

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Medir semicuantitativamente los niveles de RNAm del gen de la fosfolipasa A2 (sPLA2) de *Toxoplasma gondii* en estadio de taquizoitos con relación a un gen transcripción constitutiva (β -Tubulina).

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Amplificar el gen de la fosfolipasa sPLA2 a partir de ADN genómico de *Toxoplasma gondii*.

Realizar ensayos de RT-PCR para el gen de la fosfolipasa A2 secretoria (sPLA2) en *Toxoplasma gondii*.

Determinar la localización física de la fosfolipasa A2 (sPLA2) en el genoma de *Toxoplasma gondii*.

2. MARCO TEORICO

2.1 GENOMICA DE *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii contiene un genoma nuclear de 87Mb repartidos en 13 cromosomas bien definidos (<http://www.toxodb.org/>) (12), un genoma mitocondrial de 6Kb, y un genoma del apicoplasto de 35Kb (13). Análisis poblacionales por medio de polimorfismos en nucleótidos han dividido la especie en tres linajes clónales que corresponden a diferencias fenotípicas, estos fueron definidos como linajes clonales I, II y III (14). Los aislados del parásito de tipo II en su mayoría fueron aislados de humanos (14), por contraste el linaje tipo I se encontró en infecciones agudas en ratón (15). Estos tres linajes son el resultado de un efecto en “cuello de botella” que ha mantenido limitada la recombinación sexual y la propagación en carnívoros (14). El genoma nuclear de *Toxoplasma gondii* es haploide en la mayor parte del ciclo de vida del parásito, menos en el gato que presenta una fase diploide antes de la meiosis (16).

Los 13 cromosomas bien definidos que tiene el parásito muestran que son muy estables y con muy poca variación con respecto al tamaño de los tres tipos establecidos (17). En cuanto a la expresión genética, el parásito está transcripcionalmente regulado (17). Por medio de esta estrategia se han comparado cepas del parásito en diferentes momentos del ciclo vital y se han visto diferencias entre la infección aguda y crónica por lo que se observaron diferencias en la expresión genética (18).

2.2 FOSFOLIPASA A2 (PLA2)

La fosfolipasas A2 (PLA2) consisten en una superfamilia de enzimas definidas por su habilidad de catalizar la hidrólisis de los enlaces (sn-2) ester en glicerofosfolipidos (19). Los productos de la hidrólisis de la reacción de la PLA2 son ácidos grasos y lisofosfolipidos (20). Los ácidos grasos liberados por las PLA2 son semejantes al ácido araquidonico (A.A) y al ácido oleico (O.A), que son importantes en el liberamiento de energía, pero más importante es el A.A que funciona como un mensajero secundario (21-22) y como el precursor de eicosanoides, el cual es un potente mediador de inflamación y señales de transducción (22-23). Otro producto de la acción de la PLA2 son los lisofosfolipidos importantes en la señalización celular, remodelando fosfolipidos y perturbando la membrana (24-25). Figura. 1.

0

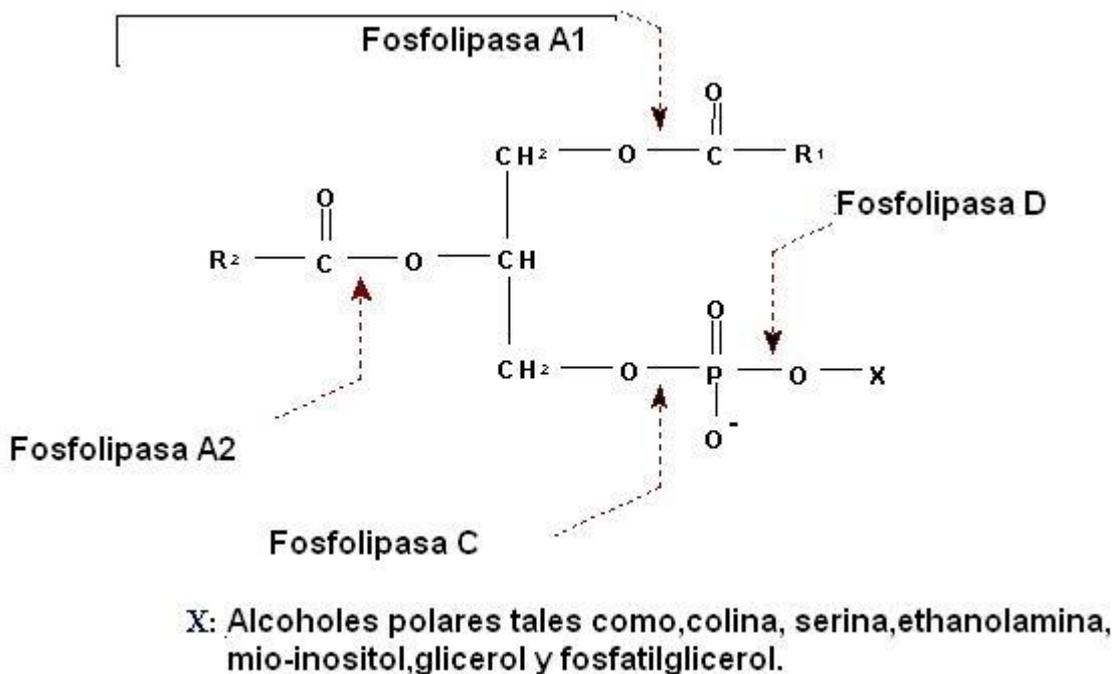


Figura. 1. Especificidad de los diferentes tipos de Fosfolipasas.

La actividad enzimática de la PLA2 fue estudiada en 1890 usando veneno proveniente de cobras (26) Una PLA2 con propiedades similares fue encontrada en grandes cantidades en páncreas de porcinos (27); varias investigaciones definieron que esta pequeña PLA2 secretada es dependiente de Ca^{2+} (19). A través de los años más PLA2 fueron descubiertas en veneno y jugos pancreáticos de varios animales y estas enzimas fueron inicialmente divididas en dos grupos, basados en la posición de sus anillos disulfuro y en un único "loops" y extensiones (28-29-30).

Las fosfolipasa conforman una gran familia de enzimas con una amplia gama de funciones fisiológicas y patológicas tales como la digestión de alimentos la fertilización, los efectos neurotóxicos, la actividad bacteriana, y la señalización celular (31). En 1997 se hizo una clasificación de las PLA2 basadas en las secuencias de los genes y desde entonces se han identificado nuevos grupos de PLA2: el grupo X y la acetilhidrolasa, que es un nuevo factor activador de plaquetas (PAF) (32). También es reciente la descripción del grupo VIIB y dos nuevas formas del grupo IV denominadas β - γ , que han sido clasificadas como grupos IVB y IVC. Si en lugar de utilizar las secuencias del gen que codifica cada una de ellas se tienen en cuenta sus propiedades biológicas la clasificación de las PLA2 se simplifica en dos principales grupos: secretorias y no secretorias y estas a su vez se pueden clasificar en citosolicas calcio dependiente (cPLA2 Ca dependiente) y las intracelulares calcio independientes (grupo IV) (33). Existe otra clase de PLA2 llamadas PAF acetilhidrolasas, las cuales parecen actuar sobre el PAF y en la oxidación de lípidos (31) La superfamilia de las fosfolipasas también se pueden clasificar en dos categorías generales. La primera categoría corresponde a las enzimas histinas que son secretadas, poseen un gran numero de enlaces disulfuros, con requerimientos de Ca^{2+} para realizar la catálisis y poseen un par His/Asp en su sitio de catálisis; esta categoría posee siete grupos de distintas enzimas (19). La segunda categoría son las enzimas serinas compuestas por cuatro grupos de

enzimas que no requieren Ca^{2+} y poseen una serina en su sitio de catálisis La clasificación de estos grupos se muestra en las Tablas 1 y 2. (19).

Las PLA2 de tipo secretorio (sPLA2) son de baja masa molecular de ≈ 14 a 18 Kda con una estructura terciaria muy rígida debido a la presencia de 5 a 8 enlaces disulfuros (34) Esto le confiere a la enzima, estabilidad contra proteólisis y resistencia a la desnaturalización, lo cual permite retener su actividad en el fluido extracelular donde ellas actúan. Estas PLA2 muestran similitud estructural y están ligadas evolutivamente. Estructuralmente las PLA2 de baja masa molecular comparten el mismo tipo de hélice α , amino terminal anfipático, un mismo sitio de unión al Ca^{2+} y un mismo sitio activo, el cual incluye una triada catalítica clásica de serina esterasa en la que se encuentran puentes de disulfuro. Las sPLA2 son relativamente termoestables y necesitan concentraciones de Ca^{2+} a nivel mM para su actividad (20-34).

Estudios enzimológicos han demostrado que las sPLA2 no forman el intermedio acil característico de las esterases, pero utilizan la histidina como sitio activo, acompañado de una asparagina a fin de polarizar un enlace de agua el cual ataca el grupo carbonilo (20).

2.3 ESTRUCTURA DEL GEN FOSFOLIPASA A2

En humanos y en rata se han encontrado genes codificadores de PLA2, las cuales han sido clonadas y secuenciadas; en ambas especies se encontró solo una copia por genoma haploide, utilizando el análisis de Southern blot (32-33). Estos genes contienen 5 exones que codifican entre 124 y 125 aminoácidos en proteínas humanas y de rata respectivamente (34). Estas secuencias son precedidas por unos 20 a 21 aminoácidos iniciando con un péptido (Metionina), el cual posiblemente representa señales de secuencia que median la translocación de las proteínas a través de las membranas microsomales (35), la maduración del grupo II de la sPLA2 de humano y de rata presentan una

homología del 71% en los niveles de nucleótidos y de 67% en los niveles de aminoácidos y ambas enzimas poseen aproximadamente 30% de homología con aminoácidos con las respectivas enzimas pancreáticas (36). En contraste con la PLA2 de tipo pancreático, el grupo II de las PLA2 no es una proenzima segmentada, indicando que esta enzima no es almacenada y secretada en forma zimogena, como es requerida para la activación proteolítica. La estructura exón-intrón de los clones genómicos del grupo II de la PLA2 de humano y de rata es muy similar. El intrón 1, 2 y 3 del gen de rata es similar en longitud a este gen de humano. En contraste, el intrón 4, el cual interrumpe la codificación de la treonina (residuo 79), es 1,6kb más corto a la parte correspondiente del gen humano (34).

La posición de los intrones 2, 3 y 4 es precisamente la misma en ambas secuencias de cDNA en rata y humano (37). El sitio de iniciación de la transcripción del gen de rata fue tentativamente determinado 62pb por encima del codón de iniciación de traducción. Una secuencia TATA-like (TATTTAA) fue encontrada por encima desde el sitio de inicio del mRNA en ambos promotores humanos y de rata (38). También presenta otras secuencias homólogas a las cajas CAAT promotoras en rata (CCAT) y humano (CCAAT). Sin embargo, los genes promotores de rata y de humano codificadores del grupo II PLA2 contienen varios elementos oligonucleotídicos homólogos a secuencias consenso para el enlace de los factores de transcripción que posiblemente se involucran en la inducción de los genes para citoquinas y otros componentes (34). Esta incluye dos copias de activador de proteína-2 (AP-2) el cual es un sitio de enlace a un elemento glucocorticoide reconocido y un elemento regulador de fase aguda. (37-39).

2.4 REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GRUPO II DE LAS FOSFOLIPASAS

El grupo II PLA2 se almacena en gránulos secretorios de plaquetas, mastocitos y neutrófilos; estas se liberan rápidamente, en segundos o minutos, bajo estimulación de Ca^{2+} movilizando a su vez a las trombinas, ADP, A23187, o FMLP (34). En contraste, los trabajos en la regulación de la expresión del grupo II de las PLA2 han encontrado una variedad de citocinas que pueden modular la síntesis y expresión del gen de la sPLA2 en largos periodos de tiempo (horas o días) en varios sistemas celulares (37).

Los factores que estimulan la expresión del gen son las citocinas inflamatorias como las interleucinas (IL) 1α , 1β , y el factor de necrosis tumoral- α ($\text{TNF}\alpha$). La incubación de células con estas citocinas induce una síntesis potenciada y la secreción de prostaglandinas y de PLA2. Esto sugiere que es dependiente del tiempo de secreción (34). La adición de actinomicina D o cicloheximida suprime completamente la expresión, así como también la secreción de citocinas estimulantes de la expresión del gen de PLA2 y la subsecuente síntesis de prostaglandinas que indican el desarrollo y síntesis del RNA con producción de la proteína en estos procesos (40). El análisis por Western blot y por Northern blot revela que la cantidad de proteínas PLA2 del grupo II y su mRNA incrementa masivamente en células expuestas a citocinas (40-41). La respuesta de la estimulación con $IL-1\alpha$ es dosis dependiente cuando se aplica junto con $\text{TNF}\alpha$, con una respuesta sinérgica fuerte en los niveles de mRNA en las PLA2 y en una actividad de síntesis observada (39-41). Esto sugiere que existe un orden específico en los mecanismos moleculares para los incrementos en los niveles de mRNA, en las PLA2 del grupo II mediado por citocinas (34).

El control de transcripción en la respuesta inflamatoria por citocinas ha sido intensamente estudiado, y estas han venido aclarando que un numero factores

de transcripción son ubicados en muchos sistemas celulares diferentes, precisamente unos de estos factores es NF- κ B un factor de transcripción con multi-subunidades que es activada en respuesta a IL-1 β , TNF α , endotoxinas bacteriales y otros varios estímulos, los cuales juegan un papel importante en el desarrollo de la inmunidad celular y la respuesta inflamatoria (42).

La expresión del gen de la sPLA2 del grupo II por IL-1 β y TNF α es fuertemente suprimido por PDTC en manera dosis-dependiente, sugiriendo que el NF κ B, coopera con otros factores de transcripción. El NF κ B esta envuelto en la regulación de la transcripción del gen del grupo II de la PLA2 en la señalización celular. En contraste la expresión de las cAMP-activas del gen del grupo II de las PLA2 no es afectada por el PDTC, indicando que las cAMP se activa con otros factores nucleares, mas probablemente las CREB, o relacionado con proteínas AP-2. Esto es particularmente importante porque esto se observa en células del mieloma humano que pueden activar las cAMP y NF κ B (43).

2.5 FOSFOLIPASA A2 EN TOXOPLASMA

Las PLA2 favorecen los procesos de invasión de varios microorganismos tales como *Tripanosoma*(44), *Entamoeba*(7). Se ha demostrado que la utilización de inhibidores de la PLA2 disminuye la infección por *Toxoplasma gondii* en una línea de fibroblastos humanos (8).

Las sPLA2 tipo IIA participan en el proceso de invasión de *Toxoplasma gondii*.(20) Probablemente su acción ocurre por fluidificación de la membrana o por la inducción de la expresión de ciertos receptores de membrana, necesarios para la adhesión del parásito a la célula hospedera. De otro lado, *Toxoplasma gondii* reduce la expresión de las cPLA2 en las fracciones citosolicas de las células infectadas y la inhibición de las cPLA2 celulares no disminuye el porcentaje de células parasitadas(45). Por lo tanto, a la diferencia

de procesos de internalización de otros patógenos tales como *Salmonella typhimurium*, la penetración por *Toxoplasma gondii* no implica la cPLA2 celular.

Es entonces evidente que *Toxoplasma gondii* utiliza ciertas funciones celulares (respuesta de las sPLA2) pero de manera diferente a la observada con otros patógenos. Tres isoformas de PLA2 parecen estar presentes en *Toxoplasma gondii*: dos sPLA2 (Tipo IB y IIB), localizadas en los organelos secretorios y una cPLA2 a nivel del citosol y de la membrana perinuclear. Sin embargo sería necesario purificar y caracterizar su actividad enzimática para aclarar sus respectivos papeles. En las células y en los parásitos se podría demostrar si la acción de la cPLA2 parasitaria se realiza a través de la producción de prostaglandinas y si la actividad de la sPLA2 (celular y parasitaria) se pone en marcha por sus prostaglandinas. Para la confirmación de la existencia de diferentes isoformas de sPLA2 en *Toxoplasma gondii* (similares a las que existen en células de mamíferos), se deberá realizar el análisis de sus genes y posteriormente, la purificación y caracterización de las enzimas a partir de los extractos de los parásitos a fin de determinar su estructura.

Los resultados con los anticuerpos anti-sPLA2 tipo IA, IIA y anti-cPLA2, demuestran sitios de reconocimiento particular y aportan una evidencia importante de la existencia de estas diferentes formas. El papel principal de la cPLA2 parasitaria sería la producción de ácido araquidónico que induce un cambio en la simetría de los fosfolípidos de membrana y permite la actividad de sPLA2. La sPLA2 cumpliría a su vez un papel de fluidificación de la membrana de la célula hospedera, facilitando la invaginación y la entrada activa del parásito. El *Toxoplasma gondii* posee una actividad MAP kinasa que puede intervenir en la activación de su propia cPLA2 (9-38).

La actividad de la sPLA2 en *Toxoplasma gondii* obtenida de líquido peritoneal fue medida en condiciones en presencia de 6mM CaCl₂ (2141 ± pmol/min por mg) y en ausencia de calcio (2343 ± 310 pmol/min por mg), donde no se observaron cambios en la actividad de la PLA2 en ausencia de calcio.

Análisis con la técnica de cromatografía de capa fina arrojó resultados en los cuales los niveles de fluorescencia en los sustratos de ambas muestras fueron semejantes, con estos resultados se confirma que *Toxoplasma gondii* no requiere de calcio para su actividad (45).

Trabajos anteriores realizando la sonicación de fracciones de *Toxoplasma gondii* las cuales son inoculadas en células hospederas, revelan una relación entre ácidos grasos y lisofosfolípidos, estos ensayos evidenciaron el incremento de la penetrancia de *Toxoplasma gondii* en las células hospederas, y la implicación de las proteínas de las roptrías en el proceso de invasión (46).

El tratamiento de taquizoitos con inhibidores de fosfolipasa A2 (4-p-bromophenacyl bromide y quinacrine) y con ausencia de calcio en el medio de cultivo revelan la inhibición de la penetración del taquizoito dentro de los macrófagos y disminución del metabolismo del ácido araquidónico, estos experimentos demuestran el papel de la fosfolipasa en el parásito en los procesos de penetrancia y en la movilización del ácido araquidónico desde la membrana fosfolípida de los macrófagos (47).

Seguidamente algunos trabajos examinaron el papel del IFN gamma en líneas celulares de monocitos THP1(8). El estudio verificó el papel de la fosfolipasa secretoria A2 y la relación con la protección inducible del IFN gamma, los resultados sugieren que el IFN gamma se opone a la invasión por *Toxoplasma gondii* suprimiendo la producción en el parásito de la fosfolipasa A2 (8).

Gracias al trabajo con células mesogliales se ha podido inducir la expresión del grupo IIA y grupo V de las sPLA2 y los niveles de RNA y los de proteínas; el estudio cuantitativo y análisis la expresión de ambas proteínas en células estimuladas por la técnica de Western Blot, se encontró que entre el 75-80% de la cantidad total sintetizada del grupo IIA sPLA2 fue secretada(48). La síntesis del grupo V de la sPLA2, sin embargo fue casi exclusivamente intracelular. Se realizó también un estudio de localización y rutas de ambas proteínas, usando

proteínas de fusión del grupo IIA y grupo V. Los resultados indicaron que las dos enzimas se diferencian en su localización y en las rutas de expresión a nivel celular, esto sustenta la hipótesis de que las enzimas puedan tener diferentes funciones (48).

Con la incorporación de herramientas bioinformáticas se ha podido avanzar mas en el conocimiento de la funcionabilidad y estructura de este tipo de fosfolipasa A2 en *Toxoplasma gondii* y la búsqueda de genes comparando secuencias de dominios (aminoácido-aminoácido) con lo cual se han identificado secuencias en ADN genómico de *Toxoplasma*, Los hallazgos de dos genes de PLA2 en *Toxoplasma gondii* confirman la existencia de diferentes isoformas de esta superfamilia de enzimas en este protozoo. La búsqueda de homologías en PlasmoDB (<http://www.plasmodb.org/>) (49), demostró la existencia de secuencias homologas también en *Plasmodium* (10).

3. METODOLOGÍA

3.1 METODOLOGIA *IN SILICO*

3.1.1 Análisis Bioinformático de la Secuencia de Fosfolipasa A2

La secuencia de la Fosfolipasa A2 se obtuvo en la base de datos mundial (Genbank www.ncbi.nlm.nih.gov) (50) anotada previamente por Gómez-Marín JE, Gutiérrez-Escobar A, con el código de ingreso. [gi: 34232161] ,a esta secuencia se le realizó un Blast en el programa TOXODB (<http://toxodb.org/>) (12) con la finalidad de, encontrar homología con las secuencias almacenadas en la base de datos de *Toxoplasma gondii*. Los parámetros estadísticos utilizados fueron *Expect* 1e-20 y un *cutoff* de 60. Posteriormente se observaron los resultados en GBrowse (<http://www.toxodb.org/cgi-bin/gbrowse/tgondii>) (51); el cual revela la ubicación específica de la secuencia en el genoma de *Toxoplasma gondii*.

3.1.2 Selección de Cebadores para PCR

La obtención de los cebadores para la realización de la PCR y RT-PCR específicos para la secuencia de la fosfolipasa A2 (sPLA2) se obtuvieron gracias al trabajo de Gómez J. E., Gutierrez A., Pszeny V., Carruthers V. 2003 (10).

Bunphos 1 Primer directo 5'CCCGGCAAAGAGTAAAGAAAT 3'

Bunphus 2 Primer reverso: 5'GCGGAACAGAGAGAAGCATA3', el tamaño esperado era de 219 Pb en ADN genómico de *Toxoplasma*

3.2 METODOLOGIA *IN VIVO*

3.2.1 Obtención de Taquizoitos

Se utilizaron taquizoitos de la cepa RH de *Toxoplasma gondii* obtenidos a partir de cultivo en ratón cepa ICR, realizando pases en ratón 2×10^5 parásitos en 200 μ l, con una posterior recuperación a través de lavado peritoneal con solución de fosfato salino (PBS), Se hicieron observaciones al microscopio óptico para verificar la presencia y viabilidad de los taquizoitos y se realizo conteo en la cámara de Neubauer.

3.2.2 Extracción de ADN total de *Toxoplasma gondii*

Se utilizo el estuche comercial “*Wizard Genomics DNA purification system*” de la casa comercial Promega (USA), el cual contiene todos los reactivos y protocolos para realizar la extracción de los ácidos nucleicos del parásito y otros tipos celulares. Se siguieron los procedimientos recomendados por el fabricante. En resumen, 10^6 taquizoitos de la cepa RH en un tubo conteniendo solución salina y antibióticos se centrifugo a 13,000-16,000 x g por 10 segundos. Se lavo el botón de sedimentación con PBS, vortex y se agregaron 600 μ l de solución de lisis nuclear y se mezclo por pipeteo de 3 a 6 veces. Al lisado celular anterior se agrego 3 μ l de Rnasa (Promega) y se realizo vortex. Se incubo la solución de 15 a 30 minutos a 37°C y luego se agrego 200 μ l de solución de precipitación de proteínas. Se realizo vortex y se colocaron en hielo por 5 minutos. Se centrifugaron a 13,000 – 16,000 g por 4 minutos. Luego se transfirió el sobrenadante a un tubo fresco conteniendo 600 μ l de isopropanol a temperatura ambiente y se mezclo suavemente por inversión. Después se centrifugo a 13,000 – 16,000 x g por 1 minuto y se retiro el sobrenadante y se agregaron 600 μ l de etanol al 70% a temperatura ambiente. Se centrifugo a 13,000 – 16,000 g por 1 minuto, se retiro el etanol y se dejo secar al aire el

botón de sedimentación por 15 minutos. El ADN se rehidrato en 100 µl de solución de rehidratación del ADN por 1 hora a 65°C.

3.2.3 Amplificación por PCR

Se utilizo el paquete comercial Platinum PCR supermix de la casa comercial Promega (USA) que contiene un exceso de todos los componentes propios de la técnica como magnesio, dNTP y *Taq* polimerasa y el protocolo de amplificación que se resume de la siguiente manera: una fase de pre-denaturación a 94°C por 5 minutos, una fase de denaturación a 94°C por 1 minuto, una fase de anillado 55°C por 1 minuto, una de extensión a 72°C por 1 minuto y una post-extensión a 72°C por 10 minutos.

La solución de reacción contiene lo siguiente: De la solución madre se agrego (supermix) 12.5 µl, del cebador Bunphos1 2,25 µl (0,5µM), del cebador Bunphos 2 2,25 µl (0,5µM), 5.0 µl de agua grado biología molecular y se agrego 5 µl ADN molde de la cepa RH donada amablemente por el Instituto Nacional de Salud. El número de ciclos de la PCR fueron 33.

Se modifiko el tiempo de anillado y su temperatura según el TM de los cebadores utilizados. En el experimento se utilizo la cepa RH donada amablemente por el Instituto Nacional de Salud (Bogota), la misma utilizada para la secuenciación del genoma de *Toxoplasma gondii*. Luego se realizo una electroforesis en gel de agarosa para visualizar el producto de amplificación en un transiluminador ultravioleta (White Ultraviolet Transiluminator, Upland USA).

3.2.4 Extracción de ARN en *Toxoplasma gondii*

La extracción del ARN se realizó utilizando el estuche comercial "SV Total RNA Isolation System" (Promega). Utilizando el siguiente procedimiento:

Se agrega 175 µl de tampón de lisis SV RNA (+BME) en un tubo de autoclave; preparada la muestra para lisis, posteriormente es colocada dentro del buffer de lisis, se mezcla fuertemente.

A continuación se adicionaron 350 µl de buffer de dilución SV RNA (azul) se mezcló por intervalos de 4-5 veces y se centrifugó por 10 minutos. Se transfirió el lisado claro a un tubo limpio y se adicionaron 200 µl de etanol al 95% al lisado despejado y se mezclaron. Se transfirió la mezcla a un "spin basket" ensamblado y se centrifugó por un minuto. Se descartó el sobrenadante y seguidamente se agregaron 600 µl de solución de lavado SV RNA (+etanol) y se centrifugó por un minuto y se descartó el eluido. Se preparó la mezcla de incubación de DNasa.

Mezclamos suavemente con pipeta, no utilizamos el vortex. Aplicamos 50 µl de mezcla de DNasa a la membrana. Incubamos en el por 15 minutos y adicionamos 200 µl de solución stop de SV DNasa (+ etanol) centrifugamos por 1 minuto, y se adicionan 600 µl de solución de lavado SV RNA; seguidamente se centrifuga por 1 minuto, luego se adiciona 250 µl de solución de lavado SV RNA; se centrifuga por 2 minutos y se transfirió al *spin basket*, se lavó el tubo y se adicionaron 100 µl de agua de lavado para nucleasas en la membrana. Se centrifugó de nuevo por 1 minuto la elusión de RNA y se almacenó a -70°C.

3.2.5 Estandarización de la técnica de RT-PCR (Trascricpción Reversa de la Reacción en Cadena de la Polimerasa).

Se usaron cebadores diseñados a partir de la secuencia putativa identificada para realizar ensayos de RT-PCR, con el estuche comercial “RT-PCR System” (Promega). La amplificación se inicio con el perfil de ciclos que se describe a continuación: 1 ciclo de 45 minutos a 48°C para la trascricpción reversa, 1 ciclo de 2 minutos a 94°C para la inactivación de la transcriptasa reversa y la denaturación del complejo RNA/cDNA Primer y 40 ciclos de amplificación por PCR así: denaturación a 94°C por 30 segundos, 58°C a 30 segundos, 72°C a 30 segundos a 29 ciclos como fase exponencial verificando amplificación cada tres ciclos de 40 ciclos totales, 1 ciclo de extensión final a 68°C por 10 minutos. Para preparar la mezcla de reacción se combinaron: 5µl agua libre de nucleasa (para un volumen final de 50 µl), 10µl de *buffer* de reacción AMV/ Tfl5X 5X, 1µl de dNTP Mix 10 mM, 1µl de cada cebador, *Bunphos* 1 a 4.5nM y *Bunphos* 2 a 4.5nM; 2µl de MgSO₄ 25mM en un tubo de reacción de 0,5 ml en frío. Los componentes se mezclan por pipeteo. Se agrega a la reacción 1µl de AMV de transcriptasa reversa (5u/µl) y 1µl de TflDNA Polimerasa (5u/µl). Se realiza *vortex* por 10 segundos para homogenizar la mezcla y finalmente se agregan 10 µl de muestra de RNA para obtener un volumen final de 50 µl.

3.2.6 Normalización de la técnica de RT-PCR con la utilización de un gen *housekeeping* (β-Tubulina)

La utilización de la técnica de la trascricpción reversa de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), utiliza comúnmente genes *housekeeping* para calcular los niveles de ARNm, incluyendo genes como el 18S y 28S de ARN ribosomol, β-Tubulina, β-Actina y gliceraldehido-3-fosfatodihidrogenasa (GAPDH) debido a que la expresión de estos genes es constante, con lo cual se favorece los procesos de cuantificación. Para este trabajo se utilizó la β-Tubulina como control interno de cuantificación, a partir de la secuencia obtenida por el genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (gi 55283414)(47)). Se

diseñaron en el programa Generunner y posteriormente sintetizados por Invitrogen (ARC QUIMICOS, Bogota). Los cebadores son:

β -Tubulina 1: AGTCCAGCGTCTGTGACATCC

β -Tubulina 2: GCACCCATCTCGCCCTCTTCC, el tamaño esperado era de 507pb en ADN complementario de *Toxoplasma gondii*.

4. RESULTADOS

41. ANALISIS BIOINFORMÁTICO PARA LA SECUENCIA DE FOSFOLIPASA A2

El análisis de la secuencia de la Fosfolipasa A2 secretoria se realizó utilizando la base de datos de ToxoDB – BLAST, (<http://www.toxodb.org/restricted/toxoDBblast.shtml>) (53). Posteriormente la secuencia se analizó en el buscador genómico genérico Gbrowse (<http://www.toxodb.org/cgi-bin/gbrowse/tgondii>) (51), el cual nos reveló la ubicación específica de la secuencia en el genoma de *Toxoplasma* (**Figura 2**). La secuencia esperada de 215 pb se encontró ubicada en el cromosoma número XIII entre las posiciones 991,385 a 991,599 del genoma, (<http://www.toxodb.org/cgi-bin/gbrowse/tgondii>) (51). La ubicación de esta secuencia mostró la ubicación próxima con moléculas específicas de superficie que actúan como ligandos durante el reconocimiento y anclaje celular SAG3 y dos proteínas de micronemas: MIC5, MIC6, las cuales posiblemente poseen una función facilitando la adherencia en *Toxoplasma gondii* a la célula hospedera.

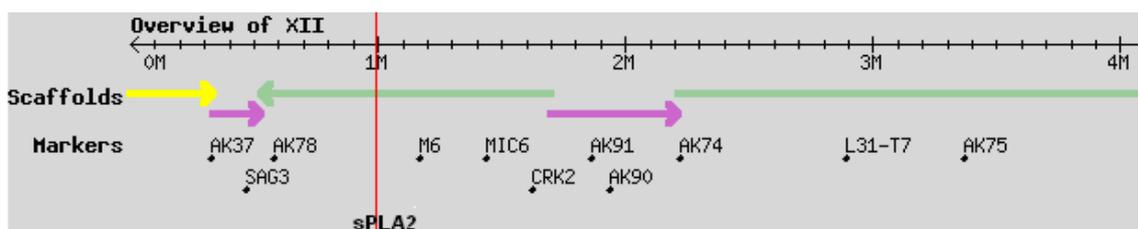


Figura.2. Ubicación de la secuencia de PLA2 en el genoma de *Toxoplasma gondii*

4.2 PESO APROXIMADO DE LA PROTEINA

El peso aproximado de la proteína fue calculado con el software (PROTEIN CALCULATOR v3.2) (www.scripps.edu/~cdputnam/software/software.html) (54) *The Scripps Research Institute* 2004. Utilizando la ORF de la Fosfolipasa A2, (TGG_7565-4-4470-4231 1 a 80 SGTERSISLGIHTHAYGFQKQVFVCIVAYACIYLYTCNAPFICAMGRPSGSCSIC ICKKRNACIYLDIAPCTCISLLFAG). Donde el analisis de esta nos revelo un peso aproximado de 8,6 KDa.

4.3 PRUEBA DE PCR Y RT-PCR PARA EL GEN sPLA2 DE *Toxoplasma gondii*

A partir de los parásitos recuperados del cultivo de ratón, se realizo la extracción de ADN utilizando el estuche de purificación Wizard genomics (Promega, WI, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se amplifico el gen putativo de la sPLA2.

Se utilizó un ensayo de amplificación de ADN genómico a partir de taquizoitos purificados de *Toxoplasma gondii* de la cepa Rh, con el cual se obtuvo amplificación de un producto del tamaño esperado de ~234 pb. Se logro también una amplificación positiva usando la técnica RT-PCR mostrando que esta secuencia es expresada por *Toxoplasma gondii*. Es importante saber que esta es activamente transcrita en el parásito por la posible naturaleza evolutiva de la secuencia; el tamaño fue similar al encontrado en los ensayos de PCR - 234pb- (**Foto 1**). Esta secuencia fue sometida a semicuantificación usando el control interno del estuche comercial usado. Se encontró que tenían una fase exponencial inicial en 36 ciclos lo cual indica que es un gen normalmente activo en taquizoitos de *Toxoplasma gondii* (**Foto 2**).

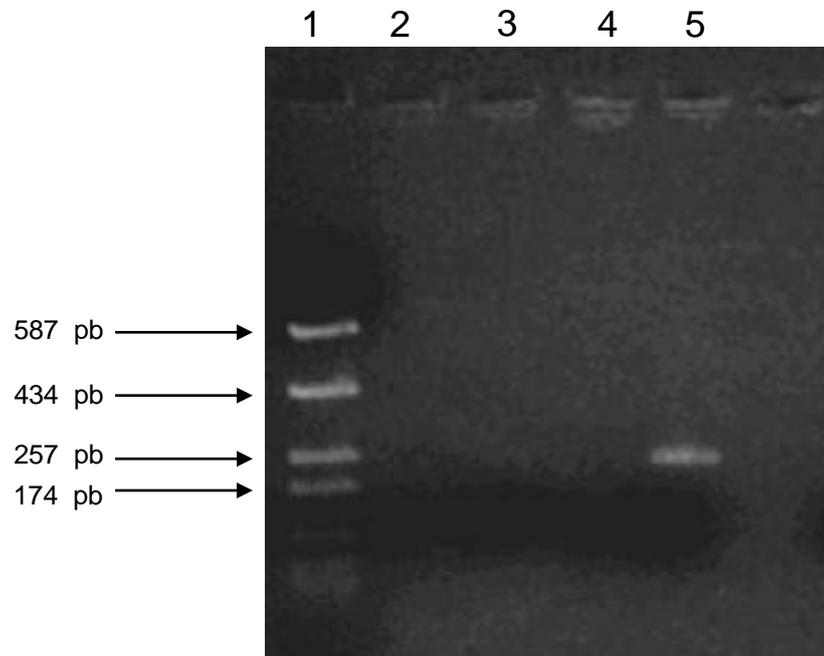


Foto 1: Ensayo de amplificación por la técnica de PCR utilizando los cebadores *Bunphos 1*(directo) y *Bunphos 2* (reverso) que expresa la secuencia que codifica para el gen la fosfolipasa sPLA2 Ca ++ La foto muestra un gel de agarosa 2% luego de electroforesis de los productos de amplificación con tinción por bromuro de etidio a partir de DNA. 1 Marcador de peso molecular Puc 18 digerido por *hae* III. 2 Control negativo (mezcla de la reacción sin plantilla de DNA). 3 – 4 ADN de leucocitos obtenidos de sangre periférica de *Homo sapiens*. 5 ADN de taquizoitos de *Toxoplasma gondii* cepa Rh.

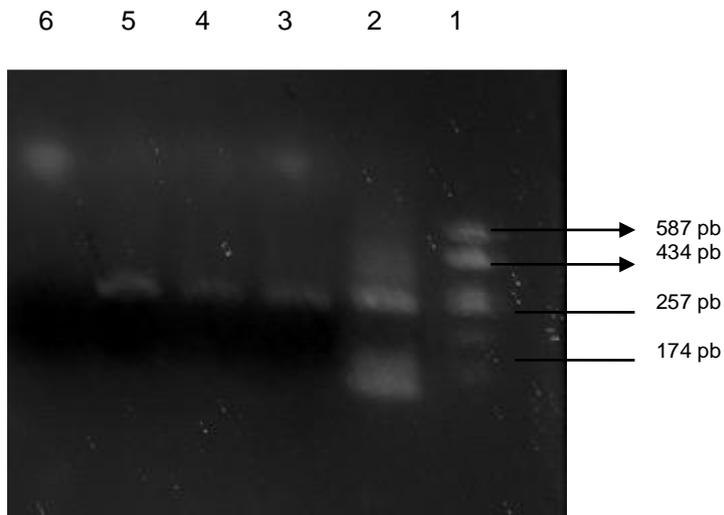


Foto 2: Ensayo de amplificación por la técnica de RT-PCR utilizando los cebadores *Bunphos 1*(directo) y *Bunphos 2* (reverso) que expresa la secuencia que codifica para el gen la fosfolipasa sPLA2 Ca ++. La foto muestra un gel de agarosa al 2% de los productos de amplificación con tinción por bromuro de etidio a partir de ARN obtenido por extracción (Trizol). **1** Marcador de peso molecular pUC 18 digerido por *hae III*. **2** Control interno de cuantificación. **3- 4** y **5** muestras independientes de extracción de ARN *Toxoplasma gondii*. **6:** RT negativo (control de la reacción).

4.3 DETERMINACION DE LA FASE EXPONENCIAL DE LA AMPLIFICACION PARA sPLA2 Y β TUBULINA

Como último parámetro se realizó un análisis al número de ciclos de amplificaciones realizadas, este producto no es lo suficiente visible en el gel. Se sabe que la amplificación pasa inicialmente por una fase exponencial, pero alcanza su fase plateau cuando la actividad de la enzima declina y cuando los componentes de la reacción se limitan. En la fase plateau el ARNs se presenta en niveles muy altos, pudiendo dar productos con una alta intensidad. En este experimento nosotros realizamos una comparación entre los ciclos 34 al 40 (**Foto 3**). En esta se observa un mayor incremento en la intensidad de la banda de fosfolipasa A2 a partir del ciclo 36, con la β -Tubulina se observa el incremento a partir del ciclo 34 donde alcanza su fase exponencial.

Se realizó un análisis de densitometría para el gel con el programa (UN-SCAN-IT gel) versión 5.1 Silk Scientific Corporation. El incremento en el número de píxeles fue dos veces, para la sPLA2 en comparación con el gen control de β -Tubulina. (**Figura 3.**)

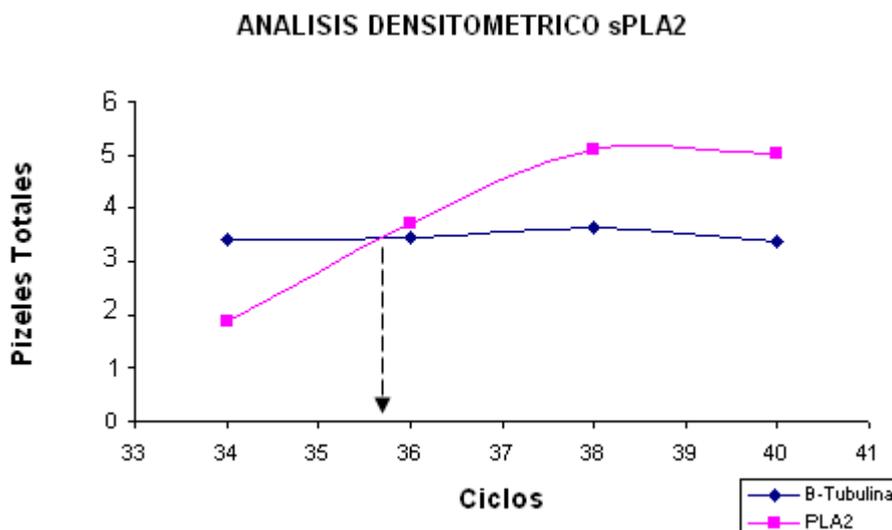
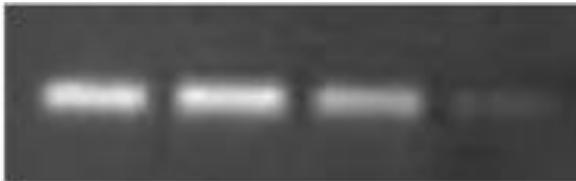


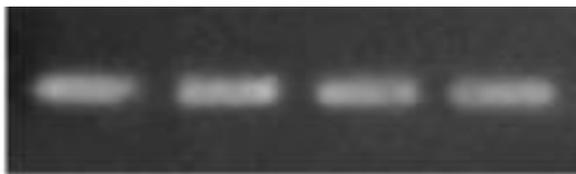
Figura 3. Análisis de densitometría de los niveles de transcripción del gen de la fosfolipasa A2 secretoria en *Toxoplasma gondii* utilizando como gen control β -Tubulina. La cuantificación se realizó con el programa (UN-SCAN-IT gel). El punto de corte de las gráficas representa el inicio de la fase exponencial del gen de la fosfolipasa A2 de *Toxoplasma gondii*.

NUMERO DE CICLOS

40 38 36 34



PLA2



β TUBULINA

Foto. 3 : Determinación de la fase exponencial de amplificación para Fosfolipasa A2 secretoria y β Tubulina .La intensidad del producto de amplificación de la Fosfolipasa A2 secretoria incrementa a partir del ciclo 36 , en diferencia con la β Tubulina que alcanza su fase plateau a los 34 ciclos .

5. DISCUSIÓN

Las herramientas bioinformáticas utilizadas en este estudio se combinaron entre si de tal manera que la estructura de la búsqueda estuviera relacionada fundamentalmente con la significancia biológica del gen de la fosfolipasa A2 en el parasito, con la serie de diferentes programas ofrecidos por BLAST (<http://www.toxodb.org/restricted/toxoDBblast.shtml>) (53). Se pudo obtener el *contig* donde se encuentra el gen putativo para fosfolipasa A2. El *contig* tiene un tamaño total de 11242 bases y un tamaño aproximado del gen de 2520pb código (TGG_7565 84). La secuencia de la sPLA2 es de 237 pb fue ubicada en el cromosoma XII específicamente en la posiciones 991,385 a 991,599 (**figura 2**), es llamativo que se encuentra también secuencias putativas para MIC5-MIC6 y SAG3, que son genes involucrados en los procesos de anclaje y penetración a la célula hospedera (55).

El peso aproximado de la proteína fue calculado en 8.6 KDa, este resultado es una clara evidencia de la pertenencia de esta fosfolipasa A2 en el grupo de las fosfolipasa A2 (sPLA2) tipo secretorias (56).

Estudios previos en *Toxoplasma gondii* han demostrado que la sPLA2 participa en el proceso de invasión y que existe una diversidad de sPLA2 cada una con funciones diferentes en la hidrólisis de ácidos grasos, tal como ocurre en otros organismos (20).

Dado su papel en estos procesos las sPLA2 se convirtieron entonces en un blanco potencial para desarrollar medicamentos. Avances recientes han permitido diseñar compuestos altamente específicos basándose en el conocimiento de la estructura de la enzima, tal como ocurrió con el LY311727, el cual inhibe la sPLA2 del grupo II humana pero no inhibe la sPLA2 del grupo I ni la cPLA2 (57). Este inhibidor *in vitro* redujo el proceso de invasión de *Toxoplasma gondii* en 50%, pero cuando se utilizo *in vivo* no redujo de manera significativa la mortalidad en un modelo de ratón infectado con *Toxoplasma gondii* (3).

Estos resultados demostraron la necesidad de purificar la enzima del parásito como un paso previo necesario para conocer su estructura y diseñar medicamentos específicos para PLA2 de parásitos, pero no humanas, evitando así problemas de efectos adversos por inhibición de las enzimas del hospedero y mejorando su poder de inhibición. Como este proceso de purificación puede ser bastante dispendioso si no se conocen bien las características de la proteína y mas aun si existen varias familias de la misma, es interesante poder clonar esta proteína y producirla *in vitro*. Nosotros hemos entonces desarrollado un proceso de transcripción del gen basándonos en la secuencia putativa conocida actualmente (10). Para ello, diseñamos iniciadores específicos para su amplificación y verificamos que son unidades transcripcionalmente activas, es decir que se expresan. Esto ultimo fue posible determinarlo dado su hallazgo en secuencias EST de ToxoDB (<http://www.toxodb.org/>)(12). De otro lado sPLA2 fue amplificada por PCR. La identificación de estos genes a partir de secuencias de aminoácidos ha sido posible gracias a que estas se han estudiado extensamente en otras especies como serpientes, humanos y ratón y se cuenta con un buen número de secuencias clonadas, expresadas y caracterizadas enzimáticamente (19). Las sPLA2 están involucradas en procesos digestivos (grupo I) y de respuesta inflamatoria (grupo II) (39). A nivel estructural estas sPLA2 están compuestas por entre 89 y 120 residuos, la sPLA2 codifica para 80 aminoácidos. En sPLA2 se encuentran siete residuos de Cisteína, similar a las otras sPLA2. Una característica común a todas las sPLA2 es la presencia de un residuo de Histidina con un Aspartato adyacente y dos Cisteínas (19). De manera interesante en el caso de sPLA2 esta se encuentra reemplazada por Tirosina con una Alanina adyacente pero se encuentran las dos Cisteínas. La consecuencia funcional de estas mutaciones deberá esperar las pruebas de hidrólisis de ácidos grasos con la proteína purificada. Por ahora se sabe que existen sPLA2 en plantas cuya función es desconocida y que han sido agrupadas en un nuevo grupo, pues solo comparten ciertos residuos en el sitio activo y en el sitio de unión a Ca⁺⁺ (58).

La identificación de estos nuevos genes en *Toxoplasma gondii* abre expectativas en cuanto a definir su papel. Dentro de las posibles funciones de fluidificación de la membrana de la célula hospedera, la modificación de la membrana de la vacuola parasitofora para las sPLA2 y la señalización intracelular para la cPLA2 (2). También, dado el creciente interés en el estudio de factores de virulencia, es de importancia determinar si existen polimorfismos de secuencias relacionados con el grupo clonal de las cepas.

La caracterización del gen de la fosfolipasa A2 y su ubicación específica en el genoma de *Toxoplasma gondii* abren una gran posibilidad terapéutica, acompañada con la utilización de herramientas moleculares para la manipulación de este genoma y por consiguiente para la manipulación del gen en su trabajo invasivo (59).

Nosotros estandarizamos la técnica de la RT-PCR semicuantitativa con el objetivo de lograr la transcripción del gen de la fosfolipasa sPLA2 de *Toxoplasma gondii*. Al realizar el RT-PCR primero verificamos si esta secuencia estaba en la base de datos EST de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (50) donde fue encontrada la anotación para ella, (TGG_7565-4-4470-4231), por lo tanto nuestro primeros ensayos fueron desarrollados hasta la fase de saturación de la reacción o a fase plateau dando como resultado la transcripción de este gen putativo con un peso similar al mostrado por los ensayos de PCR, 237 pb (**Foto 2**). Esta información es valiosa puesto que el gen putativo es activo transcripcionalmente lo que indica que no es un pseudogen, además, conociendo la naturaleza especie específica de esta secuencia evidenciada anteriormente, es posible que estemos en presencia de un gen que participe en rutas invasivas específicas para *Toxoplasma gondii*.

El RT-PCR semicuantitativo se llevo a cabo utilizando el control de cuantificación del kit usado en este estudio en tres muestras diferentes de ARN

de parásito donde se obtuvieron bandas con intensidades diferentes, la fase inicial de reacción nos muestra una proporción dos veces mayor de ARNm de tubulina, con respecto a la cantidad inicial de ARNm de sPLA2 (**Figura 3**), esta claro que la intensidad de las bandas en los ensayos de RT-PCR para el gen de la sPLA2 incrementa drásticamente en cada uno de los ciclos respectivamente, pero se muestra con claridad la fase exponencial de la reacción para el ciclo numero 36 de la reacción de la RT-PCR. Los resultados confirman un inicio tardío de la fase exponencial del gen de la sPLA2, con respecto al gen control de β -Tubulina, esto posiblemente se debe a una diferencia de las cantidades iniciales de ARNm utilizadas para la reacción del gen de la fosfolipasa A2 (sPLA2) de *Toxoplasma gondii* y la cantidad del gen control de β -Tubulina, las cuales fueron diferentes para las reacciones. Estos resultados de transcripción del gen de la sPLA2 sugieren una respuesta tardía acompañada de una activación molecular, aun no conocida en su totalidad en *Toxoplasma gondii*. Para determinar los efectos de la activación del gen de la sPLA2 son dependientes de la síntesis de proteínas será necesario un estudio posterior sobre los mecanismos por los cuales se induce la transcripción de este gen y sus respectivos factores de activación.

Es de agregar que no sabemos que inhibe o estimula la expresión de este gen en su totalidad, en futuros estudios sería necesario el análisis del gen partiendo de diferentes estadios como sería bradizoito, y en tiempos específicos de invasión, (horas-días-semanas), con lo cual se lograría evidenciar los momentos específicos de actividad del gen, y los posibles factores de activación en los procesos de invasión de parásito en la célula hospedera.

6. CONCLUSIONES

Los resultados de la RT-PCR para el gen de la fosfolipasa A2 (sPLA2) de *Toxoplasma gondii* logro demostrar que este es un gen inducible y que es transcrito por el parasito.

La intensidad de las bandas del gen de la fosfolipasa A2 (sPLA2) de *Toxoplasma gondii* fueron dos veces mayor con respecto al gen control de β -Tubulina a partir del ciclo numero 38.

Se logro una amplificación positiva del gen de la fosfolipas A2 (sPLA2) de *Toxoplasma gondii* a partir de DNA genómico, con un peso esperado de ~234 pb.

Los ensayos de RT-PCR fueron positivos obteniéndose una fase exponencial a partir del ciclo 36, y una fase de saturación a partir del ciclo 38 de la reacción.

La localización física de la fosfolipasa A2 (sPLA2) de *Toxoplasma gondii*, fue determinada en el cromosoma numero XII del genoma del parasito, entre las posiciones 991,385 a 991,599.

El peso aproximado obtenido de la proteína fue de 8.6 KDa, peso que se relaciona con los pesos promedios de las fosfolipasas secretorias, con lo cual se confirma su relación con este grupo de fosfolipasa secretorias.

7. RECOMENDACIONES

Realizar ensayos de RT-PCR para el gen de fosfolipasa A2 (sPLA2) de *Toxoplasma gondii* en estadio de bradizoito, para observar su actividad en este estadio.

Analizar el comportamiento de la fosfolipasa A2 (sPLA2) de *Toxoplasma gondii* en tiempos específicos de invasión, (horas-días-semanas) para lograr evidenciar los momentos específicos de activación del gen en el proceso de invasión del parásito en la célula hospedera.

Clonación, y purificación de la proteína de fosfolipasa A2 (sPLA2) de *Toxoplasma gondii*, con lo cual se lograra evidenciar su actividad en el parásito.

8. BIBLIOGRAFIA

1. **Gómez J. E., Castaño J. C., Montoya M. T. 1995.** Toxoplasmosis congénita en Colombia: Un problema subestimado de salud pública. Colombia Médica. 26: 669-70
2. **Gomez J. E., Montoya M. T., Castano J. C., Rios M. T., Perez J. C. 1993.** Epidemiología de la infección por *Toxoplasma gondii* en gestantes de Armenia (Quindío) Colombia. Colombia Med.. 24: 4-18.
3. **Buitrago R., Olarte J., Gómez J. E. 2002.** Evaluation of two inhibitors of invasion LY311727 –3-(3-acetamide-1-benzyl-2-ethyl-indolyl-5-oxy propane phosphoric acid- and AEBSF-4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride- in acute murine toxoplasmosis. J Antimicrobia Chemotherapy. 49: 871-7
4. **Saffer L. D., Long Krug S. A., Schwartzman J. D. 1989.** The role of phospholipase in host cell penetration by *Toxoplasma gondii*. Am J Trop Med Hyg. Feb;40(2):145-9.
5. **Thardin JF, M`RINI c, Beraud M, Vzandaele J, Frisach MT, Bessieres MH, Seguela JP, Pipy B. 1993** Eicosanoid production by mouse peritoneal macrophages during *Toxoplasma gondii* penetration : role of parasite and host cell phospholipases. Infect Immun 61: 1432-1441. nueva
6. **Gomez J. E., El'btaouri H., Bonhomme A., Antonicelli F., Pezzella N., Burlet H., Aubert D., Villena I., Guenounou M., Haye B., Pinon J.M. 2002.** Involvement of secretory and cytosolic phospholipases A2 during infection of THP1 human monocytic cells with *Toxoplasma gondii*. Effect of interferon gamma. Parasitol Res.; 88:208-216.

7. **Radvin J, Murphy CF, Guerrant RL Long-Krug S 1985.** Effects of antagonists of calcium and phospholipase A2 on the cytopathogenicity of *Entamoeba histolytica*. *J Infect Dis* 152 : 542-549. nueva

8. **Gómez J. E., Bonhomme A., Guenounou M., Pinon J. M. 1996.** Role of interferon- γ against invasion by *Toxoplasma gondii* in a human monocytic cell line (THP1): Involvement of the parasites secretory phospholipase A2. *Cell Immunol*; 169: 218-225

9. **Gómez J. E., Valere A., Bonhomme A., El'btaouri H., Antonicelli F., Pezzella N., Burlet H., Aubert D., Villena I., Guenounou M., Haye B., Pinon J. M. 1998.** Interferon- γ signal transduction during parasite infection: modulation of MAP kinases in the infection of human monocyte cells (THP1) by *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunology*; 20: 631-635

10. **Gómez J. E., Gutierrez A., Pszenny V., Carruthers V. 2003.** Identificación de los genes codificantes para las enzimas de fosfolipasas A2 en *Toxoplasma gondii*. *Biomedica . Nov* ; 23 (sup1: 174) .

11. **Lincoln D. Stein, Christopher Mungall, ShengQiang Shu, Michael Caudy, Marco Mangone, Allen Day, Elizabeth Nickerson, Jason E. Stajich, Todd W. Harris, Adrian Arva, and Suzanna Lewis. 2002.** The Generic Genome Browser: A Building Block for a Model Organism System Database. *Genome Research*. 1599-1610. nueva

12. **JESSICA C. KISSINGER, BINDU GAJRIA, LI LI, IAN T. PAULESEN and DAVID S. ROOSE. 2003.** ToxoDB: accesing the *Toxoplasma gondii*. *Nucleic Acids Res*. 31 No 1. Link. (<http://www.toxodb.org/>). consultada marzo 2004

13. **HOWE D. K., And SIBLEY L. D. 1995:** Toxoplasma gondii comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with humans disease. J. Infect Dis.. 172:1561-1566
14. **SIBLEY L.D., And BOOTHROYD J. C. 1992:** Virulent strains of Toxoplasma gondii compromise a single clonal lineage. Nature.. 359:82-85.
15. **PFEFFERKORN L. C., And PFEFFERKORN E. R. 1980.** Toxoplasma gondii: genetics recombination between drug resistant mutants. Exp Parasitol.. 50:305-316.
16. **SIBLEY L. D., And BOOTHROYD J. C. 1992.:** Construction of a karyotype for Toxoplasma gondii. Mol Biochem parasitol. 51:291-300.
17. **SOLDATI D., And BOOTHROYD J.C. 1995.:** A selector of transcription initiation in the protozoan parasite Toxoplasma gondii. Mol cell Biol 15:87-93.
18. **Ajioka J. W., Boothroyd J. C., Brunk B. P., Hehl A., Hillier L., Et Al. 1998:** Gene Discovery by EST sequencing in Toxoplasma gondii reveals sequences restricted to the apicomplexa. Genome res.. 8: 18-28
19. **Six D.A., Dennis E. A. 2000.** The expanding superfamily of phospholipaseA2 enzymes: classification and characterization, Biochim. Biophys. Acta 1488,1-19.
- 0
20. **Gómez J. E., Bonhomme A., Pinon J. M. 1998.** Une famille d'enzymes présentes des protozoaires aux mammifères: comment les phospholipase A2 participent au processus d'invasion de Toxoplasma gondii. L'Année biologique; 78: 185-202.
21. **Gijon M. A., Leslie C. C. 1999.** Regulation of arachidonic acid release and cytosolic phospholipase A2 activation. J. Leukocyte Biol. 65,330 -336.

22. **Austin S., And Funk C. D. 1999.** Biological insight into prostaglandin, leukotriene, and other eicosanoid functions using mice with targeted gene disruptions. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*, 58, 231-252
23. **Devillier P., Baccard N., Adveneir C. 1999.** synthesis, receptors and role of leukotrienes in asthma. *Pharmacol Res*;40(1):3-13
24. **Moolenaar W. h., Kranenburg O., Postma F. R., Zondag G. C. 1997.** Lysophosphatidic acid: G-protein signalling and cellular responses. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9(2): 168-173 .
25. **Balsinde J., Balboa M. A., Dennis E. A. 1997.** Antisense inhibition of group VI Ca²⁺-independent phospholipase A₂ blocks phospholipid fatty acid remodeling in murine P388D1 macrophages, *J. Biol. Chem.* 272 ,29317-29321.
26. **W.W Stephens., J,L Walker. W, Myers. 1898,** *J. Pathol. Bacteriol.* 5 279-301.
27. **Donald Fairbairn. 1945.** The phospholipase of the venom of the cottonmouth moccasin (*Agkistrodon piscivorus* L) *J. Biol. Chem.*157: 633-644
28. **Davidson F. F., Dennis E. A. 1990.** Evolutionary relationships and implications for the regulation of phospholipase A₂ from snake venom to human secreted forms. *J Mol Evol Sep*;31(3):228–238
29. **Heinrikson R. I., Krueger E. T., Keim P. S .1977.** Amino acid sequence of phospholipase A₂- α from the venom of *Crotalus adamanteus*: a new classification of phospholipases A₂ based upon structural determinants *J Biol Chem* 252,4913-4921

30. **Dufton M. J., Hider R. C. 1983.** Classification of phospholipases A2 according to sequence: evolutionary and pharmacological implications. *Eur. J. Biochem.* 137, 545–551.
31. **Balsinde J., Balboa M., Insel P. 1999.** Regulation and inhibition of phospholipase A2. *Annu. Pharmacol. Toxicol.*, 39:175-189.
32. **Z.S. Derewenda., Y.S Ho. 1999** *Biochim. Biophys Acta* 1441 nueva
33. (http://cobra.ucsd.edu/Research/research_main.htm)
34. **Josef P., Gaby W., Dieter K., Werner P., Van Den Bosch H.** Control of phospholipase A2 gene expression: NOTA
35. **Kusunoki C., Satoh S., Kobayashi M., Niwa M. 1990.** Structure of genomic DNA for rat platelet phospholipase A2. *Biochim Biophys Acta*;1087:95-97.
36. **Pfeilschifter J., Glaser KB., Valdas P. 1995.** Regulation of synthesis of group II phospholipase A2; in *Clinical Inflammation : Molecular Approaches to Pathophysiology*. New York, CRC Press, ,pp 25-51.
37. **Komada M., Kuda I., Inoue. 1990.** Structure of gene coding for rat group II phospholipase A2; *Biochem Biophys Res Commun*;1087:95-97
38. **Seilhamer J. J., Pruzanski W., Valdas P., Plant S., Miller J. A, Kloss J., Johnson K. I. 1989.** Cloning and recombinant expression of phospholipase A2 present in rheumatoid arthritic synovial fluid. *J Biol Chem*;264:5335-5338
39. **Vadas P., Browning J., Edelson J., Pruzanski W. 1993.** Extracellular phospholipase A2 expression and inflammation: The relationship with associated disease states. *J Lipid Mediators*;8:1-30.

40. **Pfeilschifter J., Pignat W., Vosbeck K., Marki F. 1989.** Interleukin 1 and tumor necrosis factor synergistically stimulate prostaglandin synthesis and phospholipase A2 release from rat renal mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun*;159:385-394
41. **Schalkwijk C., Pfeilschifter J., Marki F., Van Den Bosch H. 1991.** Interleukin-1 β , tumour necrosis factor and forskolin stimulate the synthesis and secretion of group II phospholipase A2 in rat mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun*;174:268-275.
42. **Baeuerle P. A., Henkel T. 1994.** Function and activation of NF κ B in the immune system. *Annu Rev Immunol*; 12:141-179
43. **Serkkola E., Hurme M. 1993.** Activation of NF κ B by cAMP in human myeloid cells. *FEBS Lett*;334:327-330.
44. **McConnelly MC., Kerszenbaum F. 1984** Modulation of macrophage interaction with *Trypanosoma cruzi* by phospholipase A2-sensitive components of the parasite membrane. *Biochem Biophys Res Commun* 121;931-939.
45. **Cassaing S., Fauvel J., Bessieres M. H., Guy S., Seguela J., Chap H. 2000.** *Toxoplasma gondii* secretes a calcium-independent phospholipase A2. *International Journal for Parasitology*, (30),1137-1142.
46. **Saffer L., Schwartzman J. A. 1991.** Soluble Phospholipase of *Toxoplasma gondii* Associated with Host Cell Penetration. *J. Protozool.* 38(5), pp.454-460
47. **Thardin J. F., M'rini C., Beraud M., Vandaele J., Frisach M. F., Bessieres M. H., Seguela J. P., Pipy B. 1993.** Eicosanoid Production by Mouse Peritoneal Macrophages during *Toxoplasma gondii* Penetration: Role of

Parasite and Host Cell Phospholipases. *Infection and Immunity* 61(4) 1432-1441

48. **Van Der Helm H. A., Buijtenhuijs P., Van Den Bosch H. 2001.** Group IIA and group V secretory phospholipase A(2): quantitative analysis of expression and secretion and determination of the localization and routing in rat mesangial cells. *Biochim Biophys Acta*. Jan 15;1530(1):86-96.

49. **Bahl,A., Brunk,B., Coppel,R.L., Crabtree,J., Diskin,S., Fraunholz,M.J., Grant,G.R., Gupta,D., Huestis,R.L., Kissinger,J.C., Labo,P., Li,L., McWeeney,S.K., Milgram,A.J., Roos,D.S., Schug,J. and Stoeckert,C.J., Jr 2002.** PlasmoDB: The *Plasmodium* Genome Resource. *Nucleic Acids Res.*, **30**, 87–90. Link (<http://www.plasmodb.org/>). Consultada agosto 2004.

50. **D.A. Benson; I. Karsch-Mizrachi; D.J. Lipman; J. Ostell; B.A. Rapp; D.L. Wheeler. 2000.** GenBank. *Nucleic Acids Research*. Vol 18 No 1: 15-18. Link (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). consulta febrero 2004.

51. **Stein L.D., Mungall C., Shu S., Caudy M., Mangone M., Day A., Nickerson E., Stajich J.E., Harris T.W., Arva A., and Lewis, S. 2002.** *Genome Research*. 12:1599–1610. Link (<http://www.toxodb.org/cgi-bin/gbrowse/tgondii>).consultada junio 2005.

53. **JESSICA C. KISSINGER, BINDU GAJRIA, LI LI, IAN T. PAULESEN and DAVID S. ROOSE. 2003.** ToxoDB: accesing the *Toxoplasma gondii*. *Nucleic Acids Res*. 31 No 1. Link (<http://www.toxodb.org/restricted/toxoDBblast.shtml>). Consultad abril 2004.

54. **Putnam C. 2005.** Departments of Molecular and Experimental Medicine and Molecular Biology, The Scripps Research Institute. Link (www.scripps.edu/~cdputnam/software/software.html) .Consulatada agosto 2005.

55. **My-Hang Huynh., Rabenau K. E., Harper J. M., Beatty W. L., Sibley L. D., And Carruthers V. B. 2003.** Rapid invasion of host cells by *Toxoplasma* requires secretion of the MIC2–M2AP adhesive protein complex
56. **Dennis E. A. 1997.** The growing phospholipase A2 superfamily of signal transduction enzymes. *Trends Biochem. Sci.* 22:1–2.
57. **Schevitz RW., Bach N. J., Carlson D. G., Chirgadze N. Y., Clawson D. K., Dillard R. D., Draheim S. E., Hartley L.W., Jones N. D., Mihelich E. D., Olkpwski J. I., Snyder D. W., Sommers C., Wery J. P. 1995.** Structure-based design of the first potent and selective inhibitor of human non-pancreatic secretory phospholipase A2. *Nature Struc Biol.*; 2: 458-465
58. **Valentin E., Lambeau G. 2000.** What can venom phospholipases A2 tell us about the functional diversity of mammalian secreted phospholipases A2? *Biochimie*; 82: 815–831
59. **Roos D. S., R. G. K. Donald, N. S. Morrissette, and A. L. C. Moulton. 1995.** Molecular tools for genetic dissection of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Methods Cell Biol.* 45:28-63.