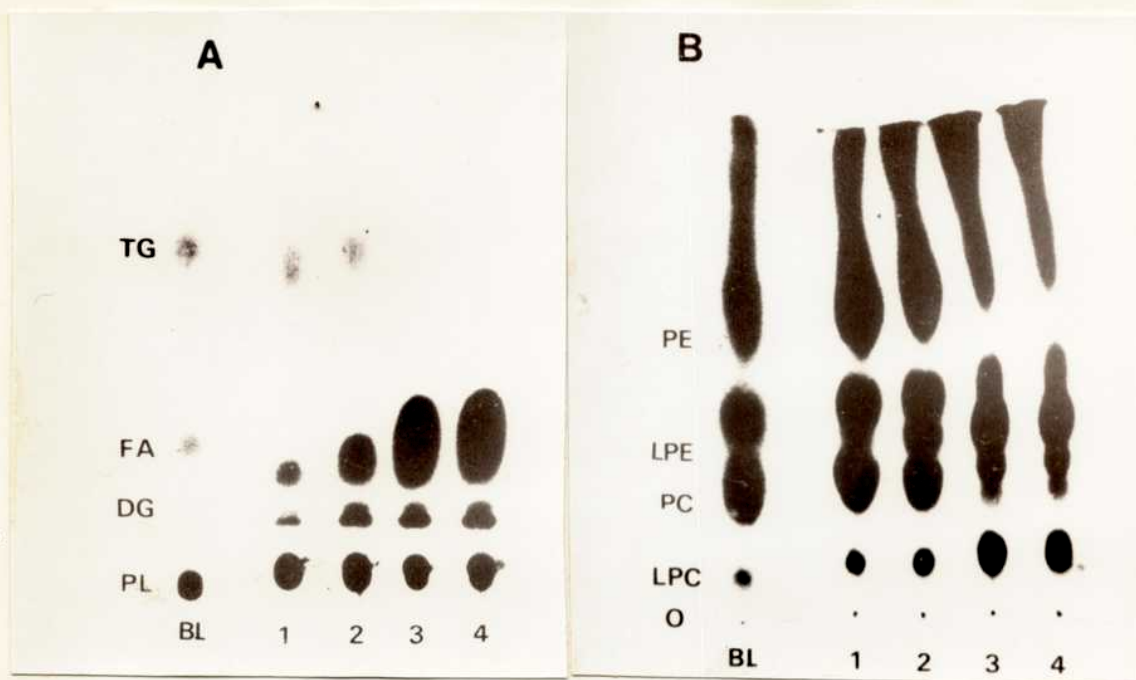


Fig.8. Precipitación fraccionada con sulfato de amonio de las actividades lipolíticas. Alicuotas de medio extracelular de *T.thermophila*, cepa DIII, cultivadas durante 72 h a 37°C en PPY-NaCl, se precipitaron con 1) 114; 2) 243; 3) 390 y 4) 561 g/l de sulfato de amonio. Estas concentraciones corresponden a 20, 40, 60 y 80 % de saturación de esta sal, respectivamente. (Para detalles experimentales, véase punto 2.5.2.1.) La proteína precipitada se redisolvió en buffer acetato de sodio 50 mM, pH 5,0, y se incubó con 3 mg/ml de asolectina durante 1 h a 37°C. Los lípidos se extrajeron y separaron por TLC con mezclas de solventes para resolver lípidos neutros (A) y lípidos polares (B), como se describe en el punto 2.4.1.

O: origen; LPC: lisofosfatidilcolina; PC: fosfatidilcolina; LPE: lisofosfatidiletanolamina; PE: fosfatidiletanolamina. Las demás abreviaturas se definen en la Fig.6.

3.3. Purificación y caracterización de la fosfolipasa C (EC. 3.1.4.3.)

3.3.1. Purificación de la fosfolipasa C y propiedades de la preparación obtenida

Para la purificación de la fosfolipasa C se efectuó como paso inicial una precipitación del medio extracelular de T.thermophila cepa DIII (cultivadas durante 72 h en medio PPY-NaCl a 37°C) con 243 g/l de sulfato de amonio. A este paso siguió una cromatografía de intercambio iónico en DEAE celulosa y una filtración en gel de Sepharose 6B. Los detalles experimentales de estos procedimientos se describen en la sección 2.4.2.

Se observó que en todos los pasos seguidos, la actividad fosfolipasa C copurifica con actividad hemolítica. La Fig.9 ilustra la cromatografía en DEAE celulosa. En cada tubo del lavado y elución se midieron las actividades fosfolipasa C y hemolítica, la absorbancia a 280 nm y la conductancia. Esta última es indicadora de la concentración de NaCl, que se va aumentando gradualmente para efectuar la elución. Obsérvese que ambas actividades eluyen juntas en un pico en el eluato. Una pequeña fracción de las dos es eluida también conjuntamente en el lavado de la columna, previo a la elución.

En la Fig.10 se graficaron los valores de actividad fosfolipasa C, actividad hemolítica y absorbancia a 280 nm obtenidos cuando el pico de actividad que eluye de DEAE celulosa es filtrado a través de Sepharose 6B. Puede verse como, también en este caso, ambas actividades eluyen en un mismo pico en el volúmen de exclusión de la columna (void volume, VV).

En los dos pasos cromatográficos utilizados se obtuvo un cociente entre actividad hemolítica y fosfolipasa C constante de 0,9 HU/nmol DG formado . h, tanto en las distintas fracciones de los eluatos como en los "pools" recogidos, conteniendo los picos de actividad.

Estos resultados sugieren fuertemente que la fosfolipasa C y la actividad hemolítica residen en una misma entidad.

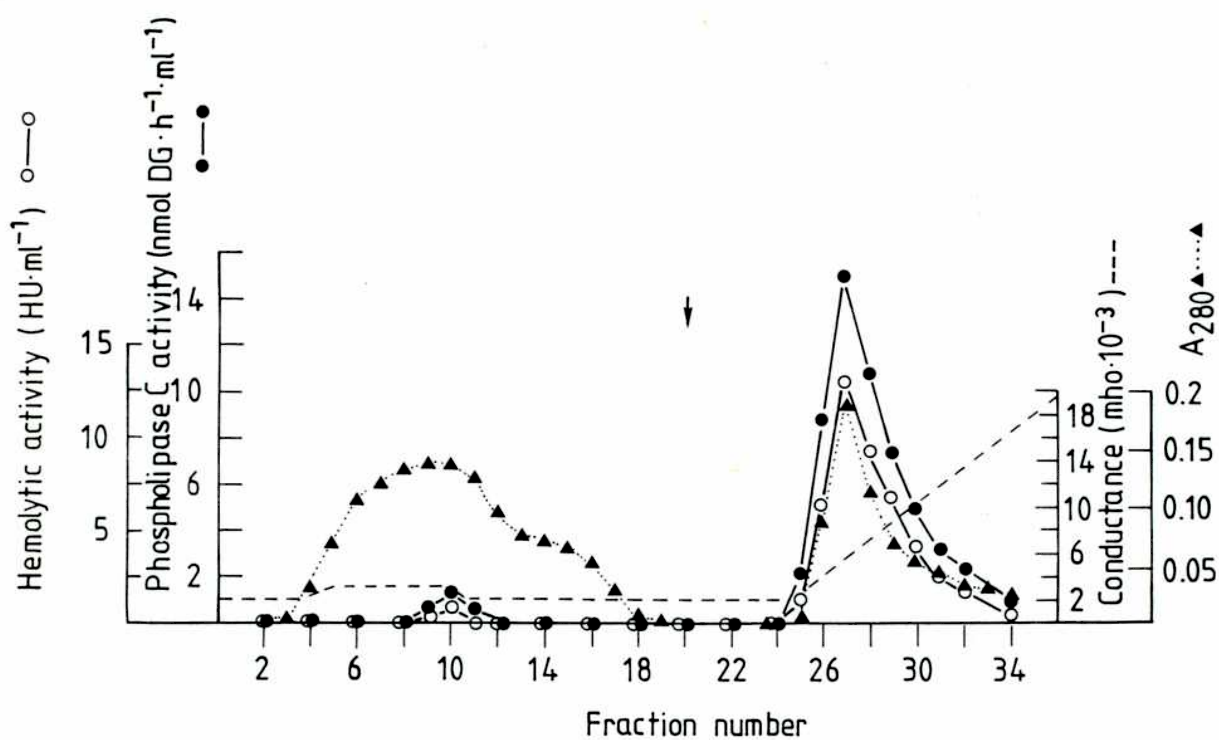


Fig.9. Cromatografía de intercambio iónico en DEAE celulosa de la fosfolipasa C. Los detalles experimentales de este procedimiento se describen en el punto 2.5.3. En cada tubo del eluato se midieron actividad fosfolipasa C ●—●; actividad hemolítica ○—○; Absorbancia a 280 nm ▲—▲; y conductancia -----. La flecha indica el momento en que comienza la aplicación del gradiente de NaCl.

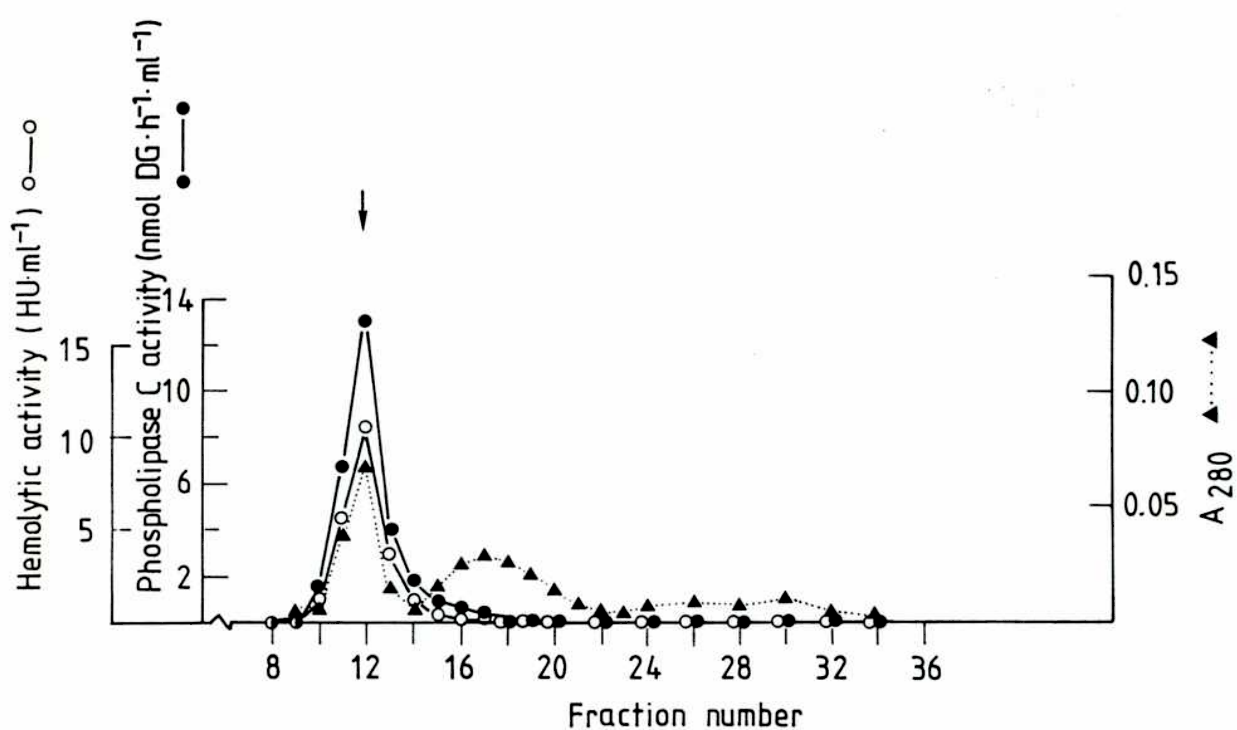


Fig.10. Filtración en gel de Sepharose 6B de la fosfolipasa C. La flecha indica el volúmen de exclusión de la columna (void volume), determinado con Blue Dextran 2000. En cada tubo se midió actividad fosfolipasa C ●—●; actividad hemolítica ○—○ y A₂₈₀ ▲—▲. Para detalles experimentales, ver punto 2.5.3.

Los resultados de los distintos pasos de purificación de la fosfolipasa C se detallan en la Tabla 4.

Tabla 4. Purificación de la fosfolipasa C del medio extracelular de T.thermophila. Se midieron actividad fosfolipasa C y actividad hemolítica en las preparaciones resultantes de cada paso de purificación como se describe en las secciones 2.4.2. y 2.3.2.

	Proteína total (mg)	Actividad fosfolipasa C		Recuperac. (%)	Factor de purific.
		Actividad total (nmol DG/h)	Actividad específica (nmol DG/h·mg)		
Precipitado de sulfato de amonio	39.6	1720	43	100	1
DEAE celulosa	2.89	350	121	20	2.8
Sepharose 6B	0.34	230	676	13.5	15.5

	Actividad hemolítica		Recuperac. (%)	Factor de purific.
	Actividad total (HU)	Actividad específica (HU/mg)		
Precipitado de sulfato de amonio	3890	98.3	100	1
Deae celulosa	315	109	8.1	1.1
Sepharose 6B	205	600	5.3	6.1

A través de estos pasos cromatográficos simples se obtuvo una purificación de la fosfolipasa C de 15.5 veces. La preparación obtenida no produce liberación de FFA al ser incubada con fosfolípidos, lo cual indica que está libre de fosfolipasa A o lipasa. Por consiguiente, es posible utilizar esta preparación para caracterizar la fosfolipasa C, sin interferencia de otras actividades lipolíticas.

El análisis de las proteínas presentes en la preparación final por electroforesis en gel de 12% de poliacrilamida en

presencia de SDS muestra una banda predominante con Mr de 87100 y dos bandas menores, una con Mr de 81000 y otra cuyo Mr es superior a 100000 (Fig.11).

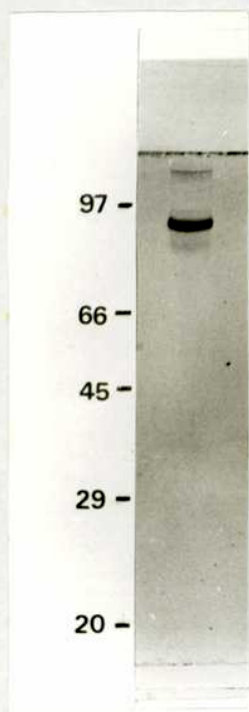


Fig.11. Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS de la preparación purificada de fosfolipasa C. Los detalles experimentales se encuentran en la sección 2.6. Los números indican la posición de las siguientes proteínas: fosforilasa B (Mr 97000), albúmina de suero bovino (Mr 66000), ovoalbúmina (Mr 45000), anhidrasa carbónica (Mr 29000) e inhibidor de tripsina de semilla de soja (Mr 20100).

La exclusión de la fosfolipasa C de la columna de Sepharose 6B indica que esta enzima se halla formando parte de partículas de alto peso molecular ($>4 \times 10^6$), las cuales probablemente contienen lípidos. Apoyando esta posibilidad, se observa que el detergente Tritón X-100 altera drásticamente el volumen de elución de la enzima en Sepharose 6B. Esto se ilustra en la Fig.12 donde se compara la elución de la fosfolipasa C de este gel en ausencia y presencia del detergente. En el primer caso, una muestra de fosfolipasa C eluída de DEAE celulosa se sembró en la columna y se eluyó con 10 mM Tris-HCl, pH 7,1. En el segundo, se agregó Tritón X-100 en una concentración final de 2% a una muestra de fosfolipasa C similar a la anterior. Luego de 12 h a 4°C, la muestra así tratada se sembró en la misma columna de Sepharose 6B,

equilibrada esta vez con 0,5% Tritón X-100/ 10 mM Tris-HCl, pH 7,1. La elución se llevó a cabo con este buffer. Puede observarse que, en presencia del detergente, la actividad ya no eluye en el volúmen de exclusión, sino que es retenida considerablemente, eluyendo ahora junto con micelas de Tritón X-100, las cuales se detectaron por su alta absorbancia a 280 nm. Si se usan concentraciones inferiores de Tritón X-100, la fosfolipasa C se solubiliza solo parcialmente y se obtienen dos picos de actividad.

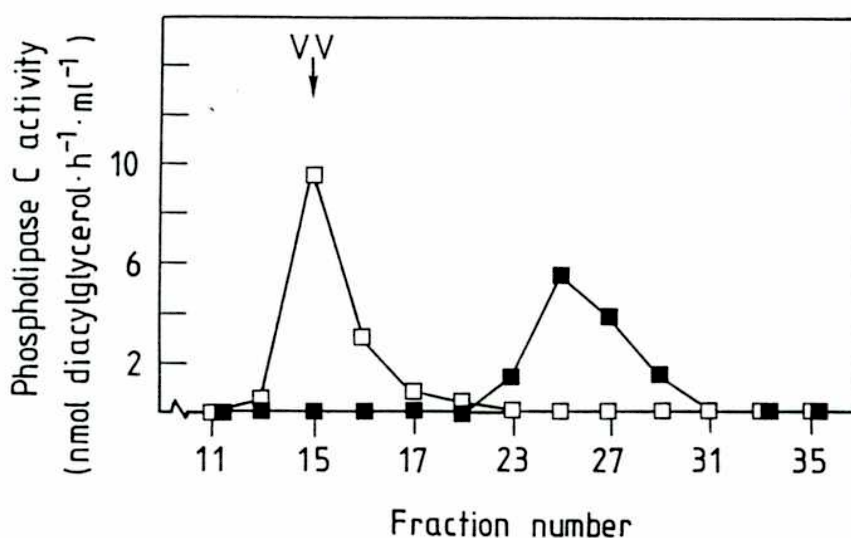


Fig.12. Efecto del Tritón X-100 en el patrón de elución de la fosfolipasa C en Sepharose 6B. Dos muestras de la misma preparación de enzima eluida de DEAE celulosa (conteniendo 0,64 mg de proteína) fueron sembradas en una columna de Sepharose 6B (80x2.5 cm). Una muestra fue sembrada sin tratar y se eluyó con 10 mM Tris-HCl, pH 7.1 (□—□); a la otra se agregó Tritón X-100 en una concentración final del 2% y luego de 12 h a 4°C fue sembrada en la misma columna, equilibrada con 10 mM Tris-HCl/ 0,5% Tritón X-100, pH 7,1. La elución se llevó a cabo con este mismo buffer (■—■). En ambos casos, el flujo fue de 25 ml/h y se recogieron fracciones de 9 ml.

3.3.2. Caracterización de la fosfolipasa C

3.3.2.1. PH óptimo

La variación de la actividad fosfolipasa C con el pH muestra un pico definido a pH 5, como puede verse en la Fig.13. Este estudio se efectuó utilizando un buffer universal 0,2 M Tris/ 0,2 M citrato de sodio, ajustado a los distintos valores de pH. La actividad hemolítica de esta preparación también muestra pH óptimo ácido, con una variación semejante a la de la fosfolipasa C, como se muestra en la misma figura. Para la medición de la actividad hemolítica se ajustó el pH de la solución de enzima a los distintos valores con 0,2 M Tris (base libre) o 0,2 M ácido acético, llevándose las muestras a un mismo volumen con cantidad adecuada de NaCl 0,15 M.

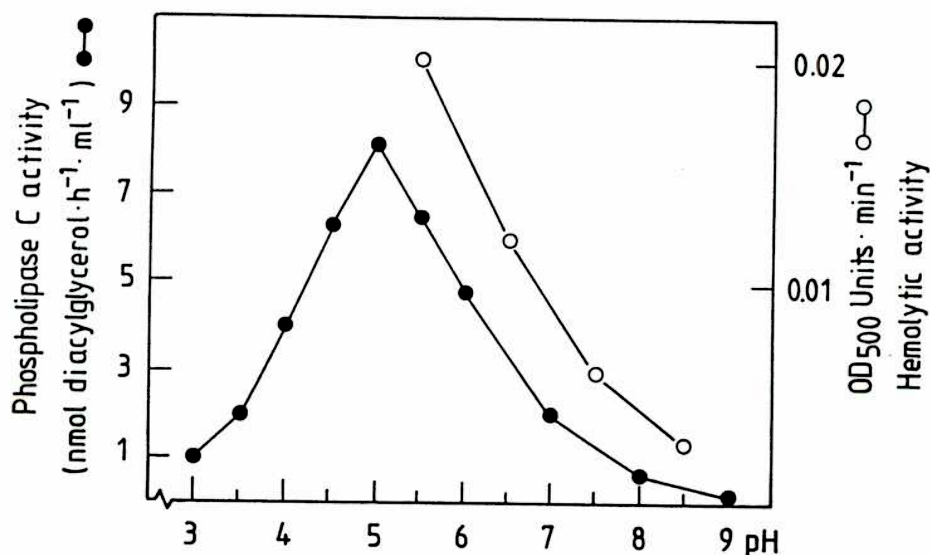


Fig.13. Efecto del pH en las actividades fosfolipasa C y hemolítica. Para las determinaciones de actividad fosfolipasa C, se utilizó un buffer universal 0,2 M Tris/ 0,2 M citrato de sodio, ajustado a los distintos valores de pH. Para las mediciones de actividad hemolítica, el pH se ajustó por agregado de 0,2 M Tris (base libre) o 0,2 M ácido acético, llevando luego las muestras a volumen constante por agregado de NaCl 0,15 M. La medición de las actividades se llevó a cabo como se describe en las secciones 2.3.2. y 2.4.2.

3.3.2.2. Efecto de iones bivalentes y Na_2EDTA

El agregado de 10 mM Cl_2Ca al medio de reacción no produce variaciones significativas de la actividad fosfolipasa C ni de la actividad hemolítica asociada. Resultados similares se obtienen efectuando la incubación en presencia de la misma concentración de Cl_2Mg o Cl_2Sr . El Na_2EDTA tampoco muestra efectos significativos sobre las actividades. Estos resultados se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Efecto de iones bivalentes y del quelante Na_2EDTA sobre las actividades fosfolipasa C y hemolítica. Los resultados se expresan como porcentajes del control.

	Ca_2Cl 10mM	Mg_2Cl 10mM	Sr_2Cl 10mM	Na_2EDTA 2,5mM
Fosfolipasa C	99±3	96±5	100±4	101±6
Actividad hemolítica	96±7	103±7	95±6	97±8

3.3.2.3. Termolabilidad

El efecto sobre las actividades fosfolipasa C y hemolítica de la exposición a temperaturas elevadas en buffer 0,15 M NaCl / 0,02 M acetato de sodio, pH 5,5, por distintos períodos de tiempo se muestra en la Tabla 6. Puede observarse a 60°C una caída paralela a lo largo del tiempo de las actividades fosfolipasa C y hemolítica. El calentamiento a 100°C durante 10 min suprime ambas actividades.

Tabla 6. Efecto de la exposición a temperaturas elevadas sobre la actividad fosfolipasa C y la actividad hemolítica. Los resultados se expresan como porcentajes del control.

T°	tiempo (min)	Fosfolipasa C (% control)	Actividad hemolítica (% control)
60°C	10	62 ± 5,9	57 ± 6,5
	20	37 ± 2,8	30 ± 2,7
	30	18 ± 1,3	16 ± 1,7
100°C	10	0,1 ± 0,0	0 ± 0,0

3.3.2.4. Especificidad de sustrato

Se estudió este aspecto utilizando sustratos sintéticos y otros preparados biosintéticamente, empleando semillas de soja en germinación marcadas con [1-¹⁴C] acetato, como se describe en la sección 2.4.5. De este modo, se obtuvieron diacil-PC y diacil-PE.

La LPC fue preparada por acción de lipasa pancreática sobre 1-palmitoil-2-[1-¹⁴C] oleoil PC. El ácido fosfatídico (PA) se preparó por acción de fosfolipasa D de semilla de maní sobre 1,2-di-[1-¹⁴C] estearoil PC. Estos sustratos se dispersaron por sonicación y se usaron en una concentración de 0,8 mM y una actividad específica de 0,015 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$. El buffer utilizado fue, en todos los casos, 50 mM acetato de sodio/ 1% Tritón X-100, pH 5,0.

Los resultados se muestran en la Tabla 7. Nótese la considerable actividad específica contra PA, el cual es un fosfolípido cargado negativamente.

Tabla 7. Especificidad de sustrato de la fosfolipasa C.

Sustrato	Actividad fosfolipasa C nmol DG/ h·mg proteína
1,2 di-[1- ¹⁴ C] estearoil $\dot{\text{U}}\text{C}$	615 + 21
1-palmitoil-2-[1- ¹⁴ C] oleoil PC	600 + 18
2-[1- ¹⁴ C] oleoil LPC	550 + 16
1,2 di-[1- ¹⁴ C] estearoil PA	1018 + 37
diacil PC de semilla de soja	735 + 28
diacil PE de semilla de soja	224 ± 10

La fosfolipasa C no tiene actividad contra el sustrato sintético p-nitrofenilfosforilcolina, el cual ha sido propuesto como sustrato colorimétrico para fosfolipasas C bacterianas (140).

3.3.2.5. Parámetros cinéticos de la fosfolipasa C

La influencia de la concentración de sustrato sobre la hidrólisis de PC catalizada por fosfolipasa C fue estudiada utilizando como sustrato 1,2 di-[1-¹⁴C] estearoil PC y, como buffer, 0,05 M acetato de sodio/ 1% Tritón X-100, pH 5.0. Este estudio, además de proporcionar los valores aparentes de K_M y V_M de la enzima purificada en estas condiciones, es de importancia pues permite asegurar la linealidad del ensayo en las determinaciones cuantitativas de la fosfolipasa C. Esto requiere operar con concentraciones saturantes de sustrato. La Fig.14 muestra la representación doble recíproca de Lineweaver-Burk de las velocidades iniciales de reacción en función de distintas concentraciones de PC. Los valores aparentes de K_M y V_M obtenidos son, respectivamente, 0,067 mM y 9,5 nmol DG/ min·mg proteína.

La linealidad de la determinación de actividad fosfolipasa C en las condiciones de sustrato seleccionadas se muestra en las Fig.15 y 16, donde se grafica la dependencia de la reacción con respecto al tiempo y a la concentración de proteína, respectivamente. Se observa linealidad en tanto que la hidrólisis del sustrato no supere el 25%. Esta condición se empleó en las determinaciones de actividad de esta enzima.

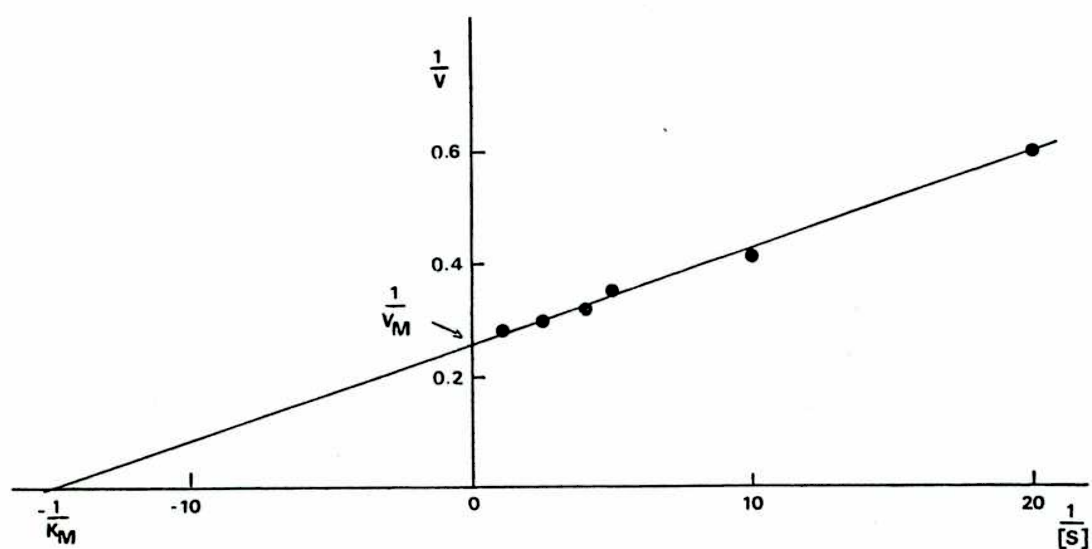


Fig.14. Representación doble recíproca de Lineweaver-Burk de las velocidades iniciales de reacción (V) en función de distintas concentraciones de sustrato (S). El sustrato utilizado fue 1,2-di-[1- 14 C] estearoil PC, diluido con PC de semilla de soja a una actividad específica de 0.06 μ Ci/ μ mol. Las reacciones se llevaron a cabo en buffer 0,05 M acetato de sodio/ 1% Tritón X-100, pH 5,0 (conc. finales). V_m = velocidad máxima.

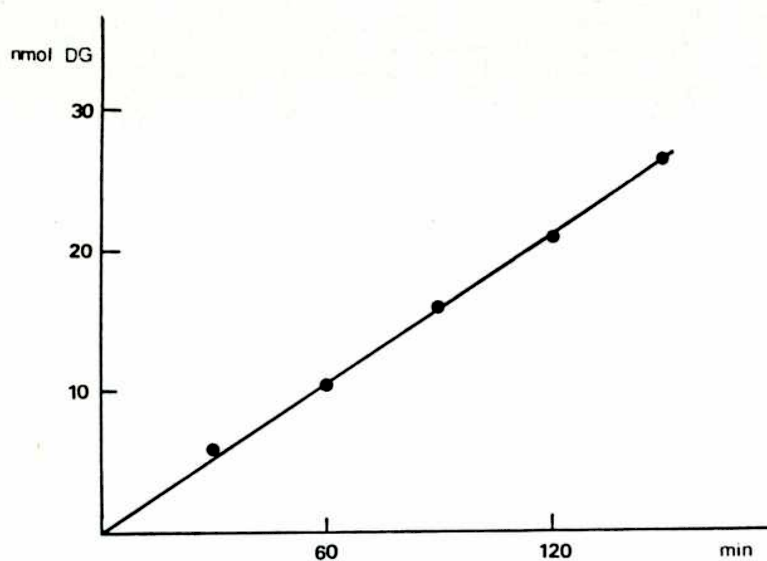


Fig.15. Liberación de DG por la fosfolipasa C en función del tiempo. Las incubaciones se llevaron a cabo como se describe en la sección 2.4.2. por los períodos de tiempo indicados. La cantidad de proteína en cada ensayo fue 20 μg .

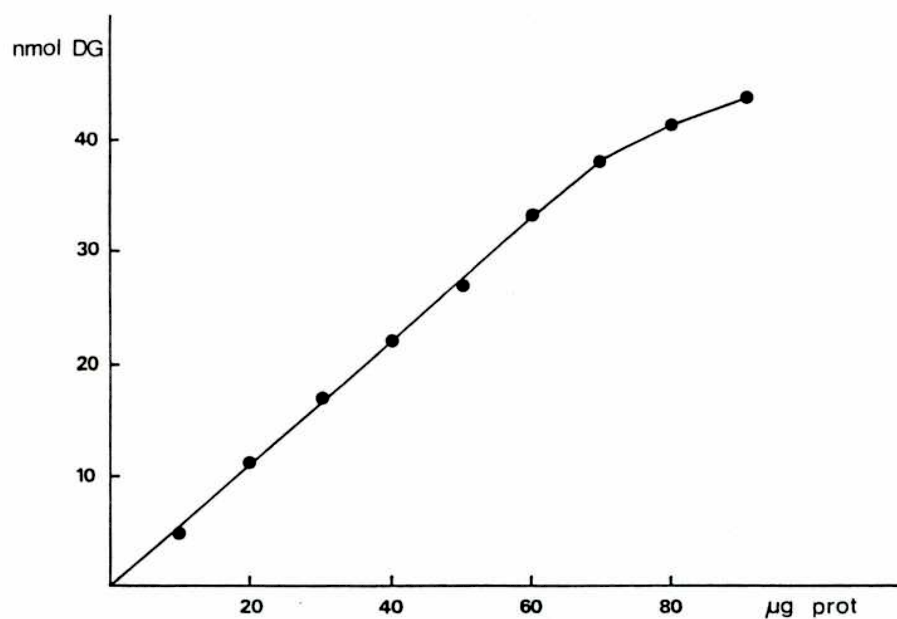


Fig.16. Liberación de DG por la fosfolipasa C en función de la concentración de enzima. Las incubaciones se llevaron a cabo durante 60 min, siguiendo el procedimiento descrito en la sección 2.4.2., utilizando una preparación purificada de fosfolipasa C la cual fue concentrada a través de una membrana ultrafiltrante Amicon de 10000 D de corte.

3.4. Actividad hemolítica no asociada a fosfolipasas

La actividad hemolítica originalmente presente en el material precipitado con sulfato de amonio se recupera en menor proporción que la fosfolipasa C cuando se lleva a cabo la purificación de esta enzima. Este resultado podría ser consecuencia de la presencia de un segundo factor hemolítico. Para investigar esta hipótesis se cromatografió el precipitado de sulfato de amonio directamente en Sepharose 6B, omitiendo la cromatografía en DEAE celulosa. Este experimento demostró que, en efecto, existe un segundo pico hemolítico, diferente del asociado a fosfolipasa C. Cuando las fracciones activas de este segundo pico se concentraron y cromatografiaron en una columna de Sephadex G 75, la actividad hemolítica eluyó en un único pico de Mr aproximado de 4×10^4 .

Esta preparación no muestra actividad fosfolipasa C y eluye de la columna de Sephadex G 75 separadamente de las actividades fosfolipasa A y TG lipasa. Se observó asimismo que no presenta actividad proteasa contra hemoglobina desnaturalizada, sustrato normalmente empleado para las proteasas extracelulares de Tetrahymena (33,58). Coincidentemente, esta actividad hemolítica no resulta inhibida por Trassylol (Aprotin, Sigma), un inhibidor de proteasas con amplia especificidad.

Se comprobó que la actividad es inhibida por colesterol. Una concentración de $1 \mu\text{g/ml}$ de este lípido es suficiente para suprimir el efecto de 2 HU. El colesterol se agregó a partir de una solución 2 mg/ml en dimetilsulfóxido (DMSO). Igual cantidad de DMSO sin colesterol carece de efectos sobre la hemólisis. Por otra parte, se observó que la actividad hemolítica se incrementa en un 30 a 35 % por el agregado de 1 mM de ditioneitol (DTT).

En vista de estos resultados, se investigó la composición del lote de fosfatidilcolina de huevo utilizado en experimentos previos (tipo XI-E, Sigma), que como se indicó en 3.1.2.6. inhibe la actividad hemolítica del medio extracelular de Tetrahymena. Por TLC (sistema para lípidos neutros) se encontró que esta preparación contiene colesterol

como contaminante. La presencia de fosfatidilcolina y colesterol en esta preparación podría explicar la inhibición de ambos factores citolíticos del medio extracelular de Tetrahymena.

3.5. Purificación y caracterización de la fosfolipasa A

3.5.1. Purificación de la fosfolipasa A y características de la preparación.

La fosfolipasa A del medio extracelular de T.thermophila se purificó por precipitación fraccionada con sulfato de amonio, cromatografía de intercambio iónico en CM celulosa y DEAE celulosa, cromatografía hidrofóbica en decil-Sepharose 4B y filtración en gel de Sephadex G 50. Los detalles de los métodos utilizados se encuentran en la sección 2.5.4. y los resultados de cada paso de purificación pueden verse en la Tabla 8.

Tabla 8. Purificación de la fosfolipasa A de T.thermophila. La actividad se midió por la producción de LPC a partir de 1-palmitoil-2-[1-¹⁴C] oleoil PC.

Paso de purificación	Actividad total ($\mu\text{molLPC}/\text{min}$)	Actividad específica ($\mu\text{molLPC}/\text{mg}\cdot\text{min}$)	Recuperac. (%)	Purificac. (veces)
Precipitación con (NH_4) ₂ SO ₄	180	0,3	100	1
CM celulosa	95	2,7	52	10
Decyl Sepharose 4B	55	9,8	30	38
DEAE celulosa	37	60,5	20	233
Sephadex G 50	22	142,3	12	547

La fosfolipasa A fue purificada 547 veces con una recuperación del 12% de la actividad presente en el precipitado de sulfato de amonio.

La preparación final de fosfolipasa A no produce hidrólisis de TG al incubarla con tri-[1-¹⁴C] oleoilglicerol. Al efectuar la incubación con 1-palmitoil-2-[1-¹⁴C] oleoil PC o 1,2 di-[1-¹⁴C] estearoil PC no se producen DG ni MG. Estos resultados indican que la preparación final de fosfolipasa A está libre de actividades fosfolipasa C o lipasa.

El precipitado de sulfato de amonio contiene una actividad TG lipasa que se separa de la fosfolipasa a en la columna de CM celulosa, como puede verse en la Fig.17. Esta cromatografía pudo, por lo tanto, usarse como paso común en la purificación de ambas actividades lipolíticas.

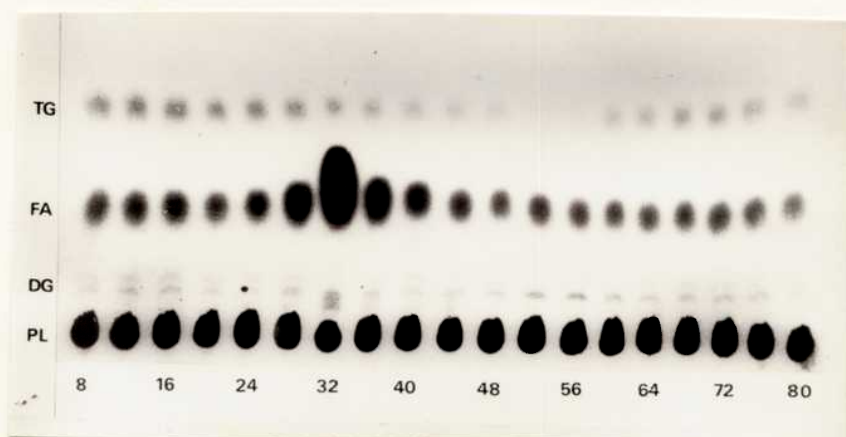


Fig.17. Cromatografía de intercambio iónico en CM celulosa para la separación de las actividades fosfolipasa A y TG lipasa del medio extracelular de *T.thermophila*. Los detalles de este procedimiento se encuentran en la sección 2.5.4. La figura muestra un cromatograma de los productos de hidrólisis de asolectina incubada con distintas fracciones del eluato, como se describe en la sección 2.4.1. Nótese que la fosfolipasa A eluye alrededor de la fracción 32, donde puede verse un marcado aumento de ácidos grasos. La TG lipasa eluye en las fracciones 52 a 56, como lo indica la desaparición de TG.

En los pasos de purificación subsiguientes, la fosfolipasa A eluyó siempre en un pico único y no se detectaron en los eluatos otras actividades fosfolipasas o lipasas. Una elución típica de una columna de decil-Sepharose 4B se ilustra en la Fig.18.

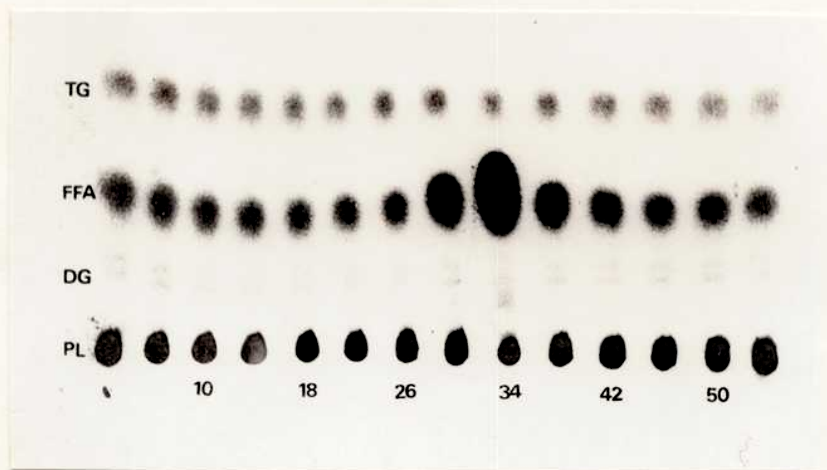


Fig.18. Cromatografía de interacción hidrofóbica en decil-Sepharose 4B de la fosfolipasa A. Los detalles de este procedimiento se encuentran en la sección 2.5.4. La figura muestra un cromatograma de los productos de hidrólisis de asolectina incubada con distintas fracciones del eluato. La incubación y cromatografía se llevaron a cabo como se describe en la sección 2.4.1. La fosfolipasa A eluye alrededor de la fracción 34, como lo indica el aumento de ácidos grasos.

El análisis de la preparación final por electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS mostró una banda principal de Mr 32000 y una banda menor de Mr 30000 (Fig.19)

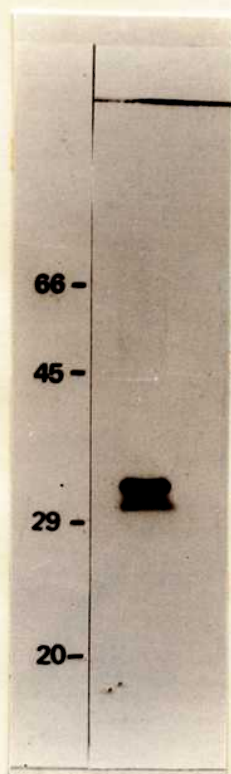


Fig.19. Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS de la preparación purificada de fosfolipasa A. Los detalles experimentales se encuentran en la sección 2.6. Los números indican la posición de las siguientes proteínas: albúmina de suero bovino (Mr 66000), ovoalbúmina (Mr 45000), anhidrasa carbónica (Mr 29000) e inhibidor de tripsina de semilla de soja (Mr 20100).

3.5.2. Caracterización de la fosfolipasa A

En los experimentos llevados a cabo para caracterizar esta actividad se utilizó una preparación de enzima purificada como se describe en 3.5.1. y que contenía 3 $\mu\text{g/ml}$ de proteína.

3.5.2.1. Especificidad posicional

Por incubación con 1-palmitoil-2-[1- ^{14}C] oleoil PC se demostró que la fosfolipasa A del medio extracelular de Tetrahymena es de tipo A_1 (EC. 3.1.1.32), ya que la radiactividad de los productos estaba asociada fundamentalmente con LPC. Sólo mínimas cantidades de FFA se produjeron. La velocidad de producción de FFA fue de 4,7% con respecto a la producción de LPC, como puede verse en la Tabla 9. Esta proporción se mantuvo constante en todos los pasos de purificación que siguieron a la cromatografía en CM celulosa. El agregado de cantidades saturantes de dietileter estimula ligeramente la formación de LPC radiactiva a partir del mencionado sustrato e inhiben por completo la producción de FFA marcados (Tabla 9).

Tabla 9. Especificidad posicional de la fosfolipasa A. Se incubaron 0,15 μg de fosfolipasa A purificada con 1-palmitoil-2-[1- ^{14}C] oleoil PC por 10 min a 37°C, en presencia y ausencia de concentraciones saturantes de dietileter y se midió la radiactividad asociada a los productos.

	LPC $\mu\text{mol/mg}\cdot\text{min}$	FFA $\mu\text{mol/mg}\cdot\text{min}$
sin dietileter	179	8,5
con dietileter	215	0

3.5.2.4. PH óptimo

Para la determinación del pH óptimo de la fosfolipasa A_1 se utilizó un buffer universal 0,2 M citrato de sodio/ 0,2 M

Tris, ajustado a distintos valores de pH. Se midió la producción de LPC, utilizando como sustrato 1-palmitoil-2-[1-¹⁴C] oleoil PC. Los resultados se muestran en la Fig. 20, donde puede verse un marcado pico de actividad a pH 4,5.

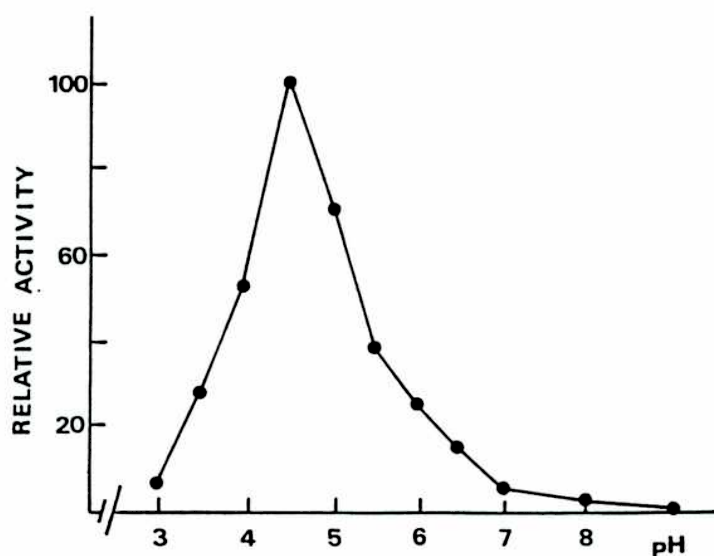


Fig.20. Actividad fosfolipasa A₁ en función del pH. Se midió la LPC resultante de la hidrólisis de 1-palmitoil-2-[1-¹⁴C]oleoilPC como se describe en el punto 2.4.3., utilizando como buffer 0.2 M citrato de sodio/ 0.2 M Tris, ajustado a distintos valores de pH. Los resultados se expresan como porcentajes de la actividad máxima (10.83 nmoles LPC/min a pH 4.5).

3.5.2.3. Efecto de CaCl_2 y Na_2EDTA

La Tabla 10 muestra el efecto del agregado de 1 y 10 mM CaCl_2 y 2,5 mM Na_2EDTA sobre la actividad fosfolipasa A_1 . Puede verse que el CaCl_2 , en concentración de 1 mM no presenta efectos, mientras que si se sube la concentración a 10 mM se produce una considerable disminución de la actividad. Debe destacarse, sin embargo, que a esta concentración, el CaCl_2 produce masiva agregación de la suspensión de sustrato, por lo tanto, la inhibición observada debe ser considerada con cautela. El Na_2EDTA no afecta la actividad fosfolipasa A_1 , lo cual muestra la independencia de esta enzima de la presencia de iones bivalentes.

Tabla 10. Efecto del Ca^{++} y del Na_2EDTA sobre la actividad fosfolipasa A_1 . Los resultados se expresan como porcentajes del control.

	CaCl_2		Na_2EDTA
	1 mM	10 mM	2,5 mM
Actividad fosfolipasa A_1	96 ± 6	40 ± 6	98 ± 8

3.5.2.4. Especificidad de sustrato

Para estudiar este aspecto se utilizaron los mismos sustratos que en la sección 3.3.2.4. El buffer fue 0,05 M acetato de sodio, pH 5,0. Los resultados se muestran en la Tabla 11, donde se consignan los productos medidos en cada caso (liso-derivados o ácidos grasos). Nótese la baja actividad específica contra LPC. Asimismo, se destaca una alta actividad contra PA.

Tabla 11. Especificidad de sustrato de la fosfolipasa A₁

Sustrato	Actividad fosfolipasa A ₁	
	lisoderivado μmol/min·mg prto.	FFA μmol/min mg prot
1,2-di-[1- ¹⁴ C] estearoil PC	171 ± 1,5	17,9 ± 1,2
1-palmitoil-2-[1- ¹⁴ C] oleoil PC	18,1 ± 2,2	-
2-[1- ¹⁴ C] oleoil LPC	-	0,54 ± 0,06
1,2-di[1- ¹⁴ C] estearoil PA	32,9 ± 3,1	33,5 ± 2,5
diacil PC de semilla de soja	-	17,2 ± 1,8
diacil PE de semilla de soja	-	21,6 ± 2,4

3.5.2.5. Estimación del Mr

El Mr de la fosfolipasa A₁ se estimó por su volumen de elución de una columna de Sephadex G 75. Se utilizó para ello una columna de 80 x 2,5 cm, siendo el buffer de elución, 0,15 M NaCl/ 0,02 M Tris-HCl, pH 7,0. La columna fue calibrada previamente con los siguientes standards proteicos: albúmina de suero bovino (Mr 66000), ovoalbúmina (Mr 45000), anhidrasa carbónica (Mr 29000), inhibidor de tripsina de semilla de soja (Mr 20100) y citocromo C (Mr 12400). El volumen de exclusión de la columna se determinó con Blue Dextran 2000. La Fig.21 ilustra la determinación de Mr por este método. El resultado obtenido fue de 28000.

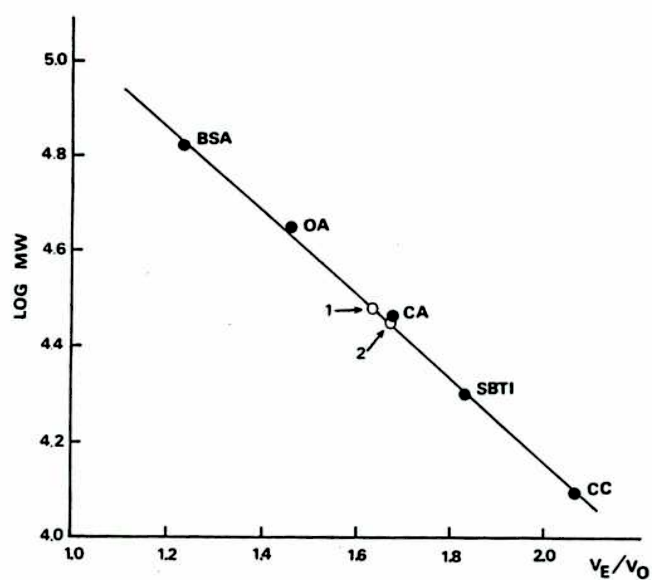


Fig.21. Estimación del peso molelcular de la fosfolipasa A, y la TG lipasa por filtración en Sephadex G75. Marcadores de peso molecular: BSA= albúmina de suero bovino, OA= ovoalbúmina, CA= anhidrasa carbónica, SBTI= inhibidor de tripsina de semilla de soja (soy bean trypsin inhibitor) y CC= citocromo C. (1) TG lipasa; (2) fosfolipasa A. V_E = volúmen de elución, V_0 = volúmen de exclusión (void volume), determinado con Blue Dextran 2000.

3.5.2.6. Actividad hemolítica

Se estudió la posible acción hemolítica de la preparación pura de fosfolipasa A₁ sobre una suspensión de glóbulos rojos de carnero. Se observó que esta enzima carece totalmente de actividad hemolítica "per se".

Sin embargo, en combinación con la fosfolipasa C purificada, produce un aumento de la pendiente de la hemólisis, sin afectar la duración del período prolítico. Estos efectos fueron detectados por medio de registros espectrofotométricos continuos llevados a cabo como se describe en la sección 2.3.3. Utilizando mezclas conteniendo 5 µg/ml de fosfolipasa C y 1 y 0,5 µg/ml de fosfolipasa A₁, se obtienen incrementos en el valor de la pendiente en la curva de hemólisis de 18 y 7 %, respectivamente.

3.5.2.7. Parámetros cinéticos

Se determinó el K_M y el V_M de la fosfolipasa A₁, tal como ya se describió para la fosfolipasa C (ver sección 3.3.2.5.). El valor de K_M obtenido fue de 0,13 µmol LPC/ ml (0,13 mM) y el V_M fue de 185 µmol LPC/ min·mg prot.

3.6. Purificación y caracterización de la triacilglicerol lipasa (EC. 3.1.1.3.)

3.6.1. Purificación de la actividad y características de la preparación final

Para la purificación de la TG lipasa extracelular de T.thermophila se utilizaron los mismos pasos iniciales de precipitación con sulfato de amonio y cromatografía en CM celulosa que se emplearon para purificar la fosfolipasa A₁. La actividad lipasa eluida de CM celulosa fue luego cromatografiada sucesivamente en DEAE celulosa y Sephadex G 50 (ver sección 2.5.5. para detalles experimentales). Una elución típica de Sephadex G 50 se ilustra en la Fig.22.

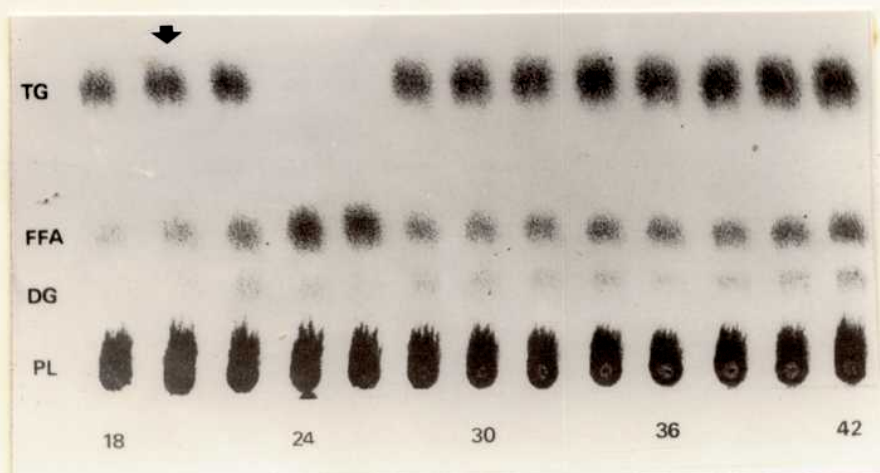


Fig.22. Filtración en gel de Sephadex G50 de la TG lipasa. Los detalles de este paso de purificación se encuentran en la sección 2.5.5. Distintas fracciones del eluato fueron incubadas con asolectina y los productos de degradación se separaron por TLC como se describe en 2.4.1. La flecha indica el volúmen de exclusión (void volume) de la columna. La TG lipasa eluye en las fracciones 24 a 26, como lo indica la desaparición de TG.

La Tabla 11 resume los pasos de purificación de la TG lipasa. Esta actividad fue purificada 818 veces con una recuperación del 13%.

Tabla 11. Purificación de la TG lipasa extracelular de *T.thermophila*. La actividad se midió por la producción de ácidos grasos a partir de tri-[1-¹⁴C] oleoilglicerol.

Paso de purificación	Actividad total ($\mu\text{molFFA}/\text{min}$)	Actividad específica ($\mu\text{molFFA}/\text{mg}\cdot\text{min}$)	Recuperac. (%)	Purificac. (veces)
Precipitado de (NH_4) ₂ SO ₄	3284	4,8	100	1
CM celulosa	2300	975	70	205
DEAE celulosa	1212	1772	37	373
Sephadex G 50	436	3883	13	818

La preparación final no muestra actividades fosfolipasas ya que no se observó degradación de los sustratos 1-palmitoil-2-[1-¹⁴C] oleoil PC y di-[1-¹⁴C] estearoil PC.

El análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS mostró una única banda de Mr 31000, aún en geles en los que se sembró una gran cantidad de proteína (Fig.23).

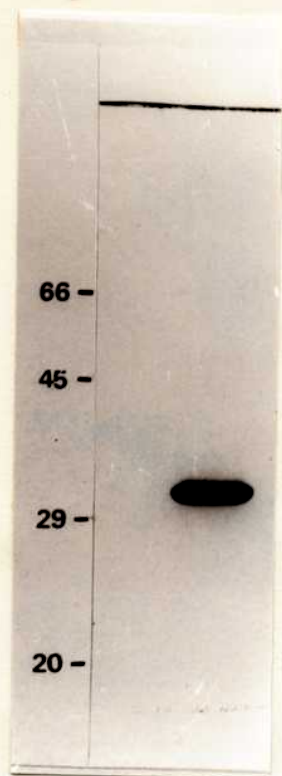


Fig.23. Electroforesis en gel de poli-acrilamida en presencia de SDS de la preparación purificada de TG lipasa. La electroforesis se llevó a cabo como se describe en la sección 2.6. Los standards proteicos usados son los mismos que los de la Fig.19.

6.2. Caracterización de la TG lipasa

Para la caracterización de esta actividad se utilizó una preparación purificada del modo descrito en 6.1., conteniendo 3,2 μg proteína/ml.

3.6.2.1. Especificidad posicional y de sustrato

Separando los productos de la hidrólisis de tri-[1- ^{14}C] oleoilglicerol por TLC y midiendo la radiactividad asociada a cada lípido se obtienen los siguientes resultados. Por un lado, analizando los dos isómeros de DG, que se separan con la mezcla de solventes usada para lípidos neutros como dos bandas cercanas, se observa que el 75% de la radiactividad asociada a DG parece encontrarse en el isómero 1,2, indicando que la TG lipasa ataca preferencialmente la posición sn-1 (sn-3) del TG. Por otra parte, si se hace un scanning de la radiactividad en la placa de TLC, se obtiene un registro como el de la Fig.24. Puede observarse que, como productos de degradación, aparecen FFA, DG y MG. La aparición de este último indica que la TG lipasa también hidroliza DG.

Estos estudios se complementaron con un nuevo conjunto de experimentos en los que se empleó un sistema de separación de lípidos en TLC con placas de sílica gel G impregnadas con ácido bórico, que permite resolver en forma neta los distintos DG y MG. Además las extracciones y separaciones se efectuaron rápidamente para disminuir posibles migraciones intramoleculares de los ácidos grasos. Por último, se realizaron incubaciones con DG y MG radiactivos, separados de la misma forma, para comprobar directamente la hidrólisis de estos compuestos. Todas las incubaciones se llevaron a cabo de acuerdo al método de Nilsson-Ehle modificado, como se describe en la sección 2.4.4. Los resultados obtenidos confirmaron la especificidad por la posición sn-1 ya que el 93% del DG radiactivo producido por incubación con tri-[1- ^{14}C] oleoilglicerol fue de la especie 1,2-DG. Se comprobó además que la preparación degrada 1,2-DG produciendo 2-MG. Este último también es degradado, pero a una velocidad mucho menor. Las velocidades de liberación de FFA a partir de los

distintos compuestos estuvieron en la proporción de 100 para TG, 48 para 1,2-DG y 5 para 2-MG.

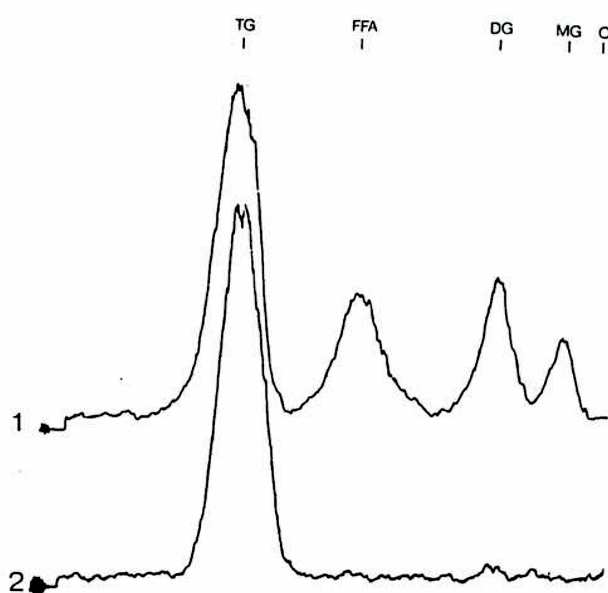


Fig.24. Productos de la hidrólisis de tri[1-¹⁴C] oleoilglicerol por la TG lipasa. La figura muestra un scanning de radiactividad de una placa de TLC donde los productos fueron separados con una mezcla de solventes para lípidos neutros (ver sección 2.4.1.). El ensayo de la TG lipasa se llevó a cabo como se describe en 2.4.4. (1) incubación de la trioleína con TG lipasa purificada, durante 1 h a 37°C. (2) sustrato incubado en las mismas condiciones pero omitiendo la enzima. O= origen.

3.6.2.2. PH óptimo

la variación de la actividad TG lipasa con el pH se estudió utilizando el buffer universal 0,2 M citrato de sodio/ 0,2 M Tris, ajustado a los distintos valores de pH. Los resultados obtenidos se muestran en la Fig.25, donde puede verse un marcado pico de actividad a pH 4,4.

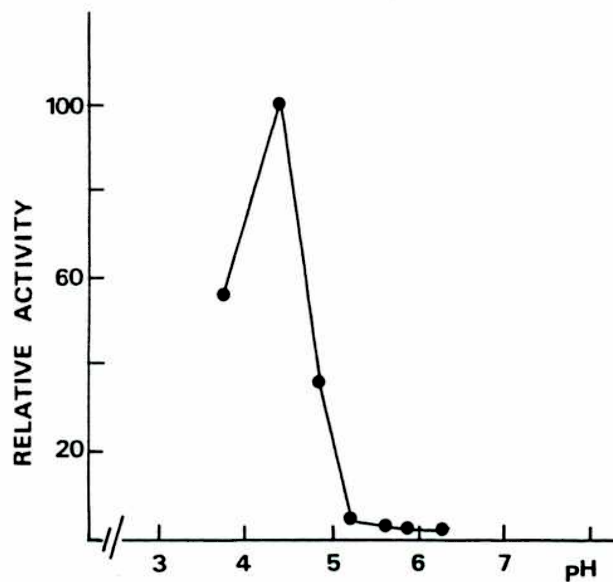


Fig.25. Actividad TG lipasa en función del pH. Se midieron FFA resultantes de la hidrólisis de tri[1-¹⁴C] oleoilglicerol, como se describe en 2.4.4., utilizando como buffer 0.2 M citrato de sodio/ 0.2 M Tris, ajustado a distintos valores de pH. Los resultados se expresan como porcentajes de la actividad máxima (56.16 nmol FFA/min a pH 4.4).

3.6.2.3. Efecto de CaCl_2 y Na_2EDTA

La Tabla 13 muestra el efecto sobre la actividad TG lipasa del agregado de 1 y 10 mM CaCl_2 y 2,5 mM Na_2EDTA . No se observaron alteraciones significativas de la actividad, lo cual indica que ésta no es inhibida por Ca^{++} y tampoco requiere este ion u otros iones bivalentes.

Tabla 13. Efecto de CaCl_2 y Na_2EDTA sobre la actividad TG lipasa. Los resultados se expresan como porcentajes de la actividad control.

	CaCl_2		Na_2EDTA
	1 mM	10 mM	2.5 mM
Actividad TG lipasa (% control)	99 ± 9	93 ± 5	94 ± 7

3.6.2.4. Inhibidores de la TG lipasa

Se observó que el Tritón X-100, en concentración de 0,1 y 1 %, y la clorpromazina en concentraciones de 0,1 y 0,5 mM, muestran inhibición significativa de esta actividad ($P < 0,01$). Estos resultados se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14. Efecto del Tritón X-100 y la clorpromazina sobre la actividad TG lipasa. Los resultados se expresan como porcentajes del control.

	Tritón X-100		clorpromazina	
	0,1%	1%	0,1 mM	0,5 mM
Actividad TG lipasa (% control)	32 ± 4,0	2 ± 0,3	63 ± 8,1	10 ± 1,5

3.6.2.5. Estimación del Mr

El Mr de la TG lipasa se determinó por su volúmen de elución de una columna de Sephadex G 75, utilizando los mismos standards proteicos y buffer que los ya descriptos para la fosfolipasa A (Fig.21). El Mr estimado de este modo fue de 30500.

3.6.2.6. Parámetros cinéticos

El K_M y V_M de la TG lipasa, calculados como se indicó en 3.3.2.5., fueron de 0,3 mM y 1,8 $\mu\text{mol FFA}/\text{min mg proteína}$, respectivamente.

3.7. Rol de las enzimas lipolíticas secretadas en la incorporación y degradación de fosfatidilcolina exógena en cultivos de *Tetrahymena thermophila*

El posible papel desempeñado por las enzimas encontradas en este estudio se examinó utilizando la línea celular mutante NP1, que no forma vacuolas, y la cepa salvaje de la cual ésta deriva, DIII. Los experimentos se llevaron a cabo a 37°C, utilizando cultivos de 24 h. Como sustrato se utilizó una suspensión de asolectina, conteniendo 1-palmitoil-2-[1- ^{14}C] oleoil PC (50 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$), de modo tal que las concentraciones finales fueron, en todos los casos, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de asolectina y 0,05 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ del fosfolípido marcado.

Se efectuaron dos estudios:

a) cinética de la degradación de PC en medio libre de células.

b) incorporación de radiactividad en distintos lípidos extraídos de las células. Para estudiar el efecto de las enzimas extracelulares se compararon células incubadas en su mismo medio de crecimiento (con enzimas) con células lavadas y resuspendidas en medio nuevo, es decir, eliminando las enzimas acumuladas.

Para el primer estudio, se obtuvo medio libre de células de la cepa DIII por centrifugación del cultivo. A este medio se agregó el mencionado sustrato y, a distintos tiempos se separaron alícuotas. Los lípidos se extrajeron de acuerdo a Bligh y Dyer y se separaron en TLC con mezclas de solventes para lípidos polares y lípidos neutros. La radiactividad asociada a cada mancha lipídica se determinó por centelleo líquido. Se realizaron dos incubaciones paralelas y para cada tiempo se extrajeron muestras duplicadas. La Fig.26 muestra

los promedios de los 4 valores así obtenidos para cada lípido en los distintos tiempos. Puede observarse que aproximadamente el 75% de PC es degradado al cabo de 90 min en el medio extracelular de T.thermophila. Los productos que aparecen inicialmente son, ante todo, LPC y DG. Esto indica un primer ataque de PC por la fosfolipasa A (recuérdese que el fosfolípido está marcado en la posición 2 y, por consiguiente, esta enzima produce LPC radiactiva) y por la fosfolipasa C, que origina DG. Luego, comienza a producirse una acumulación notable de MG. Este lípido puede originarse por dos vías: a) por degradación de LPC catalizada por la fosfolipasa C ; y b) por degradación de DG catalizada por la lipasa. La acumulación de MG refleja la escasa hidrólisis de este lípido por la lipasa, de acuerdo a lo que hemos descrito previamente. Por último, se observa aparición de FFA marcados, pero únicamente después de los 30 min. Este resultado sugiere que éstos no derivan directamente de la hidrólisis de PC, sino de la de LPC, DG o MG. Este hecho concuerda con la ausencia de fosfolipasa A₂ observada al efectuarse la purificación de las enzimas lipolíticas.

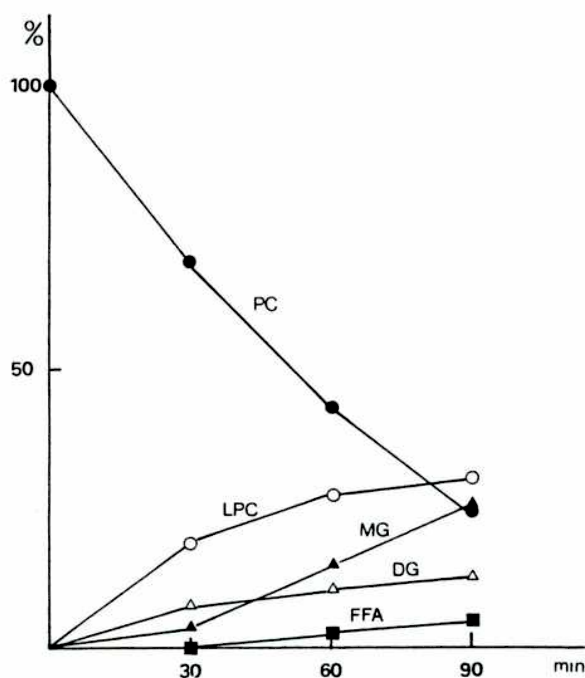


Fig.26. Cinética de la degradación de PC en medio de *T.thermophila* libre de células. Se obtuvo medio extracelular de *T.thermophila* cepa DIII por centrifugación de un cultivo crecido a 37°C durante 24 h en PPY. Se incubaron 100 µg/ml de asolectina conteniendo 0.05 µCi/ml de 1-palmitoil-2-[1-¹⁴C] oleoil PC con este medio y se separaron alícuotas a distintos tiempos. Los lípidos se extrajeron y cromatografiaron como se describe en la sección 2.4.1. y se midió la radiactividad asociada a cada lípido. El gráfico muestra la distribución de radiactividad como porcentajes del total de radiactividad recuperado en cada una de las muestras. Estos totales difirieron entre sí menos de un 10%.

Para el segundo estudio, es decir, la incorporación y metabolismo de PC exógena en células de T.thermophila, se compararon los resultados obtenidos en células incubadas con el fosfolípido en presencia de sus enzimas secretadas con los obtenidos en células lavadas y transferidas a nuevo medio de cultivo (PPY). Además los experimentos se hicieron con la cepa salvaje DIII y con el mutante NP1, a fin de estudiar el rol de las vacuolas alimenticias. Las incubaciones se llevaron a cabo en las mismas condiciones en que se estudió la degradación de PC en el medio extracelular. A los distintos tiempos, los lípidos se extrajeron luego de lavar las células dos veces con 10 mM Tris-HCl, pH 7,1, para eliminar los lípidos no incorporados. En la Fig.27 se muestra la incorporación de radiactividad a las células a distintos tiempos, en cada uno de los sistemas estudiados: DIII en medio original, DIII en medio nuevo, NP1 en medio original y NP1 en medio nuevo. Los resultados muestran que DIII (formadora de vacuolas) incorpora más rápidamente el fosfolípido radiactivo que NP1. Además, la presencia de enzimas en el medio parece acelerar la incorporación de lípidos radiactivos en ambos tipos celulares, ya que siempre la incorporación es más rápida en medio original (con enzimas) que en medio nuevo.

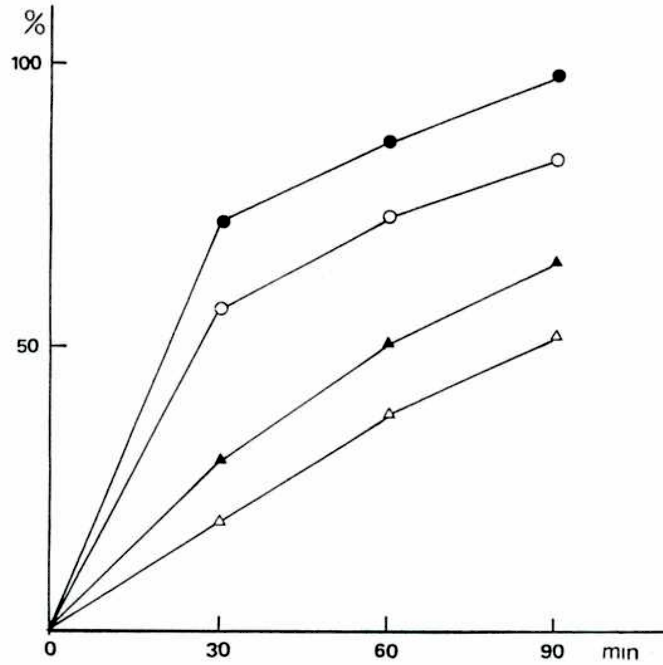


Fig.27. Incorporación de 1-palmitoil-2-[1- ^{14}C] oleoil PC a células de *T.thermophila*, cepas DIII y NP1. Se utilizaron cultivos de *T.thermophila* crecidos a 37°C durante 24 h en PPY. Se hicieron los siguientes estudios: ●—● DIII en su medio de crecimiento; ○—○ DIII transferidas a nuevo medio de cultivo; ▲—▲ NP1 en su medio de crecimiento y △—△ NP1 transferidas a nuevo medio de cultivo. En todos los casos, las células fueron incubadas a 37°C con 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de asolectina conteniendo 0.05 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ del fosfolípido marcado. A distintos tiempos, se separaron alícuotas de 0.4 ml de los cultivos (las cuales contenían 0.2 μCi totales) y se lavaron las células con 10 mM Tris-HCl, pH 7.1 por centrifugación. Se extrajeron los lípidos celulares y se midió la radiactividad asociada a ellos. El gráfico muestra los porcentajes de radiactividad incorporada a las células en cada caso, respecto del total presente en la alícuota inicial (0.2 μCi).

Se analizó, por otra parte, la distribución de radiactividad en los distintos lípidos extraídos de las células a los 90 min y separados por TLC. Los resultados se muestran en la Fig.28, como histogramas. Obsérvense los siguientes hechos:

- a) la mayor parte de la radiactividad se incorpora a TG;
- b) existe mayor degradación de PC, reflejada en disminución de este fosfolípido y aumento de LPC) en las células incubadas en su medio original que en las lavadas;
- c) la degradación de PC es mayor en células formadoras de vacuolas;
- d) hay aparición de radiactividad en la mancha correspondiente a PE que incluye a su análogo, aminoetilfosfonolípido (AEPL); este aumento es mayor en ausencia de enzimas secretadas;
- e) el MG también se muestra aumentado en presencia de las enzimas.

Estos resultados indican que las enzimas del medio tienen una notable participación en el metabolismo de la PC exógena.

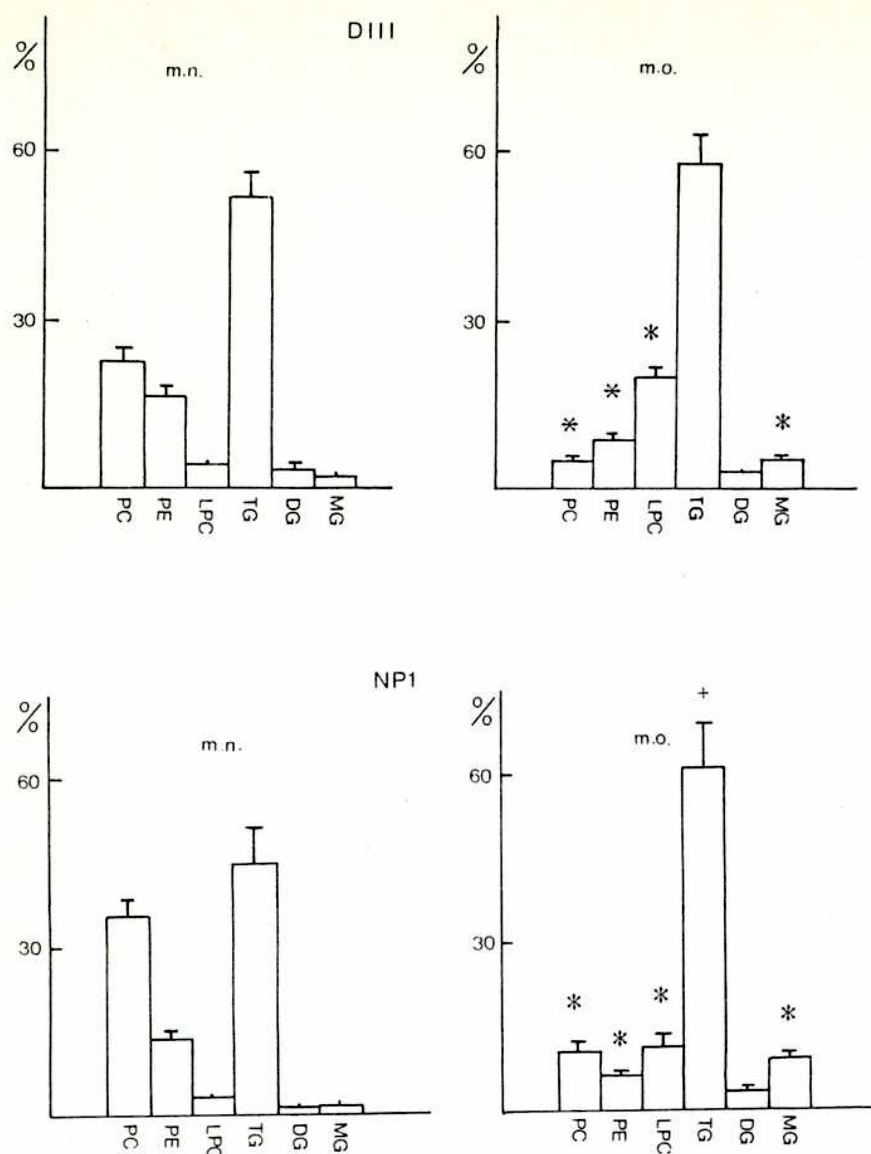


Fig.28. Incorporación y metabolismo de PC exógena por células de *T.thermophila*. Este estudio fue realizado de igual modo que el de la Fig.27, pero, en este caso, los lípidos celulares de alícuotas extraídas a los 90 min de incubación fueron separados por TLC y se midió la radiactividad asociada a cada uno de ellos. Los diagramas de barras muestran estos valores, expresados como porcentajes de la radiactividad total recuperada en cada muestra. **m.n.** (medio nuevo)= células transferidas a nuevo medio de cultivo ; **m.o.** (medio original)= células en su propio medio de crecimiento. En los paneles correspondientes a las células en m.o. se marcan con * y + las diferencias significativas ($P < 0,01$ y $P < 0,05$, respectivamente) respecto de las mismas células en m.n.

4 . D i s c u s i ó n

Esta Tesis describe el hallazgo y las propiedades de la actividad citolítica secretada por Tetrahymena thermophila al medio extracelular. Esta actividad fue detectada mediante una prueba de hemólisis utilizando glóbulos rojos de carnero. Su estudio indicó que es causada por proteínas, ya que es sensible a la tripsina, no dializable, termolábil y pH dependiente en forma marcada. Debido a que la hemólisis es un fenómeno indicador de daño en la membrana del eritrocito, se consideró la hipótesis que la misma resultara de una interacción de los factores hemolíticos con fosfolípidos. Por ello se estudió el efecto de preparaciones de fosfolípidos sobre la actividad hemolítica, encontrándose que los mismos eran inhibitorios. Estas observaciones condujeron a investigar la posible presencia de fosfolipasas en el medio extracelular de T.thermophila. La incubación de alícuotas del medio con asolectina como sustrato confirmó esta hipótesis, mostrando intensa degradación de fosfolípidos catalizada por componentes del medio. El análisis de los productos obtenidos indicó la presencia de fosfolipasas A y C, a las que luego se añadió el hallazgo de una triacilglicerol lipasa. Otros autores habían llevado a cabo estudios mostrando la presencia de otras enzimas hidrolíticas en el medio extracelular de este ciliado (33,59,60,141), pero no existía información sobre enzimas lipolíticas ni sobre actividad hemolítica.

A efectos de establecer la vinculación entre fosfolipasas y actividad hemolítica, se emprendió la purificación de estas enzimas. La idea rectora de este enfoque es que, si al efectuar la purificación, las actividades pueden ser separadas, quedaría demostrado que no residen en una misma proteína, en tanto que si co-cromatografían, no pudiendo ser separadas, se obtendría una fuerte indicación que actividad fosfolipasa y actividad hemolítica residen en una misma entidad. El estudio de la fosfolipasa C nos llevó así a obtener una preparación con elevada pureza, libre de otras actividades lipo-

líticas y que retiene actividad hemolítica. Durante la purificación, se verificó además la coelución fracción a fracción de ambas actividades. A estos resultados se suman otros en los que se observa paralelismo entre las propiedades de la actividad fosfolipasa C y la actividad hemolítica de la preparación final, sugiriendo fuertemente que la fosfolipasa C extracelular de T.thermophila tiene actividad hemolítica.

Previamente, se había observado actividad hemolítica asociada a una fosfolipasa sólo para el caso de la fosfolipasa C de Clostridium perfringens (89). La actividad hemolítica de esta enzima se debe a su capacidad de hidrolizar fosfolípidos en membranas intactas y posiblemente también a que los productos de la reacción, diacilgliceroles, tienden a agregarse, lesionando la integridad de la membrana celular en las áreas afectadas (100). Otras actividades fosfolipasas poseen la capacidad de atacar glóbulos rojos, pero no causan hemólisis, por ejemplo, la fosfolipasa A de Naja naja (cobra) (100,101). Es notable que las membranas de los glóbulos rojos tratados con estas enzimas puedan llegar a contener grandes cantidades de lisocompuestos, sin que éstos causen hemólisis. Esto destaca la importancia del producto de reacción en este proceso, ya que en el caso de la fosfolipasa C, con concentraciones relativas menores de diacilglicerol, la hemólisis ocurre rápidamente (142). La fosfolipasa A, extracelular de Tetrahymena carece de actividad hemolítica. Sin embargo, el agregado de la misma a preparaciones de fosfolipasa C acelera la hemólisis. Un efecto comparable ha sido observado para la acción de la fosfolipasa C de Bacillus cereus y la esfingomielinasa de Staphylococcus aureus. Separadamente, ninguna de estas enzimas causa hemólisis, pero la aplicación combinada de ambas resulta hemolítica (143).

¿Cómo es posible que Tetrahymena, un organismo que posee su membrana plasmática directamente expuesta al medio, pueda tolerar la presencia de una fosfolipasa extracelular que rápidamente destruye otras células? Como se explicó, Kennedy y Thompson (47) descubrieron que los fosfolípidos, compuestos altamente resistentes a la hidrólisis enzimática, consti-

tuyen el fosfolípido predominante en la membrana superficial de Tetrahymena. Sin embargo, el significado biológico de este descubrimiento quedó sin explicación (47,51). La observación de una fosfolipasa hemolítica aquí descrita permite ahora proponer que los fosfolípidos constituyen una defensa de Tetrahymena contra la actividad de sus fosfolipasas secretadas, de tal modo que estos ciliados pueden así atacar a otras células, siendo ellos mismos resistentes. Es decir, fosfolipasas y fosfolípidos representarían una coadaptación capaz de conferir a estos organismos una obvia ventaja evolutiva. Las particularidades mostradas por las moléculas del aminoetilfosfolípido son especialmente llamativas porque tienen el potencial de conferir protección contra fosfolipasa C (al tener reemplazado fosfonato por fosfato) y contra fosfolipasa A₁ (al tener una unión éter, en lugar de éster, en la posición sn-1)(45). Es decir, la molécula se encuentra protegida contra las dos fosfolipasas presentes en el medio extracelular de Tetrahymena. Este hecho da firmeza a la noción de coadaptación enunciada.

Finalmente, también es notable que las membranas superficiales de Tetrahymena están especialmente empobrecidas en triacilgliceroles (49). Esta observación quizás esté directamente vinculada a la presencia de la triacilglicerol lipasa hallada en este trabajo.

Los mecanismos de enriquecimiento en fosfolípidos han sido objeto de un estudio, en el que se sugiere la posibilidad de una hidrólisis selectiva de los lípidos sensibles a la degradación enzimática (51,144). Las enzimas lipolíticas secretadas, junto con las posiblemente asociadas a la membrana plasmática, podrían participar en dicho mecanismo.

En este trabajo, se describen algunas propiedades de un segundo factor hemolítico no asociado a fosfolipasas presente en el medio extracelular de T.thermophila, entre ellas, la inhibición de este factor por colesterol y su activación por reactivos reductores de grupos tioles. Estos rasgos son comunes a ciertas hemolisinas bacterianas como, por ejemplo, la estreptolisina O, secretada por Streptococcus pyogenes. Se

ha postulado que el colesterol es el receptor en las membranas plasmáticas para estos factores líticos bacterianos (145). El segundo factor hemolítico de Tetrahymena podría ejercer su acción de un modo similar. Nuevamente, nos encontraríamos aquí con un notable ejemplo de adaptación de la composición lipídica de la membrana, ya que como se indicó en la sección 1.4., Tetrahymena ha reemplazado totalmente el colesterol por tetrahymanol (50,146,147), desviándose así de la generalidad de las células eucariotas, en las que el colesterol es un componente invariablemente presente en las membranas celulares (148,149).

Las enzimas lipolíticas secretadas por Tetrahymena probablemente se originan en el sistema lisosomal. Esta afirmación se basa en las siguientes observaciones: a) las propiedades de las enzimas son similares a las demostradas para las actividades lipolíticas lisosomales aisladas de hígado de rata (pH óptimo ácido, independencia de Ca^{++} y Na_2EDTA e inhibición por clorpromazina en el caso de la TG lipasa) (92,93,108,123); b) son secretadas simultáneamente con un conjunto amplio de hidrolasas ácidas cuyo origen lisosomal está firmemente establecido (59); como hemos señalado en la sección 1.5., dichas hidrolasas son liberadas específicamente, es decir, sin pérdida de componentes citoplásmicos, ya que no hay aparición simultánea en el medio de actividad isocitrato dehidrogenasa, una enzima con alta actividad citosólica en Tetrahymena (63); c) la línea celular mutante MS-1, bloqueada en la secreción de hidrolasas ácidas (128), tampoco libera actividades lipolíticas ni actividad citolítica al medio; d) con posterioridad a la publicación de nuestro hallazgo de actividades lipolíticas en el medio de Tetrahymena, Nozawa y colaboradores también dieron cuenta de la presencia de fosfolipasa C y fosfolipasa A_1 liberadas al medio por este ciliado (121); dichos autores no notaron sin embargo, la presencia de triacilglicerol lipasa ni de actividad citolítica. Utilizando técnicas de fraccionamiento celular, aislaron una fracción enriquecida en lisosomas, la cual contenía fosfolipasas A y C ácidas, como las halladas

en el medio. Este trabajo hizo, por consiguiente, innecesario este tipo de estudio en la presente Tesis.

El estudio de las enzimas purificadas proporciona nueva información sobre las mismas y permite reinterpretar datos de investigaciones previas. Así, puede concluirse que, tanto la fosfolipasa A_1 como la TG lipasa, se encuentran en forma de monómeros, a juzgar por la coincidencia entre los M_r obtenidos por filtración en gel con los resultantes de la electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS. En el caso de la fosfolipasa A_1 , el valor de M_r obtenido es cercano al observado para una de las isoenzimas predominantes de fosfolipasa A_1 lisosomal de hígado de rata (108). El aislamiento de la TG lipasa, por otra parte, ha permitido estudiar su inhibición por el detergente Tritón X-100. Esta observación sugiere que los resultados de Arai *et al* sobre la acumulación de DG por acción de enzimas lisosomales sobre fosfolípidos en presencia de detergentes (cf. sección 1.7.6.) puede deberse, al menos en parte, a una inhibición de la degradación de DG por la lipasa.

Las fosfolipasas secretadas pueden jugar un importante rol en la ecología de Tetrahymena. Es conocido el hecho que Amoeba proteus puede alimentarse ingiriendo células de Tetrahymena. Sin embargo, el número de ciliados suministrados debe limitarse estrictamente. En caso contrario, se observa que las amebas aparecen rodeadas de grandes números de estos ciliados y poco después lisan (150). Este efecto puede estar mediado por las fosfolipasas. Análogamente, se ha observado en numerosas especies del género Tetrahymena la capacidad de efectuar histofagia (16). Este es un fenómeno en el cual trozos relativamente grandes de tejidos extraídos de diversos animales desaparecen rápidamente al ser expuestos a suspensiones de estos organismos. Tetrahymena también puede presentar un modo de vida parasitario (véase sección 1.6.). Atacan especialmente larvas acuáticas de insectos, siendo las infecciones con frecuencia letales (16). Nuevamente, la secreción de fosfolipasas citolíticas puede dar cuenta de la destrucción del hospedador. Es sugestivo que las infecciones

de gasterópodos por T.limacis son benignas. Estos hospedadores tienen también fosfolípidos en sus membranas (51), los cuales podrían ejercer un rol de defensa contra las fosfolipasas de Tetrahymena, similar al propuesto para los fosfolípidos de estos ciliados.

En su forma de vida libre, T.thermophila se encuentra en una gran variedad de habitats, pero, con mayor frecuencia en medios de agua dulce y ricos en detritos (16,60). Se ha considerado frecuentemente a esta especie como un filtrador, que se alimenta especialmente de bacterias. Sin embargo, se ha establecido que este organismo posee en realidad dos sistemas independientes y prácticamente suficientes en sí mismos para la incorporación de nutrientes: el sistema de vacuolas alimenticias y los sistemas de transporte de la membrana plasmática (34,151,152,153). La capacidad de este último sistema fue fehacientemente demostrada utilizando mutantes incapaces de formar vacuolas alimenticias. Estos pueden crecer y multiplicarse casi tan rápido como las células de tipo salvaje, cuando se les suministran únicamente nutrientes de bajo peso molecular en un medio químicamente definido (153). El mantenimiento de este sistema de transporte reclama la presencia de un sistema complementario capaz de dar lugar a compuestos de bajo peso molecular, a partir de las complejas moléculas del medio. El conjunto de hidrolasas secretadas complementaría así el rol nutricional de la membrana plasmática. Debido a su corto tiempo de generación (4,5), Tetrahymena tiene la potencialidad de dar lugar a altas concentraciones de células cuando llega a ambientes que ofrecen las condiciones adecuadas. Es importante destacar las recientemente descubiertas respuestas quimiotácticas de Tetrahymena, que le permitirían localizar microambientes con abundancia de nutrientes (154). En éstos, Tetrahymena puede reproducirse y, al alcanzar altas densidades, dar lugar a la acumulación de enzimas secretadas, resultando en actividades hidrolíticas significativas en tales ambientes. En la sección 3.7 de esta Tesis utilizamos cultivos de Tetrahymena en medio PPY como modelos de esta

situación, para investigar el rol de las fosfolipasas secretadas en la nutrición. Los resultados obtenidos permiten extraer las siguientes conclusiones:

a) Tanto para DIII como para NP1, se observa degradación más intensa de PC en presencia de mayores concentraciones de enzimas extracelulares (las acumuladas durante 24 h, en contraste con las acumuladas sólo durante el tiempo de incubación, para el caso de las células lavadas), lo cual es una demostración directa de un rol efectivo en la degradación de fosfolípidos para estas enzimas.

b) La formación de vacuolas ejerce un importante rol en la incorporación de fosfolípidos. Sin embargo, dado que el mutante NP1 también los incorpora en una proporción elevada, los fosfolípidos o sus productos de degradación pueden ser tomados activamente a través de la membrana plasmática.

c) Tanto en el tipo salvaje como en el mutante, la mayor parte de la radiactividad, suministrada como [1-¹⁴C] ácido palmítico esterificando la posición sn-2 en una molécula de PC, se recupera como TG. Este resultado coincide con las observaciones de Nozawa y colaboradores que, para este proceso, proponen una vía consistente en la degradación lisosomal de PC a MG, compuesto relativamente polar, que puede ser transferido de los lisosomas a otros sistemas de membranas celulares, donde es reesterificado a TG (122). Este proceso puede explicar los hallazgos de nuestro estudio en el tipo salvaje, donde los lípidos han sido incorporados a vacuolas alimenticias. Sin embargo, el hecho que el mutante NP1 muestre también acumulación de radiactividad en TG, así como también, cierta acumulación de productos de degradación de PC, como LPC, DG y MG, indica que la PC originalmente suministrada ha sido degradada también en el mutante, es decir, aún en ausencia de vacuolas alimenticias. La degradación en este caso puede estar a cargo de las enzimas secretadas y también de fosfolipasas ubicadas sobre la membrana plasmática. En efecto, se ha detectado la presencia de diversas hidrolasas ácidas sobre la membrana de Tetrahymena, tales como peptidasas (64), proteasas (65), β -hexosaminidasa

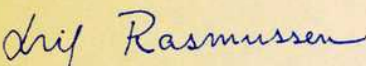
(66) y fosfatasa ácida (Florin-Christensen et al, observaciones no publicadas). La actividad de estas enzimas en la superficie puede demostrarse en forma simple en células intactas, pues los sustratos y productos no permean la membrana celular. Este no es el caso de las fosfolipasas. Sin embargo, los resultados obtenidos estudiando la acción hemolítica de suspensiones celulares sugieren fuertemente que Tetrahymena lleva sobre su superficie también fosfolipasas. Thompson (119) ha provisto evidencias en el mismo sentido.

d) El análisis de los lípidos celulares en este experimento muestra que una fracción de PC se recupera como tal, tanto en DIII como en NP1. Esto sugiere que el fosfolípido puede incorporarse a las membranas directamente, quizás por inserción de moléculas en forma de monómeros disueltos, o por fusión de liposomas con la membrana plasmática. Además, cuando por eliminación de las fosfolipasas extracelulares acumuladas, se observa un aumento de la PC intacta, también se obtiene un aumento de radiactividad asociada a PE + AEPL. Este resultado puede reflejar la operación de un ciclo de deacilación-reacilación, como el que ha sido demostrado en relación a otros fenómenos en la misma célula (155-158). Dicho ciclo daría lugar al intercambio de ácidos grasos entre los distintos fosfolípidos de las membranas.

Como acabamos de ver, los ciliados no son los únicos organismos que poseen fosfolípidos. Dos importantes phyla, los moluscos y los celenterados, comparten esta peculiaridad (51,53,159). Al igual que Tetrahymena, los integrantes de estos phyla exponen sus membranas celulares sin protección al medio ambiente (160). También lo hacen hacia sus cavidades digestivas (161). Frecuentemente, los epitelios que rodean las cavidades digestivas poseen cilias y células capaces de efectuar fagocitosis, por lo cual parece necesario el contacto directo de sus respectivas membranas con los líquidos contenidos en estas cavidades. Investigaciones sobre la posible presencia de fosfolipasas citolíticas en las secreciones digestivas de estos organismos podría poner en evidencia un paralelismo con el sistema fosfolipasas-fosfono-

lípidos que hemos hallado en Tetrahymena. Esto proporcionaría una clave para la comprensión del rol general desempeñado por los fosfolípidos en la Naturaleza.


Jorge Florin-Christensen


Leif Rasmussen, dr.phil.

5. Referencias

1. Lwoff, A. C.R. Acad. Sci., Paris 176: 928-930, 1923.
2. Kidder, G.W. & Dewey, V.C. en "Biochemistry and physiology of Protozoa" (ed. A. Lwoff), pp. 323-400, Academic Press, NY, 1951.
3. Holz, G.G. en "Biology of Tetrahymena" (ed. A.M. Elliot), pp. 89-98, Dowden, Hutchinson & Ross, Inc., Stroudsburg, 1973.
4. Prescott, D.M. Physiol. Zool. 31: 111-117, 1958.
5. Cameron, I.L. en "Biology of Tetrahymena" (ed. A.M. Elliot), pp. 199-226, Dowden, Hutchinson & Ross, Inc. Stroudsburg, 1973.
6. Orias, E. & Bruns, P.J. en "Methods in Cell Biology" (ed. D.M. Prescott), vol. 10, pp. 247-282, Academic Press, NY, 1975.
7. Bruns, P.J. & Brussard, T.E.B. Science 213: 549-551, 1981
8. Zeuthen, E. Exp. Cell Res. 68: 49-60, 1971.
9. Zeuthen, E. en "Advances in Cell Biology" (ed. D.M. Prescott, L. Goldstein & E. McConkey) vol.2, pp. 111-152, Appleton-Century-Crofts, NY, 1971.
10. Zeuthen, E. & Rasmussen, L. en "Research in Protozoology" (ed. T.-T. Chen) vol.a4, pp. 9-195, Pergamon Press, NY, 1972.
11. Suhr-Jessen, P. "Model Systems in Cell Biology", Odense University, Denmark, 1982.
12. Nozawa, Y. en "Methods in Cell Biology" (ed. D.M. Prescott) vol.10, pp. 105-133, Academic Press, NY, 1975.
13. Levine, N.D. & Corliss, J.O. J. Protozool. 27: 37-58, 1980.

14. Kudo, R.R. "Protozoología", Compañía Editorial Continental, S.A., México, 1969.
15. Corliss, J.O. Proc. Soc. Protozool. 3: 4, 1952.
16. Corliss, J.O. en "Biology of Tetrahymena" (ed. A.M. Elliott), pp. 1-55, Dowden, Hutchinson & Ross, Inc., 1973.
17. Nanney, D.L. & McCoy, J.W. Trans. Am. Microsc. Soc. 95: 664-682, 1976.
18. Corliss, J.O. Parastology 43: 49-87, 1953.
19. Corliss, J.O. Parasitology 50: 111-153, 1960.
20. Elliott, A.M. & Kennedy, J.R. en "Biology of Tetrahymena" (ed. A.M. Elliott), pp. 57-87, Dowden, Hutchinson & Ross, Inc., Stroudsburg, 1973.
21. Orias, E. & Pollock, N.A. Exp. Cell Res. 90: 345-357, 1975
22. Hill, D.L. "The Biochemistry and Physiology of Tetrahymena", pp. 1-20, Academic Press, NY, 1972.
23. Hausmann, K. Int. Rev. Cytol. 52: 197-276, 1978.
24. Satir, B., Schooley, C. & Satir, P. J. Cell Biol. 56: 153-176, 1972.
25. Satir, B., Schooley, C. & Satir, P. Nature 235: 53-54, 1972
26. Orias, E., Flacks, M. & Satir, B. J. Cell Sci. 64: 49-67, 1983.
27. Zebrun, W., Corliss, J.O. & Lom, J. Trans. Amer. Microsc. Soc. 86: 28-36, 1967.
28. Tiedtke, A. Naturwissenschaften 63: 93-94, 1976.
29. Allen, R.D. J. Protozool. 14: 553-565, 1967.
30. Satir, B. & Wissig, E. J. Cell Sci. 55: 13-33, 1982.

31. Nilsson, J.R. & v.Deurs, B. J. Cell Sci. 63: 209-222, 1983
32. Elliott, A.M. Science 149: 640-641, 1965.
33. Müller, M. J. Cell Biol. 52: 478-487, 1972.
34. Rasmussen, L., Carlsberg Res. Commun. 41: 145-167, 1976.
35. Nilsson, J. J. Protozool. 34: 1-7, 1987.
36. Allen, R.D. & Fok, A.K. J. Cell Biol. 97: 566-570, 1983.
37. Elliott, A.M. & Clemmons, G.L. J. Protozool. 13: 311-323, 1966.
38. Baer, E. & Stanacev, N.Z. J. Biol. Chem. 239: 3209-3214, 1964.
39. Horiguchi, M. & Kandatsu, M. Nature 184: 901, 1959.
40. Kandatsu, M. & Horiguchi, M. Agr. Biol. Chem. 26: 721-722, 1962.
41. Liang, C.R. & Rosenberg, H. Biochim. Biophys. Acta 125: 548-562, 1966.
42. Sugita, M., Fukunaga, Y., Ohkawa, K., Nozawa, Y. & Hori, T. J. Biochem. 86: 281-188, 1979.
43. Rosenthal, A.F. & Pousada, M. Biochim. Biophys. Acta 164: 226-237, 1968.
44. Thompson, G.A., Jr. Biochim. Biophys. Acta 176: 330-338, 1969.
45. Berger, H., Jones, P. & Hanahan, D.J. Biochim. Biophys. Acta 260: 617-629, 1972.
46. Pagano, R.E. & Sleight, R.G. TIBS Trends Biochem. Sci. 10: 421-425, 1985.
47. Kennedy, K.E. & Thompson, G.A., Jr. Science 168: 989-991, 1970.

48. Smith, J.D., Snyder, W.R. & Law, J.H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 39: 1163-1169, 1970.
49. Nozawa, Y. & Thompson, G.A., Jr. *J. Cell Biol.* 49: 722-730, 1971.
50. Nozawa, Y. & Thompson, G.A., Jr. en "Biochemistry and Physiology of Protozoa" (ed. M. Levandowsky & S.H. Hutner) vol II, pp. 275-338, Academic Press, NY, 1979.
51. Hori, T. & Nozawa, Y. en "New Comprehensive Biochemistry" (ed. J.N. Hawthorne & G.B. Ansell) vol. 4, pp. 95-128, Elsevier, Amsterdam 1982.
52. Mangnall, D. & Getz, G.S. en "Lipids and Biomembranes of Eukaryotic Microorganisms" (ed. J.A. Erwin), cap.3, Academic Press, NY, 1973.
53. Hildebrand, R.L. & Henderson, T.O. en "The Role of Phosphonates in Living Systems" (ed. R.L. Hildebrand), pp. 5-29, CRC Press, Inc., 1982.
54. Trebst, A. & Geike, F. *Z. Naturforsch.* B22: 989-991, 1967.
55. Warren, W.A. *Biochim. Biophys. Acta* 156: 340-346, 1968.
56. Takada, T. & Horiguchi, M. *Biochim. Biophys. Acta* 964: 113-115, 1988.
57. Kates, M. "Techniques of Lipidology: Isolation, analysis and identification of lipids", pp. 115-116, Elsevier, Amsterdam, 1986.
58. Müller, M. en "Chemical Zoology" (ed. Florkin, M. & Scheer, B.T.) vol. 1, Protozoa (ed. K.W. Kidder), pp. 351-380, Academic Press, NY, 1967.
59. Blum, J.J. & Rothstein, T.L. "Lysosomes in Biology and Pathology" (ed. J.T. Dingle & R.T. Dean) p.33-45, North-Holland Publishing Co., Amsterdam, 1975.

60. Nillson, J.R. en "Biochemistry and Physiology of Protozoa" (ed. M. Levandowsky & S.H. Hutner) vol II, pp. 339-379, Academic Press, NY, 1979.
61. Rasmussen, L., Toftlund, H., Florin-Christensen, M. & Florin-Christensen, J. *Experientia* 41: 1593-1594, 1985.
62. Tiedtke, A., Hünseler, P., Florin-Christensen, J. & Florin-Christensen, M. *J. Cell Sci.* 89: 515-520, 1988.
63. Tiedtke, A., Rasmussen, L., Florin-Christensen, J. & Florin-Christensen, M. *J. Cell Sci.* 89: 167-171, 1988.
64. Zdanowsky, M.K. & Rasmussen, L. *Comp. Biochem. Physiol.* 62 A: 331-334, 1979.
65. Eisen, H. & Tallan, J. *Nature* 270: 514-515, 1975.
66. Tiedtke, A. *J. Protozool.* 30: 44A, 1983.
67. Buhse, H.E., Jr. *J. Protozool.* 13: 429-435, 1966.
68. Corliss, J.O. *Trans. Amer. Microsc. Soc.* 91: 566-573, 1972.
69. Corliss, J.O. *J. Protozool.* 1: 156-169, 1954.
70. Corliss, J.O. *J. Protozool.* 17: 198-209, 1970.
71. Elliott, A.M. *J. Protozool.* 17: 162-165, 1970.
72. Thompson, J.C., Jr. *J. Protozool.* 2 (suppl.): 12, 1955.
73. Speidel, C.C. *Biol. Bull.* 115: 366, 1958.
74. Corliss, J.O. *Parasitology* 50: 111-153, 1960.
75. Brooks, W.M. *Hilgardia* 39: 205-276, 1958.
76. van den Bosch, H. en "Phospholipids" (ed. J.N. Hawthorne & G.B. Ansell) cap. 9, Elsevier, Amsterdam, 1982.

77. Dennis, E.A. en "The Enzymes" (ed. P.D. Boyer) vol. XVI, cap. 9, Academic Press, Inc., NY, 1983.
78. van den Bosch, H. *Biochim. Biophys. Acta* 604: 191-246, 1980.
79. van den Bosch, H., Aarsman, A.J. & van Deenen, L.L.M. *Biochim. Biophys. Acta* 348: 197-209, 1974.
80. Scandella, C.J. & Kornberg, A. *Biochemistry* 10: 4447-4456, 1971.
81. Doi, O. & Nojima, S. *J. Biochem. Tokyo* 667-674, 1973.
82. Okumura, T., Kimura, S. & Saito, K. *Biochim. Biophys. Acta* 617: 264-273, 1980.
83. Habermann, E. *Science* 177: 314-322, 1972.
84. Rasmussen, H. *New Engl. J. Med.* 314: 1164-1170, 1986.
85. Burgoyne, R.D., Cheek, T.R. & O'Sullivan, A.J. *TIBS Trends Biochem. Sci.* 12: 332-333, 1987.
86. van Kuijk, F.J.M., Sevanian, A., Handelsman, G.J. & Dratz, E.A. *TIBS Trends Biochem. Sci.* 12: 31-34, 1987.
87. van den Bosch, H. & Aarsman, A.J. *Agents and Actions* 9: 382-389, 1979.
88. Macfarlane, M.G. & Knight, B.C.J. *Biochem. J.* 85: 884-902, 1941.
89. Takahashi, T., Sugahara, T. & Ohsaka, Y. *Methods in Enzymology* 71: 710-725, 1981.
90. Little, C. & Otnaess, A.-B. *Biochim. Biophys. Acta* 391: 326-330, 1975.
91. Zwaal, R.F.A., Roelofsen, B., Comfurius, P. & van Deenen, L.L.M. *Biochim. Biophys. Acta* 233: 474-479, 1971.

92. Matsuzawa, Y. & Hostetler, K.Y. J. Biol. Chem. 255: 646-652, 1980.
93. Hostetler, K.Y. & Hall, L.B. Biochem. Biophys. Res. Commun. 96: 338-393, 1980.
94. Hokin, L.E. Ann. Rev. Biochem. 54: 205-235, 1985.
95. Sekar, M.C. & Hokin, L.E. J. Membrane Biol. 89: 193-210, 1986.
96. Berridge, M.G. Ann. Rev. Biochem. 56: 159-191, 1987.
97. Ferguson, M.A.J., Haldar, K. & Cross, G.A.M. J. Biol. Chem. 260: 4963-4968, 1985.
98. Low, M.G., Ferguson, M.A.J., Futerman, A.H. & Silman, I. TIBS Trends Biochem. Sci. 11: 212-215, 1986.
99. Yang, S.F., Freer, S. & Benson, A.A. J. Biol. Chem. 242: 477-484, 1967.
100. van Deenen, L.L.M., Demel, R.A., Geurts van Kessel, W.S.M., Kamp, H.H., Roelofsen, B., Verkleij, A.J., Wirtz, K.W.A. & Zwaal, R.F.A. en "The Structural Basis of Membrane Function" (ed. Y. Hatefi & L. Djavadi-Ohanian) pp. 21-38, Academic Press, NY, 1976.
101. Zwaal, R.F.A., Roelofsen, B., Comfurius, P. & van Deenen, L.L.M. Biochim. Biophys. Acta 406: 83-96, 1975.
102. Houslay, M.D. & Stanley, K.K. "Dynamics of Biological Membranes: Influence on Synthesis, Structure and Function", cap.4, John Wiley & sons, Chichester, 1983.
103. Devaux, P.F., Cribier, S., Favre, E., Fellmann, P., Hervé, P., Seigneuret, S. & Zachowski, S. en "Biomembrane and Receptor Mechanisms" (ed. E. Bertoli, D. Chapman, A. Cambria & U. Scapagnini), Fidia Research Series, vol.7, pp.69-75, Liviana Press, Padova, 1987.

104. Demel,R.A., Geurts van Kessel,W.S.M., Zwaal,R.F.A., Roelofsen,B. & van Deenen,L.M. *Biochim. Biophys. Acta* 406: 97-107, 1975.
105. Mellors,A. & Tappel,L. *J. Lipid Res.* 8: 479-484, 1967.
106. Fowler,S. & de Duve,C. *J. Biol. Chem.* 244: 471-481, 1969.
107. Franson,R., Waite,M. & La Via,M. *Biochemistry* 10: 1942-1946, 1971.
108. Hostetler,K.Y., Yazaki,P.J. & van den Bosch,H. *J. Biol. Chem.* 257: 13367-13373, 1982.
109. Irvine,R.F., Hemington,N. & Dawson,R.M. *Biochem. J.* 176: 475-484, 1978.
110. Richards,D.E., Irvine,R.F. & Dawson,R.M. *Biochem. J.* 182: 599-606, 1979.
111. Matsuzawa,Y. & Hostetler,K.Y. *J. Biol. Chem.* 255: 646-652, 1980.
112. Beaudet,A.L., Hampton,M.S., Patel,K. & Sparrow,J.J. *Clin. Chim. Acta* 102: 403-414, 1980.
113. Huterer,S., Wherrett,J.R., Poulos,A. & Callahan,J.W. *Neurology (NY)* 33: 67-73, 1983.
114. Huterer,S. & Wherrett,J.R. *Biochim. Biophys. Acta* 794: 1-8, 1984.
115. Wherrett,J.R. & Huterer,S. *Neurochem. Res.* 8: 89-98, 1983.
116. Kunze,A., Hesse,B. & Bohn,E. *Biochim. Biophys. Acta* 711: 10-18, 1982.
117. Eichel,H.J. *Biochim. Biophys. Acta* 43: 364-366, 1960.
118. Thompson,G.A.,Jr. *J. Protozool.* 16: 397-400, 1969.

119. Thompson, G.A., Jr, Bambery, R.J. & Nozawa, Y. *Biochemistry* 10: 4441-4447, 1971.
120. Arai, H., Inoue, K., Natori, Y., Banno, Y., Nozawa, Y. & Nojima, S. *J. Biochem.* 97: 1525-1532, 1985.
121. Arai, H., Inoue, K., Nishikawa, K., Banno, Y., Nozawa, Y. & Nojima, S. *J. Biochem.* 99: 125-133, 1986.
122. Arai, H., Nishikawa, K., Inoue, K., Nozawa, Y. & Nojima, S. *J. Biochem.* 101: 1059-1067, 1987.
123. Gurr, M.I. & James, A.T. "Lipid Biochemistry: An Introduction", cap.3., Chapman and Hall, London-New York, 1980.
124. Hayase, K. & Tappel, A.L. *J. Biol. Chem.* 245: 169-175, 1970.
125. Ruth, R.C., Owens, K. & Weglicki, W.B. *J. Pharmacol. Exptl. Ther.* 212: 361-367, 1980.
126. Jensen, G.L., Baly, D.L., Brannon, P.M. & Bensadoun, A. *J. Biol. Chem.* 255: 11141-11148, 1980.
127. Debeer, L.J., Thomas, J., De Schepper, P.J. & Mannaerts, G.P. *J. Biol. Chem.* 254: 8841-8846, 1979.
128. Hünseler, P., Schidgen-Kleyboldt, G. & Tiedtke, A. *J. Cell Sci.* 88: 47-55, 1987.
129. Plesner, P., Rasmussen, L. & Zeuthen, E. en "Synchrony in Cell Division and Growth" (ed. E. Zeuthen), pp. 543-563, Interscience Publishers, NY, 1964.
130. Rasmussen, L. & Modeweg-Hansen, L. *J. Cell Sci.* 12: 275-280, 1973.
131. Bligh, E.G. & Dyer, W.J. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 911-917, 1959.
132. Nilsson-Ehle, P. & Ekman, R. *Artery* 3: 194-209, 1977.

133. Hoelzl, J. & Wagner, H. J. Lip. Res. 7: 569-570, 1966.
134. Christie, W.W. "Lipid Analysis", cap.10, Pergamon Press, Oxford, 1982.
135. Ames, B.N. Methods in Enzymology, vol.8, pp.115-118, 1966.
136. Kates, M. "Techniques of Lipidology", cap.4, Elsevier, Amsterdam, 1986.
137. Shaltiel, S. Methods in Enzymology, vol.34:126-139, 1974
138. Laemmli, U.K. Nature 227: 680-685, 1970.
139. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. J. Biol. Chem. 193: 265-275, 1951.
140. Kurioka, S. & Matsuda, M. Analyt. Biochem. 75: 281-289, 1976.
141. Dickie, N. & Liener, I.E. Biochim. Biophys. Acta 64: 41-51, 1962.
142. Avigad, G. en "Mechanisms of Bacterial Toxinology" (ed. A.W. Beinheimer), cap.5, John Wiley & Sons, NY, 1976.
143. Colley, C.M., Zwaal, R.F.A., Roelofsen, B. & van Deenen, L.L.M. Biochim. Biophys. Acta 307: 74-82, 1973.
144. Thompson, G.A., Jr. Biochemistry 8: 2015-2022, 1967.
145. Alouf, J.E. & Geoffroy, C. en "Bacterial Protein Toxins" (ed. J.E. Alouf, F.J. Fehrenbach, J.H. Freer & J. Jeljaszewicz), pp. 165-171, Academic Press, NY, 1984.
146. Holz, G.G. & Conner, R.L. en "Biology of Tetrahymena" (ed. A.M. Elliott), cap.4, Dowden, Hutchinson & Ross, Inc., Stroudsburg, 1973.
147. Thompson, G.A., Jr. & Nozawa, Y. Ann. Rev. Microbiol. 26: 249-278, 1971.

148. Kates, M. "Techniques of Lipidology", cap. 1, Elsevier, Amsterdam, 1986.
149. Houslay, M.D. & Stanley, K.K. "Dynamics of Biological Membranes", cap. 1, John Wiley & Sons, NY, 1983.
150. Griffin, J.L. en "The Biology of Amoeba" (ed. K.W. Jeon), pp. 83-98, Academic Press, NY, 1973.
151. Hoffmann, E.K. & Rasmussen, L. Biochim. Biophys. Acta 226: 206-216, 1972.
152. Hoffmann, E.K., Rasmussen, L. & Zeuthen, E. Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg 38: 133-143, 1970.
153. Rasmussen, L. & Orias, E. Science 190: 464-465, 1975.
154. Leick, V. & Hellung-Larsen, P. J. Protozool. 32: 550-553, 1985.
155. Dickens, B.F. & Thompson, G.A., Jr. Biochemistry 21: 3604-3611, 1982.
156. Ramesha, C.S., Dickens, B.F. & Thompson, G.A., Jr. Biochemistry 21: 3618-3622, 1982.
157. Kameyama, Y., Yoshioka, S. & Nozawa, Y. Biochim. Biophys. Acta 793: 28-33, 1984.
158. Lynch, D.V. & Thompson, G.A., Jr. TIBS Trends Biochem. Sci. 9: 442-445, 1984.
159. Kittredge, J.S. & Roberts, E. Science 164: 37-42, 1969.
160. Rosenberg, H. en "Form and Function of Phospholipids" (BBA Library, vol. 3) (ed. G.B. Ansell, R.M.C. Dawson & J.N. Hawthorne), pp. 333-344, Elsevier, Amsterdam, 1973.
161. Eckert, R. & Randall, D. "Animal Physiology", cap. 15, W.H. Freeman and Company, San Francisco, 1983.

1
2
3
4