

03072
9
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES Y DE
POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DEL VENENO DE
LA HORMIGA *Pogonomyrmex rugosus*
CON ÉNFASIS EN LA FOSFOLIPASA A.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA
P R E S E N T A ;
ENRIQUE MACARIO HERRERA MEDINA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CHERNAVACA, MOR.

1992



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

RESUMEN

INTRODUCCION

a) La Investigación en Venenos de Animales.	1
b) La Hormiga <i>Pogonomyrmex</i> .	2
c) Las Enzimas de los Venenos. Las Fosfolipasas.	7

OBJETIVO	11
----------	----

MATERIALES Y METODOS

a) Obtención del veneno.	12
b) Medición de proteína.	12
c) Electroforesis a pH ácido y alcalino en presencia de urea.	12
d) Electroforesis en geles de poli(acrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS).	12
e) Cromatografía de exclusión molecular.	13
f) Cromatografía de afinidad.	13
g) Cromatografía de intercambio iónico.	14
h) Pruebas de toxicidad.	14
i) Actividad fosfolipásica.	15
j) Determinación del tipo de fosfolipasa.	15
k) Concentración de proteína.	16
l) Transferencia de proteínas (Western-blot).	16
m) Secuencia de aminoácidos.	17

RESULTADOS

a) Electroforesis en presencia de urea.	19
b) Electroforesis en presencia de SDS.	19
c) Detección de la actividad de fosfolipasa en geles de agarosa/rodamina G-6.	19
d) Especificidad fosfolipásica del veneno de la hormiga <i>P. rugosus</i>	24
e) Cromatografía de exclusión molecular.	24
f) Pruebas de toxicidad en mamíferos, grillos e isópodos	28
g) Cromatografía de afinidad.	29
h) Cromatografía de intercambio iónico.	33
i) Cromatografía de afinidad.	38

DISCUSION	42
-----------	----

BIBLIOGRAFIA	47
--------------	----

RESUMEN

La composición bioquímica del veneno de la hormiga *Pogonomyrmex rugosus* comprende desde compuestos hidrocarbonados simples (alcanos, alquenos, ácido fórmico, aldehídos, hidrocarburos aromáticos, etc) hasta péptidos y proteínas con actividad de hialuronidasa, fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida, proteasa, fosfolipasa, etc.

El objetivo de esta tesis fue la purificación y la caracterización de la fosfolipasa de este veneno.

Se caracterizó el patrón de bandas del veneno total en diferentes sistemas electroforéticos obteniéndose un patrón similar en los geles a pH ácido y a pH alcalino mientras que, en condiciones desnaturizantes no reductoras el patrón resultó distinto. Se hicieron pruebas de la toxicidad del veneno crudo y de las fracciones obtenidas de una columna de filtración en gel (Sephadex G-50 medio) en ratones, grillos e isópodos. La fosfolipasa, que es una de las proteínas más abundantes de este veneno, se purificó a homogeneidad utilizando la siguiente estrategia: primero, pasando el veneno crudo por una columna de intercambio iónico (CM-32 Celulosa) y luego, por una columna de afinidad basada en el acoplamiento de un análogo de la fosfatidilcolina (el inhibidor de Rosenthal) a Sepharosa 4B y monitoreando la actividad de fosfolipasa por medio de la sobreposición de geles de poliacrilamida-SDS a una placa de agarosa/yema de huevo/rodamina G-6 y viendo la formación de halos bajo luz UV en las bandas con actividad. La fosfolipasa que purificamos resultó del tipo A₁ con un peso molecular de 35,000 Da. Se realizaron dos intentos de secuenciación (en solución y en soporte sólido) en donde se encontró que el grupo amino terminal está bloqueado.

INTRODUCCION

a) La Investigación en Venenos de Animales

En los últimos años la investigación relacionada con los venenos de animales ha cobrado una gran importancia en todo el mundo. Estos estudios no están limitados únicamente a los aspectos médicos vinculados con los tratamientos preventivos o curativos de las picaduras y las mordeduras producidas por estos animales (Gomez y col., 1989; Harris, J.B., 1985; Nieder y col., 1982; Schmidt, J.O., 1982; Schmidt y col., 1986a; Sosa y col., 1985), ni a la producción de antisueros contra los mismos (Verheij y col. 1981). También son herramientas valiosas en el estudio farmacológico de receptores y canales iónicos (Schmidt, J.O., 1982). Hoy en día se cuenta con una gran variedad de toxinas que, una vez purificadas y caracterizadas, han ayudado a conocer algunos de los mecanismos básicos del funcionamiento del sistema nervioso. Los venenos que poseen características enzimáticas han sido utilizados en estudios encaminados al conocimiento de los componentes de la membrana y en estudios fisiológicos (Bosh, H.V.D., 1974; Chang y col. 1987; Piek y col. 1989; Schmidt J.O., 1986; Schmidt y col. 1978b; Shier, W.T., 1979; Vadas y col. 1981; Van Der Bosh, H., 1982). Por otra parte, se cree que algunos de los componentes que contienen los venenos pueden ser considerados como candidatos potenciales para ser utilizados como agentes terapéuticos, o que pueden ser empleados como herramientas para su desarrollo.

La diversidad, complejidad y especificidad de los venenos presentes en organismos unicelulares así como, en animales marinos y terrestres es muy amplia (Schmidt y col. 1984a y 1984b; Sosa col. 1986; Opperdoes y col. 1982, Van Den Bosh, H. 1980; Verheij y col. 1981). El almacenamiento y liberación del veneno varía de una especie a otra (Blum y col. 1978), del mismo modo, los efectos patológicos producidos son muy variados. Estos pueden ser desde una alergia, hinchazón (Cole, A.C., 1986; David y col. 1978; Schmidt y col. 1984b), elevación de la temperatura, etc, hasta la muerte del individuo (David y col. 1978; Schmidt y col. 1984b).

Los venenos están compuestos por una gran variedad de moléculas químicas entre las que se encuentran: compuestos alifáticos (hidrocarburos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, ácidos carboxílicos); compuestos cíclicos como fenoles y quinonas; compuestos algógenos como el ácido fórmico, serotonina, histamina, los alcaloides triterpénicos y algunos derivados glicosídicos (Blum y col. 1978; Schmidt, J.O., 1986; Wilson, E.O., 1971); además de, un amplio espectro de moléculas polipeptídicas (polipéptidos cortos, proteínas de peso molecular variado, básicas y termoestables, neurotóxicas de alto peso molecular y enzimas diversas) (Blum y col. 1978; Leluk y col. 1989; Schmidt, J.O., 1986; Schmidt y col. 1986b). Todos estos compuestos forman parte de una mezcla heterogénea en donde sus componentes actúan sinérgicamente y en la que no necesariamente se incluye toda la variedad mencionada.

b) La Hormiga *Pogonomyrmex*

Dentro del grupo de los insectos se encuentra el orden *Hymenoptera* que incluye a las avispas, abejas y hormigas. Este orden se divide a su vez en dos subórdenes, cada uno de los cuales está también dividido en familias y superfamilias. Las hormigas pertenecen al suborden *Aculeata* y a la familia *Formicidae*. En la actualidad se conocen 11 subfamilias, 297 géneros y aproximadamente 8800 especies de hormigas (Holldobler y col. 1990). Aunque con certeza no se conoce el total de especies que pueden existir en el mundo, se calcula que pueden ser 20, 000 o más especies, agrupadas en aproximadamente 350 géneros (Holldobler y col. 1990).

En general, las hormigas tienen una organización social compleja y jerárquica similar al de las abejas y avispas. Estos organismos eusociales poseen claras diferencias físicas separando, de esta manera, a las reinas de las trabajadoras. El tamaño de éstas es muy variado y va desde 6 mm hasta 9 mm (Holldobler y col. 1990; Schmidt y col. 1989a). El color de las hormigas también difiere de especie a especie (Holldobler y col. 1990; Schmidt y col. 1989a), existiendo combinación de colores, en algunos casos. Además, se encuentran ampliamente distribuidas y pueden vivir en casi todos los climas y regiones a excepción de los polos (Cole, A.C. 1968; Holldobler y col. 1990). El trabajo que realiza cada una de ellas está claramente dividido según

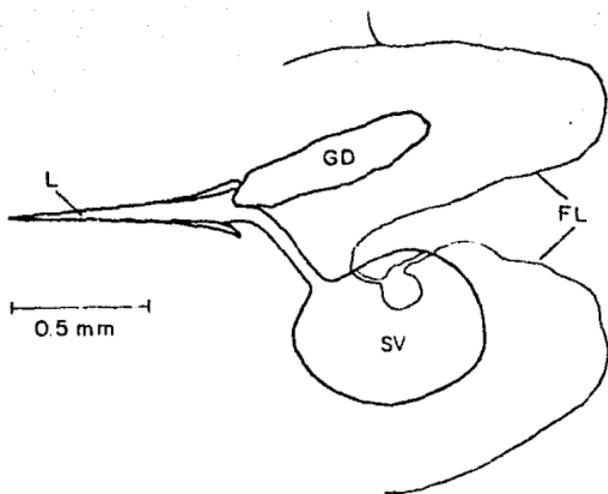
la casta a la que pertenecen (Holldobler y col. 1990).

Los estudios realizados hasta hace algunos años se enfocaron básicamente a la caracterización morfológica de estos organismos (Cole, A.C. 1968; Holldobler y col. 1990). Trabajos posteriores han sido encaminados a conocer más acerca de la biología, la distribución (Cole A.C. 1968; Holldobler y col. 1990, Schmidt col. 1989a), el comportamiento y la organización social de las hormigas (Evans y col. 1990).

Algunas de las investigaciones desarrolladas recientemente con ciertas clases de insectos son la genética evolutiva, los aspectos de la fisiología (Schmidt J.O. 1986), la bioquímica de la comunicación (Schmidt, J.O. 1982; Schmidt y col. 1978b), el control biológico de plagas y el estudio del veneno de algunos de ellos (Bernheimer y col. 1980; King y col. 1978; Leluk y col. 1989, Schmidt y col. 1978a y 1978b; Schmidt y col. 1984a y 1984b; Schmidt y col. 1983a y 1983b, Schmidt y col. 1989b). Este último campo tiene importancia en medicina porque el veneno de las hormigas (así como, el de otros himenópteros) es alergénico y en individuos susceptibles puede ocasionar daños severos (King y col. 1978; Schmidt y col. 1984b).

El veneno de las hormigas se produce en un par de glándulas filamentosas que convergen en una glándula coenvuelta que se comunica con el saco que acumula el veneno a través de un conducto delgado (Holldobler y col. 1990; Schmidt y col. 1989a; Von Sicaro y col. 1989) (Figura 1). Esta glándula está localizada en la parte dorsal de las hormigas. La principal función de la glándula venenosa en las hormigas es la producción de ácido fórmico y/o veneno, que es utilizado para su defensa o en contra de sus presas (Holldobler y col. 1990; Schmidt y col. 1989a).

Las hormigas del género *Pogonomyrmex* viven en grandes colonias y su alimentación consiste básicamente de semillas y hojas, es por esto que se les ha denominado como hormigas cosechadoras (Holldobler y col. 1990 y Schmidt y col. 1978). Los principales enemigos o predadores de las *Pogonomyrmex* son algunas especies de pájaros y lagartijas (Schmidt y col. 1989a), las cuales consumen grandes cantidades de hormigas en poco tiempo. Sin embargo, las *Pogonomyrmex* son una de las especies más agresivas y están consideradas



Schmidt y col. 1978a

FIGURA 1. APARATO VENENOSO DE LA HORMIGA COSECHADORA *Pogonomyrmex rugosus*. Abreviaciones: GD, glándula de Dufour's; FL, filamentos libres; L, lanceta; SV, saco del veneno.

como las que producen las picaduras más dolorosas e irresistibles de todas las hormigas que existen en América del Norte. Este género de hormiga se encuentra ampliamente distribuida en el sur de Estados Unidos y la parte norte de la República Mexicana (Cole y col. 1968; Schmidt y col. 1984b) (Figura 2). Aun cuando se sabe que su veneno es bastante doloroso, poco se conoce acerca de éste. Las investigaciones realizadas con el veneno de hormigas *Pogonomyrmex* ssp. *P. maricopa* (Leluk y col. 1989; Piek y col. 1989; Schmidt y col. 1984b; Schmidt y col. 1989b), *P. rugosus* (Leluk y col. 1989; Schmidt y col. 1984b), *P. badlus* (Schmidt y col. 1978a y 1978b; Schmidt y col. 1984a y 1984b; Schmidt y col. 1986b), *P. barbatus* (Bernheimer y col. 1980; Schmidt y col. 1984b), *P. wheeleri* (Piek y col. 1989), *P. californius* (Schmidt y col. 1984b), *P. montanus* (Schmidt y col. 1984b), *P. occidentalis* (Schmidt y col. 1984b), *P. subnitidus* (Schmidt y col. 1984b), *P. tenuispina* (Schmidt y col. 1984b), así como de otros géneros, revelan la presencia de una gran variedad de agentes alrogénicos, enzimas, compuestos aromáticos, etc. También se observó el efecto del veneno sobre el número y diferenciación de las células blancas en cobayos, así como los efectos inmunológicos y alrogénicos. Una de las hormigas del género *Pogonomyrmex* estudiada es la *P. badlus* (Schmidt y col. 1978a y 1978b, Schmidt y col. 1984a y 1984b; Schmidt y col. 1986b), el veneno de esta hormiga posee la característica de ser muy neurotóxico para algunos mamíferos y vertebrados. Los síntomas que presentan los animales utilizados en el ensayo muestran que el veneno actúa sobre el sistema nervioso central. Además este veneno también contiene una gran variedad de actividades enzimáticas entre las que se encuentran la fosfolipasa, la hialuronidasa, la lipasa, la esterasa, la fosfatasa ácida y la fosfatasa alcalina, principalmente. La actividad fosfolipásica del veneno de esta hormiga es más alta con respecto a las de otros géneros. Sin embargo, no se han realizado más estudios enzimáticos en otras especies del género *Pogonomyrmex*. Otro de los efectos relevantes de estos venenos es su toxicidad en ratones pues sabemos que su LD₅₀ es de 0.1-0.6 mg/kg de peso corporal en promedio. Debido a esto, se eligió trabajar con la hormiga *P. rugosus* ya que en nuestro laboratorio existe un marcado interés en la identificación y caracterización de nuevas toxinas a la par de otras actividades enzimáticas descritas para ésta y otras especies de hormigas (Schmidt y col. 1978a y 1978b; Schmidt y col. 1986b; Schmidt y col. 1989a).

FIGURA 2. DISTRIBUCION GEOGRAFICA EN MEXICO Y ESTADOS UNIDOS DE LA HORMIGA *Pogonomyrmex rugosus*.



Cole, A.C. Jr. 1968.

La zona sombreada indica la distribución geográfica de la hormiga *P. rugosus* en el sur de Estados Unidos y el norte de la República Mexicana.

c) Las Enzimas de los Venenos. Las Fosfolipasas.

Las enzimas juegan un papel muy importante en el efecto fisiopatológico provocado por los venenos ya que pueden dar lugar a efectos localizados como, daño a capilares o necrosis tisular mediado por proteasas, fosfolipasas y hialuronidasas. Otros efectos son el dolor e hipotensión aguda debido a la liberación de péptidos vasoactivos por la acción de enzimas liberadoras de cinasas (Schmidt y col. 1978a y 1978b). Otras actividades enzimáticas de los venenos que han sido reportadas son: nucleasa 5', fosfodiesterasa, colinesterasa, fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina y lipasa (Schmidt y col. 1986a y 1986b). Dentro de esta gran variedad de enzimas encontradas en los venenos, una de las enzimas que mejor se ha caracterizado es la fosfolipasa.

Las fosfolipasas son enzimas hidrolíticas, conocidas con el nombre genérico de esterases, ya que actúan sobre los enlaces éster de los fosfolípidos (Lehninger, A.L., 1979; Van Der Bosch, H., 1980). Se les considera enzimas ubicuas (Bosh, H.V.D.1974), por encontrarse intra o extracelularmente en todas las células en las que se les ha buscado. Estas enzimas son de vital importancia en ciertos procesos biológicos como: a) recambio de fosfolípidos en las biomembranas (Van Der Bosh, H., 1980; Shier, W.T. 1979), b) digestión en los fagosomas (Bosh, H.V.D., 1974), c) neurotoxicidad y citotoxicidad en venenos muy activos de hongos, insectos, arácnidos y reptiles (Chang y col. 1987), d) en procesos inflamatorios (Vadas y col. 1981) y e) en la producción de ácidos grasos libres. Además, son potentes alérgenos en las personas hipersensibles a la picadura de insectos (King y col. 1976; King y col. 1978; King y col. 1983).

La clasificación de las fosfolipasas se ha realizado de acuerdo con la posición del éster que es capaz de hidrolizar (sitio de corte) (Figura 3) (Bosh, H.V.D. 1974; Lehninger, A.L., 1979; Van Der Bosh, H., 1980). Las fosfolipasas más comunes se dividen en la siguiente forma: A₁, A₂, B, C y D. Esta clasificación es ampliamente utilizada además de haber sido aprobada por la comisión de Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica.

Las fosfolipasas del tipo A₁, son aquellas enzimas que hidrolizan la posición 1-fosfoglicérido, liberando el ácido graso de la posición 1 y un lisoderivado (monoacil-2-glicero-fosfátido) en forma equimolar (Bosh, H.V.D., 1974; Lehninger, A.L., 1979; Van Der Bosh, H., 1980), este tipo de enzimas se les ha encontrado en células procariotas y en células eucariotas. En general, no requieren calcio para su actividad.

Las fosfolipasas del tipo A₂, son enzimas lipolíticas que hidrolizan la posición 2-acil de un fosfoglicérido, produciendo un ácido graso y su derivado (monoacil-1-glicero-fosfátido) en forma equimolar. Una gran parte de este tipo de fosfolipasas han sido aisladas principalmente de páncreas de mamíferos, venenos de serpientes, venenos de abejas y otros microorganismos (Bosh, V.D., 1974; Lehninger, A.L., 1979; Van Der Bosh, H., 1980; Hawthorne y col. 1982). En general, estas fosfolipasas se caracterizan por ser termoestables y por su capacidad para actuar en disolventes orgánicos (Wells, M.A., 1974; Oda y col. 1987). Se les ha localizado extracelularmente en forma soluble, asociadas a membranas plasmáticas o lisosomales y también en forma soluble en lisosomas y en el citosol. Muchas de ellas requieren de calcio como cofactor.

Las fosfolipasas del tipo B, conocidas por varios autores también como lisofosfolipasas (Bosh, H.V.D., 1974; Lehninger, A.L., 1979; Van Der Bosh, H., 1980; Hawthorne y col. 1982), equivalen a una combinación de dos actividades de fosfolipasa, la A₁ y A₂ (Bosh, V.D., 1974; Lehninger, A.L., 1979; Van Der Bosh, H., 1980; Hawthorne, y col. 1982). Se les ha encontrado en levaduras (Khimasa y col. 1984), hongos y bacterias (Doi y col. 1972; Takeuchi y col. 1987; Sugatani y col. 1984). Su pH óptimo es generalmente alcalino.

Las fosfolipasas del tipo C, catalizan la desacilación de diacilglicero-fosfolípidos en 1,2-diacilglicerol y fosforilcolina (Lehninger, A.L., 1979; Van Der Bosh, H., 1980; Hawthorne y col. 1982). Son producidas por ciertas bacterias que las excretan o están asociadas a membranas en células vegetales, algas y levaduras (Bosh, H.V.D., 1974; Van Der Bosh, 1980; Hawthorne y col. 1982; Rosenberg, P., 1976; Snyder, W.R., 1987).

Las fosfolipasas del tipo D, catalizan la hidrólisis del enlace éster arriba del fosfato.

produciendo una molécula de colina y una de 1,2-diacilgliceril-fosfátido (Bosh, H.V.D., 1974; Lehninger, A.L., 1979; Van Der Bosh, H., 1980; Hawthorne y col., 1982). A esta enzima se le ha encontrado principalmente en plantas, levaduras y bacterias.

Las lisofosfolipasas, catalizan la hidrólisis del aciléster de los fosfolisoderivados completando la desacilación de los fosfoglicéridos (Bosh, H.V.D., 1974; Lehninger, A.L., 1979; Van Der Bosh, H., 1980; Hawthorne y col. 1982). En general, estas enzimas realizan el catabolismo de los fosfolípidos en las células. Se les ha descrito en insectos, plantas y bacterias (Bosh, H.V.D., 1974; Hawthorne y col. 1982; Rosenberg, P., 1976; Lowenstein, J.M., 1959). La mayor parte de ellas no requieren cofactores metálicos y generalmente son inhibidas por detergentes (Bosh, H.V.D., 1974).

OBJETIVO.

Caracterización y purificación de la actividad fosfolipásica del veneno de la hormiga *Pogonomyrmex rugosus*.

MATERIALES Y METODOS.

a) Obtención del veneno.

El veneno de la hormiga fue obtenido del Southwestern Biological Institute, 1961 W. Brichta, Tucson, AZ5745, USA., con la participación del Dr. Justin Schmidt. Este veneno se obtuvo disecando el abdomen de la hormiga para sacar el aguijón y el saco de veneno. Tanto el aguijón como el saco de veneno fueron lavados en agua destilada y posteriormente el saco se presionó mecánicamente para obligar al veneno a salir por el aguijón, éste fue colectado con la ayuda de un tubo capilar. Una vez colectado el veneno se liofilizó.

b) Medición de proteína.

La concentración de proteína se determinó espectrofotométricamente asumiendo que una unidad de absorbancia a 280 nm equivale a 1 mg/ml de proteína soluble.

c) Electroforesis a pH ácido y alcalino en presencia de urea.

Para la determinación del número de componentes protéicos presentes en el veneno crudo y las diferentes fracciones cromatográficas obtenidas se realizó electroforesis en geles cilíndricos de poliacrilamida al 7.5 % en el sistema de acetato/urea en amortiguador de β -Alanina/Acético pH 4.42 (Reisfeld y col. 1962) y en el sistema de Tris/Urea en amortiguador de Tris-glicina pH 8.3 (Jovin y col. 1964). Las bandas de proteína se tiñeron con azul brillante de Coomassie G-250 (Reisner y col. 1975).

d) Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS).

Las electroforesis en placa de geles de poliacrilamida en presencia de SDS y en condiciones no reductoras (Laemmli, U.K., 1970), sirvieron para evaluar el número de componentes presentes en el veneno crudo y en cada uno de los pasos de purificación realizados en las columnas de exclusión molecular, de intercambio iónico y de afinidad. Los geles fueron teñidos con azul brillante de Coomassie G-250 (Reisner y col. 1962) y/o con plata (Merrill y col.1981). Por este método, también se

determinaron las masas moleculares de cada uno de los componentes del veneno, comparándolas con proteínas de masa molecular conocida.

Para la detección de la actividad de fosfolipasa después de la electroforesis, el SDS fue sustituido por Tritón X-100 mediante 2 lavados de 1 hr en 0.05 M de Tris-HCl pH 7.95 + 5 % de Tritón X-100, seguido de otro lavado durante el mismo tiempo y en el mismo amortiguador pero con 0.5 % de Tritón X-100. Después de lavar el gel con amortiguador sin Tritón, se colocó sobre otro gel de agarosa con sustrato y rodamina (ver más adelante, en Actividad de fosfolipasa).

Pasos cromatográficos:

e) Cromatografía de exclusión molecular.

Se utilizó Sephadex G-50 grado medio obtenido de Pharmacia Fine Chemicals (Uppsala, Sweden) hidratado y preparado de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las dimensiones de la columna utilizada fueron de 0.9 X 200 cm. El gel fue equilibrado con amortiguador de acetato de amonio 0.02 M pH 4.7 antes de ser empacado por gravedad y el flujo fue de 40 ml/hr. La cromatografía se llevó a cabo a presión constante. Se dió un pulso de 5 ml de NaCl 1 M al final de la corrida con el objeto de eluir el material adsorbido inespecíficamente.

f) Cromatografía de afinidad.

La purificación de la fosfolipasa a partir del veneno crudo así como de la fracción obtenida de la cromatografía de filtración e intercambio iónico se realizó utilizando una columna de afinidad preparada de la siguiente forma (Vargas-Villarreal y col. 1991): 2.5 g de Sepharosa 4B activada con bromuro de cianógeno, obtenida de Pharmacia Fine Chemicals (Uppsala Sweden), fueron lavados con 200 ml de amortiguador de carbonato-bicarbonato de sodio 0.1 M pH 9.0. Posteriormente el gel se mezcló con 15 ml del mismo amortiguador más 131 mg (1 mmol) de ácido 6-aminohexanoico. Esta reacción se llevó a cabo durante 24 hr con agitación constante y a temperatura ambiente. Luego el gel se lavó con 100 ml de amortiguador de carbonato-bicarbonato de sodio 0.1 M pH 9.0, 100 ml de agua destilada y 200 ml de

dioxano libre de peróxidos sucesivamente. La Sepharosa 4B-amino-hexil-carboxílico sintetizada se resuspendió en 10 ml de dioxano-cloroformo 1:1 (v/v), que contenía 206 mg (1 mmol) de 1,3 dicitclohexil-carbodiimida, 75 mg (0.1 mmol) de inhibidor de Rosenthal (acetato de dimetil-DL-2,3-diestearoil-oxipropil-2'-hidroxietil-amonio) y 49 mg (0.4 mmol) de 4-dimetilaminopiridina. Esta mezcla se agitó durante 24 hrs a temperatura ambiente. Finalmente se realizaron tres lavados con: 50 ml de dioxano-cloroformo 1:1 (v/v), 50 ml de cloroformo, 50 ml de 2-propanol, 100 ml de dioxano y 200 ml de agua destilada. El gel, una vez activado y acoplado al inhibidor de Rosenthal se conserva en una solución de metanol al 50 % en refrigeración. El gel de afinidad fué empacado en una columna de 0.75 X 2.4 cm y equilibrado con 10 volúmenes de amortiguador de Tris-HCl 0.05 M pH 7.95. El sistema de lavado y elución utilizado en la cromatografía de afinidad fue el siguiente: Tris HCl 0.05 M pH 7.95 + NaCl 0.5 M y ácido acético 0.1 M. Las fracciones eluidas con ácido acético 0.1 M fueron recibidas en tubos que contenían 1 ml de amortiguador de Tris 1 M pH 8.0 para neutralizar las muestras, que fueron refrigeradas inmediatamente.

g) Cromatografía de Intercambio iónico.

La resina utilizada en esta cromatografía fue la CM-32 (Carboximetil Celulosa) obtenida de Whatman Ltd (Springfield Mill, Maidstone, Kent, England). El procesamiento de la resina se llevó a cabo conforme a las instrucciones del fabricante. La columna de 0.9 X 10.3 cm fue empacada a presión con nitrógeno aproximadamente a 15 psi y su corrimiento se realizó con una bomba peristáltica tipo Milton Roy de flujo controlado. La columna fué equilibrada con amortiguador de acetato de amonio 20 mM pH 4.7. La elución del material adsorbido al intercambiador iónico se realizó con un gradiente de 50 ml de NaCl de 0 a 0.8 M y un pulso final de 20 ml de NaCl 1 M. La velocidad de flujo fue de 34 ml/hr.

h) Pruebas de toxicidad.

La toxicidad del veneno crudo y de las fracciones obtenidas de la columna de filtración se probó en ratones, grillos e isópodos (cochinillas de jardín). La cantidad de proteína que se administró por vía intraperitoneal a los ratones y dorsal a los grillos e isópodo fué de 100, 10 y 10 µg, respectivamente. Se utilizaron ratones albinos de la cepa BALB/c con un peso corporal de 30-40 g, cochinillas, con un peso corporal de

125 mg y grillos con un peso corporal de 630 mg. Para los ratones, el veneno total y las fracciones fueron consideradas letales, si produjeron la muerte del animal, tóxico, si sólo inducía algún tipo de efecto (excitabilidad, taquicardia, problemas respiratorios, convulsiones, salivación, etc.) pero no la muerte; y no tóxico, cuando no produjeron efectos detectables o cuando el comportamiento del animal era semejante al del control al que sólo se le aplicó agua destilada. En el caso de los insectos se consideró letal, cuando el animal se murió; tóxico, si producía parálisis en las patas aunado a un estado de inactividad; y no tóxico, cuando no presentó sintomatología. Todos los animales se mantuvieron en observación por un período de 24 hrs.

i) Actividad fosfolipásica.

La actividad de fosfolipasa se determinó titulométricamente utilizando como sustrato yema de huevo al 10 % (p/v) en una solución amortiguadora de Tris HCl 1 mM pH 7.95, 0.005 M de cloruro de calcio y 0.05 % de Triton X-100 (King y col. 1983). Este método cuantifica la cantidad de hidróxido de sodio utilizado para mantener el pH de la mezcla de ensayo por un periodo de tiempo determinado, el cual es proporcional a la cantidad de los ácidos grasos liberados y por lo tanto, a la cantidad de enzima.

Otro método utilizado para la detección de fosfolipasas son los geles de agarosa al 1% en amortiguador de Tris-HCl 0.2 M pH 7.95, 5 mM de cloruro de calcio y 0.5 % de Tritón X-100 que contiene como sustrato yema de huevo al 10 % y rodamina G-6 al 0.1 %. La actividad de fosfolipasa se identifica por los halos de fluorescencia apagados, bajo luz UV, en torno al pozo donde se coloca la muestra (Reynaud y col. 1990). El procedimiento es cuantitativo cuando se compara con muestras valoradas por el método titulométrico.

j) Determinación del tipo de fosfolipasa.

El sustrato radioactivo con el que se determinó el tipo de fosfolipasa, el L-1,2-d[1-¹⁴C]palmitoil-3-fosfatidilcolina ([¹⁴C]FC) (Oppendoes y col. 1982) fue diluido con fosfatidilcolina (FC) de yema de huevo a una concentración específica de 1.8 mCi/mol y solubilizado en presencia de 0.4 % de Tritón X-100. Esta mezcla se diluyó 1:1 (v/v) con la muestra de veneno completo de *P.rugosus*. El volumen del ensayo fué de 0.02 ml y contenía: 0.1 M de Tris-HCl pH 8.0, 0.138 mM de FC, 0.2 % de Tritón X-100 y

la muestra. La reacción se detuvo con 25 μ l de una mezcla que contenía 0.75 mg/ml de fosfatidilcolina (FC), 1 mg/ml de ácidos grasos libres (AGL) y 1 mg/ml de lisofosfatidilcolina (LFC) y TCA al 5 % en butanol. La separación de cada uno de los componentes obtenidos en la reacción enzimática se realizó mediante la técnica de cromatografía en capa fina. Una vez que se aplicaron 25 μ l de cada una de las muestras en las placas de sílica gel (Watman de borosilicato, 10 X 10 X 1 cm), las placas se colocaron en una cámara cerrada que contenía la mezcla de disolventes, cloroformo-metanol-acético-agua, 170:40:16:8, para la separación de los lípidos polares. Después de la separación de cada uno de los componentes a los que da lugar el sistema, la placa se colocó en una cámara saturada con vapor de yodo con lo cual, las manchas lipídicas se revelaron como puntos amarillos o café. Finalmente, las manchas lipídicas fueron raspadas y mezcladas con 5 ml de líquido de centelleo (2-5 difeniloxazol (PPO) al 6 % en tolueno) en frascos de borosilicato de 20ml. La cuantificación se realizó en un contador de centelleo líquido (Beckman Instrument Inc. modelo LS 9.800 Irvine, California. EUA) a una eficiencia del 88 %.

k) Concentración de proteína por centrifugación.

La fracción con actividad fosfolipásica que se obtuvo de la columna de afinidad después de pasar por el intercambiador iónico, fue concentrada por centrifugación (20 min a 2000 x g) utilizando filtros Ultrafree Mc Filters (UF C3 LGC Millipore Bedford, MA., USA) con un límite de exclusión de 10,000.

l) Transferencia de proteínas (Western-blot).

La fracción de proteína concentrada por centrifugación se corrió en un gel de poliacrilamida-SDS al 12.5 % y se transfirió a una membrana inmobilon PVDF (Millipore 000 10 Bedford, MA., USA) con el objeto de realizar la secuencia de aminoácidos en este soporte. Después de la electroforesis, el gel y la membrana inmobilon se incubaron por separado en amortiguador de Tris 25 mM, Glicina 192 mM y Metanol al 20 % pH 8.3 durante 15 min con agitación constante. Una vez terminado el tiempo de incubación, se realizó la electrotransferencia en un aparato Hoefer (Scientific Instrument 654 Minnesita St., San Francisco 94107, USA), con el mismo amortiguador (Towbin y col., 1979). La transferencia se realizó durante toda la noche a 50 volts. y la tinción de la membrana se realizó con negro de amido (Kuno y col. 1967).

m) Secuencia de aminoácidos.

Se hicieron dos intentos de secuenciación de la fosfolipasa por dos sistemas diferentes. La primera en fase líquida y la segunda, en fase sólida. Ambas secuencias se realizaron en el laboratorio del Dr. Brian M. Martin del National Institute of Health, National Institute of Neurological and Communicative Disorder and Stroke, Bethesda MD., 20205, USA. Se llevó a cabo la degradación de Edman automatizada de la fosfolipasa de la hormiga, utilizando un secuenciador de fase-líquida Beckman modelo 890M. El instrumento 890M, que puede manejar muestras tan pequeñas como de 0.2 nmoles, convierte automáticamente el derivado ftiazolinona de cada aminoácido en su derivado feniltiohidantoína.

Se realizaron los siguientes procedimientos con el instrumento 890M. Se compraron reactivos grado secuencia de Beckman Instruments (Palo Alto, CA., USA). Se facilitó la retención de la película peptídica en la copa giratoria de reacción, añadiendo Polibreno (3mg) en agua (0.10 ml) al comienzo de cada secuenciación. El Polibreno fue liberado de impurezas por un tratamiento previo en la copa giratoria de reacción, utilizando dos ciclos de Polibreno (Beckman, programa 1) y tres ciclos de péptido Quadrol (programa 3). Las muestras peptídicas fueron aplicadas a la copa giratoria de reacción en 30% de ácido acético (v/v), secadas al accionar la subrutina de comienzo (no. 347339) y condicionadas al correr el ciclo de Polibreno. Se llevó a cabo la degradación repetitiva de Edman con el programa 3, utilizando benceno como solvente S1 y etil acetato que contiene ácido acético libre de aldehídos (1ml/l) y ditiotretitol (10 mg/l) como solvente S2.

Se identificaron los aminoácidos feniltiohidantoína-derivados resultantes por cromatografía en fase reversa de cerca del 40% de cada muestra, en una columna de octadecilsilano Ultrasphere (0.46 cm X 25 cm) de Altex Beckman, con un sistema de HPLC Hewlett-Packard modelo 1084B equipado con un detector de UV de longitud de onda variable, fijado a 269 nm. Se identificaron los derivados feniltiohidantoína de serina y treonina inicialmente por sus tiempos de retención y sus productos de degradación característicos. Esta determinación fué confirmada por la identificación de sus derivados deshidratados, a 320 nm (Hawke y col., 1982). Se corrió una mezcla de aminoácidos feniltiohidantoína-derivados (Pierce Chemical Co, Rockford, IL, U.S.A.) que contenían dietilftalato como estándar interno a un nivel de 100 pmoles, para estandarización. Con el sistema amortiguador de Hawke y col. (1982), la mezcla

fué separada completamente en menos de 13 min. Aunque el ruido de fondo fué lo suficientemente bajo como para que 20 pmoles de un aminoácido feniltiohidantoín-derivado pudiera ser identificado, se secuenciaron más de 35 μg de fosfolipasa.

La secuencia en fase sólida se realizó en un secuenciador Milligen/Biosearch (Millipore) ProSequencer Modelo 6600.

RESULTADOS.

CARACTERIZACION ELECTROFORETICA DEL VENENO DE *P. rugosus*.

a) Electroforesis en presencia de urea.

El veneno crudo de la hormiga se solubilizó en amortiguador de acetato de amonio 0.02 M pH 4.7 a una concentración de 1 mg/ml de proteína. Se aplicaron 50 y 100 μ l del veneno crudo soluble a geles cilíndricos de poliácridamida en el sistema Tris-glicina, los cuales mostraron ocho bandas protéicas distribuidas a lo largo del gel (Figura 4). En esta figura se puede apreciar que las bandas 1, 2, 3, 4, 5 y 8 están intensamente teñidas y las bandas 6 y 7 están débilmente teñidas.

La electroforesis realizada en geles de poliácridamida en tubo en el sistema β -alanina-acético, reveló la presencia de nueve bandas evidentes de proteína, localizadas en la parte media del gel (Figura 5). Las bandas 3, 4, 5 y 8 son las más intensas.

b) Electroforesis en presencia de SDS.

En el patrón electroforético obtenido en placa de geles de poliácridamida-SDS al 12.5 % en condiciones no reductoras (Figura 6), se observan por lo menos 15 bandas de proteína a todo lo largo del gel. Podemos observar que la proteína más abundante corresponde a la banda 8 y tiene una masa molecular de aproximadamente 35 kDa.

c) Detección de la actividad de fosfolipasa en geles de agarosa-rodamina G-6.

La actividad fosfolipásica del veneno de la hormiga, principal objeto de estudio del presente trabajo, se detectó sobreponiendo el patrón electroforético obtenido en geles de poliácridamida-SDS al 12.5 % sobre un gel de agarosa rodamina. En la Figura 7, podemos observar las formadas en el gel de agarosa-rodamina por efecto de la degradación de los fosfolípidos presentes en la placa. En el carril 7 se puede observar la actividad fosfolipásica del veneno de la hormiga, misma que tiene una masa molecular de aproximadamente 35 kDa la cual es mayor que el resto de de las fosfolipasas de los venenos utilizados como controles.

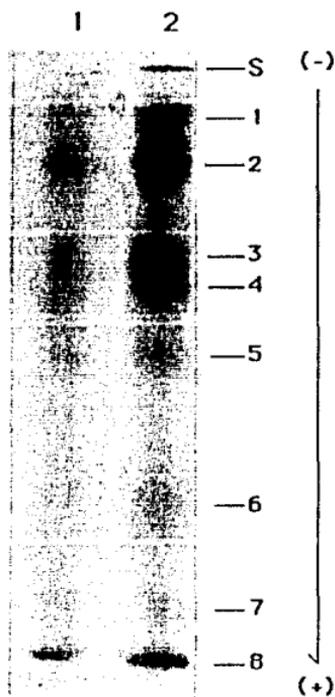


FIGURA 4. ELECTROFORESIS EN PRESENCIA DE UREA A pH 8.3 DEL VENENO CRUDO DE LA HORMIGA *Pogonomyrmex rugosus*. Se aplicaron 50 µg (tubo 1) y 100 µg (tubo 2) del veneno total a geles cilindricos de poliacrilamida (6.5 cm, 4 mA por tubo) que contenian 8 M de urea y amortiguador de Tris glicina pH 8.3 y luego se tiñeron con azul de coomassie. S es el punto de aplicación de las muestras. El gel se tiñó con azul de Coomassie.

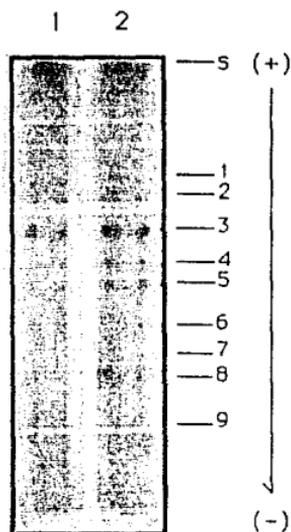


FIGURA 5 ELECTROFORESIS EN PRESENCIA DE UREA Y pH 4.7 DEL VENENO CRUDO DE LA HORMIGA *P. rugosus*. Se aplicaron 50 (tubo 1) y 100 µg (tubo 2) del veneno crudo a geles cilindricos de poli-acrilamida acetato-urea al 7.5 %. Las proteínas corren hacia el cátodo en un amortiguador de β alanina-acético pH 4,42. S indica el punto de aplicación. El gel se tiño con azul de Coomassie.

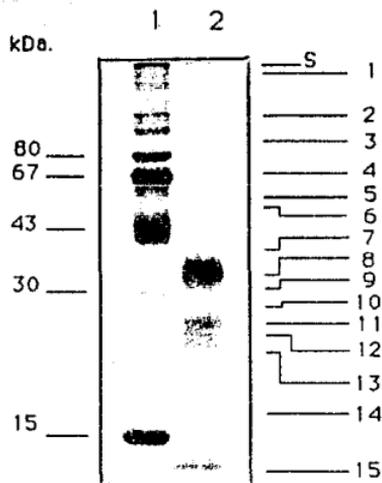


FIGURA 6. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA-SDS AL 12.5 % DEL VENENO CRUDO DE LA HORMIGA *Pogonomyrmex rugosus*. Se aplicaron 10 μ l del veneno crudo con una concentración de proteína de 1 mg/ml. En el carril 1 se muestran los marcadores de peso molecular y en el carril 2 el veneno total de la hormiga. S corresponde al inicio del gel. El gel se tiñó con azul de Coomassie.

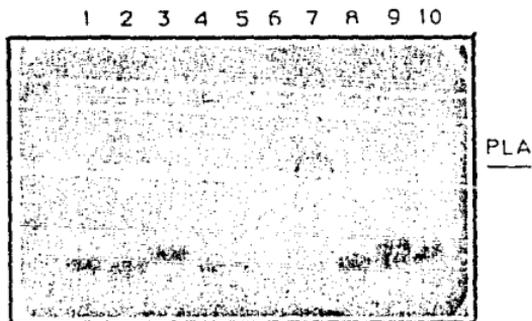


FIGURA 7. DETECCION DE LA ACTIVIDAD DE FOSFOLIPASA EN GELES DE AGAROSA-RODAMINA G-6. La actividad de fosfolipasa fué detectada utilizando geles de agarosa-rodamina que contenían como sustrato yema de huevo, al poner en contacto el gel de poli-acrilamida-SDS (lavado con Tritón X-100 al 5 %) con el gel de agarosa-rodamina. Se observa claramente la formación de halos debidos a la degradación de fosfolípidos por la fosfolipasa y al cambio de fluorescencia de la rodamina. En el carril 7 se muestra la actividad fosfolipásica del veneno total de la hormiga *Pogonomyrmex rugosus*. En los carriles 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9 y 10 se muestran los venenos crudos de otros animales que también contienen actividad de fosfolipasa.

d) Especificidad fosfolipásica del veneno de la hormiga *P. rugosus*

De los ensayos realizados con el sustrato marcado radioactivamente con carbono 14 (en el carbono del grupo carboxilo del ácido graso en la posición uno) y el veneno de la hormiga, se puede concluir que esta fosfolipasa es de tipo A₁. En la Figura 8 se muestra como, a medida que pasa el tiempo se va liberando marca radioactiva en los ácidos grasos libres, mientras que en el lisoderivado no hay radioactividad.

PRIMER ESQUEMA DE PURIFICACION DE LA FOSFOLIPASA DEL VENENO DE *P. rugosus*.

e) Cromatografía de exclusión molecular.

5.79 mg del veneno crudo de la hormiga se solubilizaron en amortiguador de acetato de amonio 0.02 M pH 4.7 y se centrifugaron a 14 000 rpm durante 5 min. a temperatura ambiente. El veneno soluble se fraccionó en una columna de filtración de Sephadex G-50 grado medio, de la cual se obtuvo un perfil cromatográfico que se dividió en cinco fracciones (Figura 9). En la Tabla I se dan los porcentajes de recuperación de proteína de las diferentes fracciones que, en conjunto fue muy buena (97%). La fracción V se obtuvo al aplicar un pulso de 5 ml de cloruro de sodio 1 M. Toda la actividad fosfolipásica, se encontró en esta fracción (actividad recuperada) Este comportamiento de la enzima en la columna de Sephadex G-50, sugiere que posee una carga eléctrica positiva a pH 4.7. Esta bien establecido que el Sephadex conserva una densidad de cargas negativas por grupos carboxilos, que se pueden intercambiar con proteínas de elevada basicidad, o que las proteínas cargadas positivamente interaccionan con la matriz del gel retardando su elución de la columna.

El análisis electroforético de las distintas fracciones se muestra en la Figura 10. Llama la atención que la fracción V (carril 7) reproduce en buena medida el patrón electroforético del veneno crudo (carril 2) y que con excepción de la fracción I, el resto de las fracciones no dan bandas definidas dentro del rango de resolución del gel. El peso molecular de la banda de la fracción I (aproximadamente 25,000 Da.) no corresponde con el esperado por su posición de elución en la columna de filtración

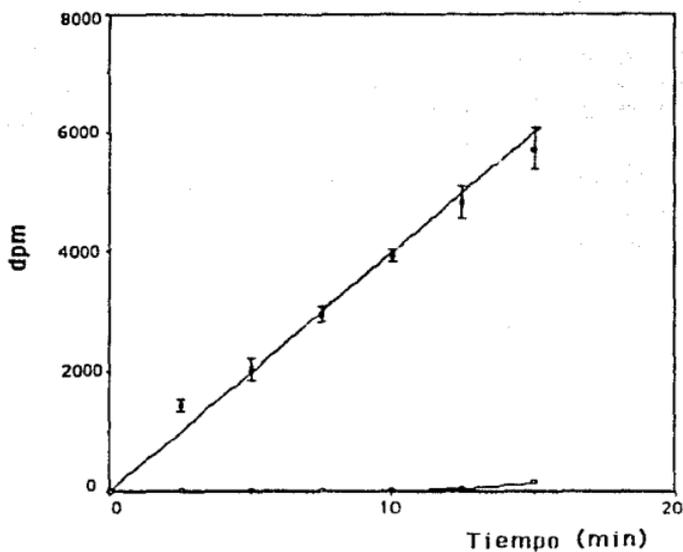


FIGURA 8. ESPECIFICIDAD DE LA FOSFOLIPASA DEL VENENO DE LA HORMIGA *P. rugosus*. El tipo de fosfolipasa y/o la presencia de lisofosfolipasa en el veneno completo de la hormiga fue determinado de acuerdo al método de Oppendoerf y col. (1982). El (•) representa a los AGL y los (') representan a la LFC.

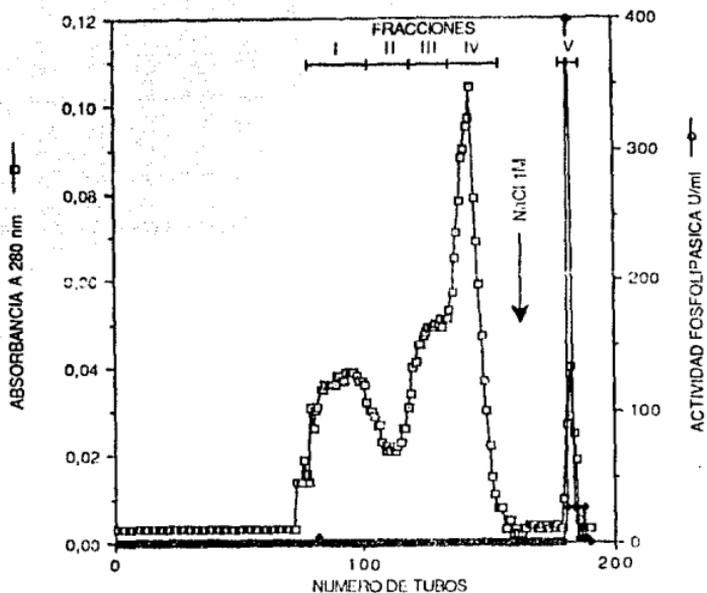


FIGURA 9. FRACCIONAMIENTO DEL VENENO CRUDO DE LA HOORMIGA *Pogonomyrmex rugosus*. A una columna de 0.9 X 200 cm empacada con Sephadex G-50 (grado medio) y equilibrada con amortiguador de acetato de amonio 0.02 M pH 4.7, se aplicaron 5.79 mg de proteína total del veneno crudo. La velocidad de flujo fue de 40 ml/hr y se colectaron fracciones de 1 ml. Las líneas horizontales indican, los cortes que se hicieron del perfil cromatográfico y el número de cada una de las fracciones. El último pico se obtuvo al aplicar un pulso de 5 ml de 1 M de NaCl.

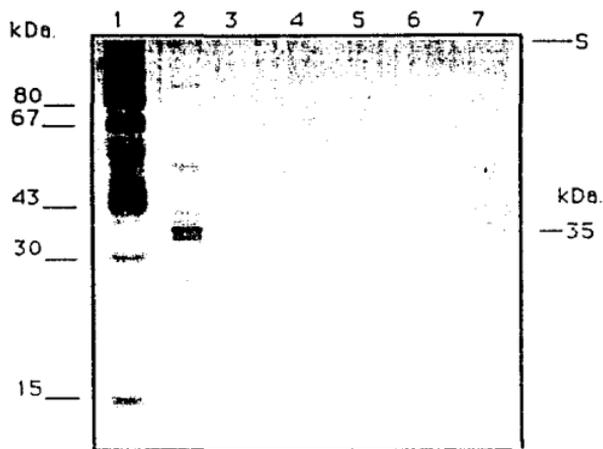


FIGURA 10. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA-SDS AL 12.5 % DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS DE LA COLUMNA DE SEPHADEX G-50. Se aplicaron 5 μ g de proteína de cada una de las fracciones obtenidas de la columna de filtración (Figura 9). En el carril 1 se muestran, los marcadores de peso molecular; en el carril 2, 5 μ g del veneno crudo de la hormiga *P. rugosus* y en los carriles 3, 4, 5, 6, y 7, las fracciones FI, FII, FIII, FIV y FV, respectivamente. S corresponde al punto de aplicación de las muestras. El gel se tiñó con plata.

en gel, de donde se hubiera concluido que era de mayor peso molecular. Una posible explicación es que la proteína principal de la Fracción I se comporte como un multímero en condiciones nativas (en la filtración en gel) y que en presencia de SDS se manifiesta como monómero. El resto de las fracciones (II a IV) muestran material de muy bajo P.M (< 10,000) que migra con el frente electroforético.

**TABLA I RECUPERACION EN MASA DE LAS FRACCIONES
CROMATOGRAFIA OBTENIDAS DE COLUMNA DE SEPHADEX G-50^a**

FRACCIONES	CANTIDAD RECUPEFADA (mg)	% DE RECUPERACION	ACTIVIDAD FOSFOLIPASA ^b
I	0.89	15.4	-
II	0.33	5.4	-
III	1.43	24.7	-
IV	2.22	38.4	-
V	0.75	12.9	+
Total	5.61	97.0	

^a Se aplicaron 5.79 mg de veneno crudo.

^b Determinada cualitativamente por el método de la placa de agarosa/yema de huevo/rodamina.

f) Pruebas de toxicidad en mamíferos, grillos e isópodos.

Continuando con la caracterización de las fracciones obtenidas de la columna de Sephadex G-50, se probó su toxicidad así como, la del veneno crudo de hormiga en diferentes especies de animales. Se encontró que el veneno crudo es letal tanto para ratones como isópodos (cochinillas de jardín) y es tóxico para los grillos (Tabla II). Las fracciones I y II, en las dosis ensayadas, produjeron sintomatología tóxica en ratones y fueron letales para las cochinillas; no tuvieron efectos aparentes en grillos. La fracción V fue inócua para el ratón y activa en los grillos e isópodos

TABLA II. EFECTO TOXICO DEL VENENO DE LA HORMIGA *Pogonomyrmex rugosus* Y DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS DE LA COLUMNA DE SEPHADEX G-50 EN DIFERENTES ESPECIES DE ANIMALES^a.

ESPECIE	VENENO TOTAL.	FRAC. I	FRAC. II	FRAC. III	FRAC. IV	FRAC. V
RATON (3.3µg/g)	LETAL	TOXICO	TOXICO	NO TOXICO	NO TOXICO	NO TOXICO
GRILLO (16µg/g)	TOXICO	NO TOXICO	NO TOXICO	TOXICO	NO TOXICO	TOXICO
ISOPODO (80µg/g)	LETAL	LETAL	LETAL	NO TOXICO	TOXICO	LETAL

LETAL - Cuando el organismo se muere.

^a TOXICO - En el ratón quiere decir la presencia de alguno o más de los siguientes síntomas: contracciones por dolor, salivación abundante, dificultad para respirar, inactividad, pero sin ocasionar la muerte durante el tiempo de observación. En los grillos e isópodos se evaluó por la presencia de parálisis de las patas aunado a un estado de inactividad profundo.

NO TOXICO - no presenta sintomatología.

g) Cromatografía de afinidad.

Con el fin de lograr una preparación más pura de fosfolipasa, la fracción V de la columna de filtración en gel fue mezclada con un volumen igual de amortiguador de Tris-HCl 0.2 M pH 7.95, para diluir la sal de la muestra y ajustar el pH de la solución. Esta muestra, conteniendo 748 µg de proteína, se aplicó en una columna de afinidad de Sepharosa 4B-inhibidor de Rosenthal. En la Figura 11, se muestra el perfil cromatográfico que se obtuvo y como se puede observar, algunos componentes

ESTA COPIA NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

protéicos no se adsorbieron a la resina y por lo tanto salen primero. Cuando se aplicó cloruro de sodio en alta concentración no se despegó material alguno. La elución del material con actividad de fosfolipasa se logró con 0.1 M de ácido acético y la actividad fue determinada tanto por el método de agar/yema de huevo/rodamina como el titulométrico. En la Tabla III se dan los porcentajes de recuperación de la columna de afinidad. En esta tabla se puede ver que el 25 % de la proteína aplicada a la columna de afinidad correspondió a la fracción C con toda la actividad enzimática.

TABLA III RECUPERACION DE LAS FRACCIONES CROMATOGRÁFICAS OBTENIDAS DE LA SEPARACION DE LA FRACCION V EN SEPHAROSA 4B-INHIBIDOR DE ROSENTHAL^a

FRACCION	CANTIDAD RECUPERADA (µg)	% DE RECUPERACION	ACTIVIDAD FOSFOLIPASICA ^b
A	505	67.5	-
B	55	7.4	-
C	188	25.1	+
Total	748	100.0	

^a Se aplicaron 748 µg de la Fracción V

^b Determinado cualitativamente por el método de la placa de agar/yema de huevo/rodamina.

En la Figura 12 se muestra el patrón electroforético obtenido en gel de poliacrilamida-SDS al 12.5 % de algunas de las fracciones de la columna de afinidad. Como se puede observar, las muestras de la proteína que no se unieron a la resina no presentan bandas, probablemente debido a que la masa aplicada no fue suficiente para su detección. La fracción con actividad de fosfolipasa muestra una banda principal con cierto barrido hacia arriba y abajo. El barrido pudiera deberse a un comportamiento anómalo de la proteína en el sistema electroforético, como ocurre

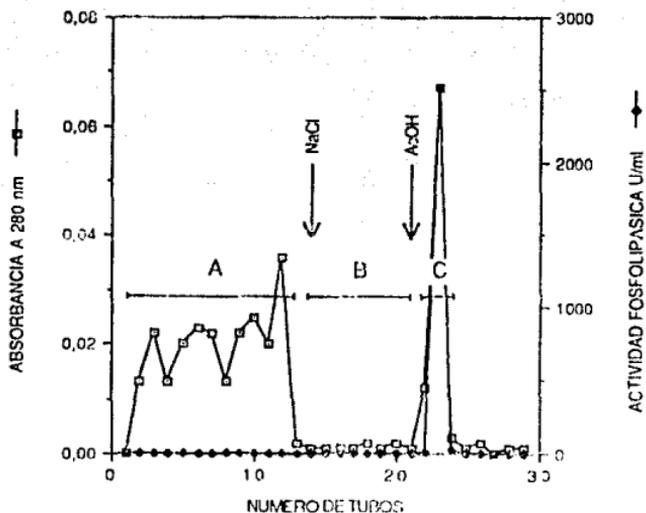


FIGURA 11. CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD DE LA FRACCION V. La fracción V obtenida de la columna de filtración en Sephadex G-50 (Figura 9) se aplicó a una columna de afinidad (0.7 X 2.5 cm) de Sepharosa 4B inhibidor de Roenthal equilibrada previamente con amortiguador Tris HCl 0.05 M pH 7.95. Después de aplicar la muestra, la columna se lavó con Tris HCl 0.05 M pH 7.95 + NaCl 0.5 M y se llevó a cabo la elución de la fosfolipasa con ácido acético 0.1 M. Las fracciones eluidas con ácido acético fueron colectadas en tubos que contenían 1 ml de amortiguador de Tris HCl 1 M pH 8.0 e inmediatamente refrigeradas. Las líneas horizontales indican los cortes que se hicieron del perfil cromatográfico, al margen derecho, se señala la actividad de fosfolipasa.

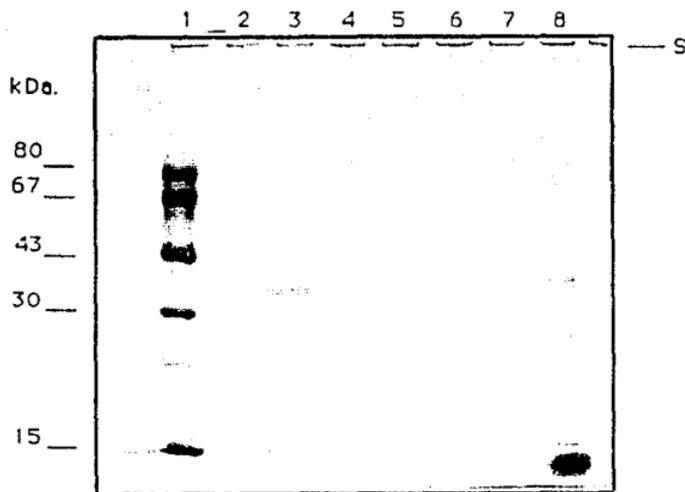


FIGURA 12. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA-SDS AL 12.5 % DE LA FOSFOLIPASA OBTENIDA DE LA COLUMNA DE AFINIDAD. Se aplicaron 10 μ l de muestra a cada carril, de diferentes puntos del patrón cromatográfico que se obtuvo de la columna de afinidad (Figura 11). En el carril 1 se muestran, los marcadores de peso molecular; en los carriles 2, 3, 4, 5, 6 y 7 las diferentes fracciones obtenidas de la cromatografía de afinidad que corresponden a los tubos: 23 (30 ng), 22 (600 ng), 21 (120 ng), 12 (30 ng), 11 (360 ng) y 5 (230 ng), respectivamente y en el carril 8, 5 μ g del veneno crudo. S corresponde al punto de aplicación de las muestras. El gel se tiñó con plata.

con algunas glicoproteínas o alternativamente, a que exista más de un componente molecular con pesos moleculares muy semejantes. Para analizar este punto, se analizó la fracción C en dos sistemas electroforéticos en presencia de alta concentración de urea. De hecho, el análisis electroforético se realizó con la fracción que contiene la mayor actividad de fosfolipasa, utilizando geles cilíndricos en los sistemas Tris/Urea (pH 8.3) y Acetato/Urea (pH 4.42). En el sistema alcalino se analizaron dos concentraciones de la muestra y en ambas, pueden verse dos bandas (Panel A; Fig. 13), la más intensa migró menos que la menos intensa; la migración se invirtió a pH 4.42 (Panel B; Fig. 13). De estos resultados, es claro que la fosfolipasa aún no está homogénea.

A la fracción C, que contiene el 100% de la actividad fosfolipásica, se le realizó un análisis de HPLC antes de iniciar la secuencia de amino ácidos en el laboratorio del Dr. Brian M. Martin, del cual se obtuvieron cinco componentes, dos de ellos con absorbancia a 280 nm y los otros tres a 230 nm. Uno de los componentes que absorbió a 280 nm fue secuenciado. Al comparar la secuencia obtenida con la de otras fosfolipasas reportadas, no se encontró similitud con ninguna de éstas. Por otra parte, las dos fracciones que absorbieron a 280 nm perdieron la actividad fosfolipásica, lo que se comprobó en gel de agarosa/rodamina. Debido a esto se siguió un esquema alternativo para purificar la fosfolipasa de la hormiga *P. rugosus*.

SEGUNDO ESQUEMA DE PURIFICACION DE LA FOSFOLIPASA DEL VENENO DE *P. rugosus*:

h) Cromatografía de intercambio iónico.

Dado que la estrategia anterior no dió un resultado satisfactorio, se desarrolló otra estrategia para la purificación de la enzima. El nuevo esquema substituyó el uso de la filtración en gel en Sephadex G-50 por un intercambiador catiónico, CM-32 (que es una resina microgranular de carboximetil celulosa). El cambio obedeció al comportamiento de la enzima en la matriz de filtración en gel, que para su elución, junto con otras proteínas contaminantes requirió de un lavado de alta sal. Se pensó que en CM-32 el fraccionamiento ocurriría de acuerdo a un intercambio iónico

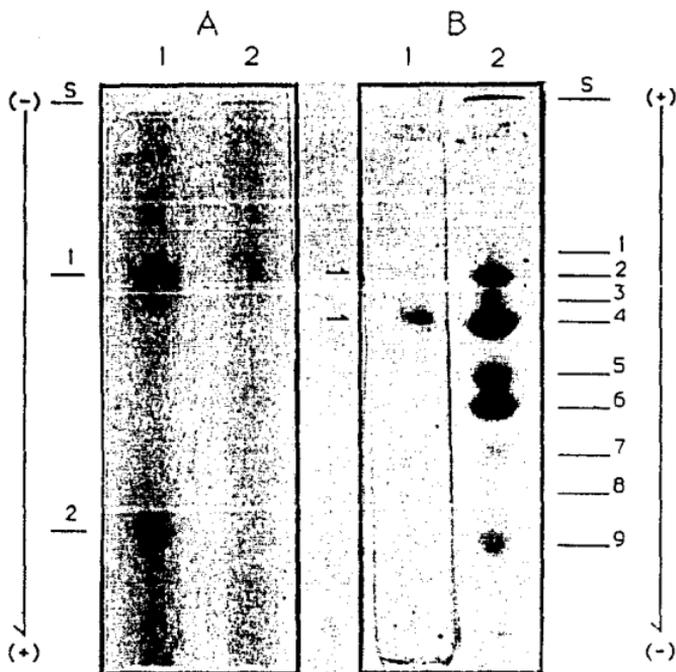


FIGURA 13. ELECTROFORESIS EN TUBO CON LOS SISTEMAS DE TRIS/UREA (A) Y DE ACETATO/UREA (B) DE LA FOSFOLIPASA OBTENIDA DE LA COLUMNA DE AFINIDAD. La cantidad de muestra aplicada en los tubos 1 y 2 del panel A fué de 6.6 y 3.3 μg , respectivamente, del pico con actividad de fosfolipasa. En el panel B se aplicaron 11 μg de la misma fracción al tubo 1 y 30 μg del veneno crudo al tubo 2. S es el punto de aplicación de la muestra. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie.

convencional y que los contaminantes serían removidos en un proceso de desadsorción secuencial.

Así, se procedió de la siguiente manera. 9 mg del veneno crudo de la hormiga, disueltos en amortiguador de acetato de amonio 0.02 M pH 4.7, se aplicaron a una columna empacada con CM-32 equilibrada previamente con amortiguador de acetato de amonio 20 mM pH 4.7 y se eluyó con un gradiente de NaCl disuelto en el mismo amortiguador. Al final de la corrida se aplicó un pulso de 1 M de NaCl para despegar cualquier material que pudiera haberse quedado en la columna. La Figura 14 muestra los resultados obtenidos. Se puede observar una fracción que no es retenida por el intercambiador (fracción A) y dos más que salen al aplicar el gradiente salino (fracciones B y C). Al aplicar el pulso de 1 M de NaCl ya no se obtiene proteína alguna. En la fracción A, no se encontró actividad fosfolipásica, mientras que en las fracciones B, C y D se detectó la mayor parte de la actividad. Aún cuando la fracción B presenta una alta actividad fosfolipásica, y en el perfil cromatográfico se ve un pico, la cantidad de proteína en esta fracción fué muy poca. Esto se debe quizás a la subida brusca del inicio del gradiente. En la fracción E, la actividad fosfolipásica es muy poca ya que el tiempo requerido para detectarla fué mucho mayor. En la Tabla IV podemos observar los porcentajes de recuperación de la columna de intercambio iónico CM-32. También se realizó una electroforesis de las fracciones obtenidas del intercambiador iónico (Figura 15). Las fracciones B y C muestran dos bandas de proteínas, siendo la fracción C la que contiene una mayor actividad fosfolipásica, 270 U/ml.

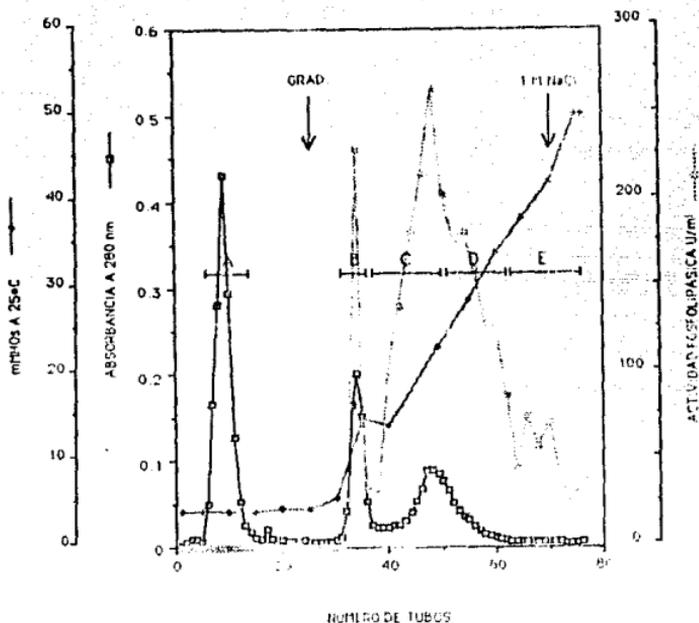


FIGURA 14. CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO DEL VENENO CRUDO DE LA HORMIGA *Pogonomyrmex rugosus* EN CM-32. 9 mg del veneno total de la hormiga fueron aplicados a una columna (0.9 X 10 cm) de CM-32 (Carboximetil celulosa) equilibrada previamente con amortiguador de acetato de amonio 20 mM pH 4.7 La elución de los componentes se realizo con un gradiente de NaCl de 0 a 0.8 M disuelto en el mismo amortiguador (50 ml de cada uno). La velocidad de flujo fue de 34 ml/hr y se colectaron fracciones de 1 ml. Las barras horizontales corresponden a las fracciones en las que se dividió el cromatograma. La flecha con la leyenda GRAD indica el sitio de inicio del gradiente y la otra, el pulso de 1 M de NaCl.

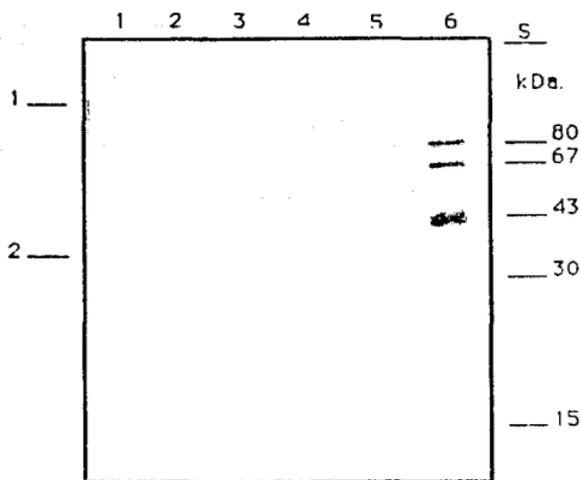


FIGURA 15. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA-SDS AL 12.5 % DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS DE LA COLUMNA DE INTERCAMBIO IONICO (CM-32). Se aplicaron 5 μ g de proteína de cada una de las fracciones de la columna de intercambio ionico (ver Figura 14). En el carril 1, 2, 3, 4, y 5, se muestran las fracciones F_A, F_B, F_C, F_D y F_E, respectivamente y en el carril 6, se muestran los marcadores de peso molecular. S indica el inicio del gel. El gel se tiñó con plata.

**TABLA IV RECUPERACION DE LAS FRACCIONES CROMATOGRAFICAS
OBTENIDAS DE LA COLUMNA DE INTERCAMBIO IONICO CM-32^a**

FRACCIONES	CANTIDAD RECUPERADA mg	%DE RECUPERACION	ACTIVIDAD FOSFOLIPASICA ^b
A	3.03	33.6	-
B	1.51	16.8	+
C	2.31	25.7	++
D	1.96	21.7	+++
E	0.08	0.9	+/-
Total	8.89	98.7	

^a Se aplicaron 9 mg de veneno crudo.

^b Determinado cualitativamente por el método de la placa de agarosa/yema de huevo/rodamina.

i) Cromatografía de afinidad.

La fracción C que proviene del intercambiador iónico fue cromatografiada en la columna de afinidad Sepharosa 4B-inhibidor de Rosenthal. 28.9 ml de esta fracción se mezclaron con 1 ml de Tris 1 M pH 8.0 para ajustar el pH y se llevaron a un volumen de 50 ml con agua destilada. En la Figura 16 se muestra el perfil cromatográfico que se obtuvo después de pasar por la resina de afinidad a la fracción C. Las lecturas de absorbancia se realizaron a 230 nm en virtud de que las lecturas de absorbancia que se obtuvieron a 280 nm fueron muy bajas. El pico obtenido con ácido acético, así como las otras fracciones del cromatograma, fueron concentradas por centrifugación utilizando filtros Ultrafree Mc Filters (UF C3GC) con un tamaño de poro de 10,000. Una vez concentradas, se realizó un análisis electroforético de cada una de ellas.

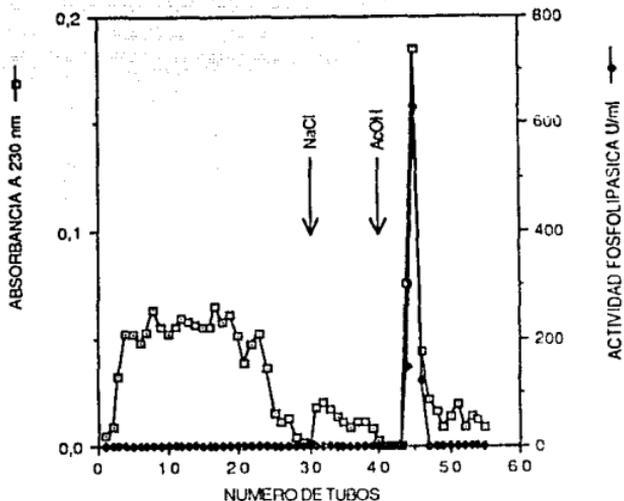


FIGURA 16. CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD DE LA FRACCION C La fracción C que proviene de la columna de intercambio iónico (Figura 14) se recromatografió en la resina de afinidad. El sistema de elución que se utilizó aquí es el mismo que en la Figura 11. La actividad de fosfolipasa esta presente únicamente en las fracciones 44, 45 y 46 del pico eluido con ácido acético 0.1 M.

En la Figura 17 se observó que la fracción 15 independientemente de si está concentrada o diluida, no presentó ninguna banda de proteína. Sin embargo, en el tubo 45 de la fracción concentrada sí apareció una banda protéica con un peso molecular de aproximadamente 35 kDa. A ambas fracciones se les determinó la actividad fosfolipásica por el método titulométrico. La actividad específica fué de cero para la fracción 15 y de 630 U/mg para la fracción 45.

Debido que el tubo 45 presentó únicamente una banda de proteína en el gel de poliacrilamida-SDS al 12.5 % y que presenta actividad fosfolipásica, se procedió a realizar dos electrotransferencias de esta fracción con diferentes concentraciones de proteína a una membrana de immobilon con el objeto de realizar la secuencia de aminoácidos de la proteína en este soporte. Los resultados obtenidos revelaron que la fosfolipasa tiene bloqueado el grupo amino terminal y por lo tanto no se pudo secuenciar.

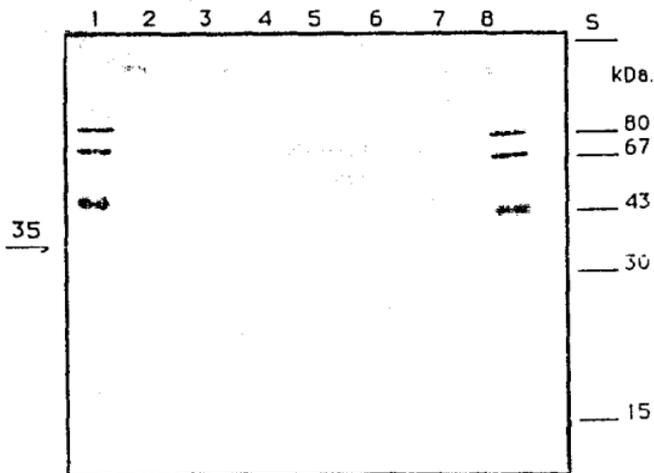


FIGURA 17. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA-SDS AL 12.5 % DE LAS FRACCIONES DE LA COLUMNA DE AFINIDAD SEPHAROSA 4B-INHIBIDOR DE ROSENTHAL. Se aplicaron 10 μ l de muestra de las fracciones 15 y 45 que se obtuvieron de la columna de afinidad después de haber pasado por intercambio iónico. Los carriles 1 y 8, muestran a los marcadores de peso molecular. Los carriles 2, 3 y 4 corresponden a la fracción 15 sin concentrar, concentrada y filtrada, respectivamente. Los carriles 5, 6 y 7, corresponden a la fracción 45 concentrada, sin concentrar y filtrada respectivamente. S indica el inicio del gel. El gel se tiñó con plata.

DISCUSION.

Los venenos de las hormigas son los menos estudiados en comparación con los venenos de otros grupos zoológicos. Una posible explicación a esta situación en el campo de la Toxinología es sin duda que, el veneno de las hormigas en la mayoría de los casos, no ocasiona efectos espectaculares en sus víctimas humanas o en las especies útiles al hombre. En la gran mayoría de los casos la inoculación de su veneno produce sólo molestias pasajeras, situación que contrasta con los profundos efectos neuromusculares producidos por el envenenamiento por alacranes, con los cuadros necróticos y/o neurotóxicos causados por la mordedura de serpientes, o con los diversos cuadros anafilácticos que frecuentemente inducen los encuentros con abejas y avispas. También, otro factor que ha influido en lo raquítico del conocimiento en este campo particular, es la dificultad que impone este Taxón no sólo para la clasificación de especies sino también para su identificación (Holldobler y col. 1990). Por supuesto, la dificultad técnica para la colección de cantidades suficientes de veneno se junta con las causas antes mencionadas.

Esta Tesis pretende contribuir al conocimiento de la bioquímica general del veneno de la hormiga *P. rugosus*; desarrollando alternativas para la purificación de la fosfolipasa A₁ del veneno e iniciar su caracterización. Esta enzima fue seleccionada, entre los demás componentes del veneno, dado que las fosfolipasas A₁ han sido poco estudiadas, a diferencia de las de tipo A₂ de múltiples fuentes que son bien conocidas. Además, por analogía de lo que ocurre en el veneno de avispas, esta proteína pudiera tener propiedades alergénicas. Es importante resaltar que el interés de los laboratorios involucrados (el nuestro, el del Dr. Possani y el del Dr. Schmidt) va más allá de las metas aquí alcanzadas, por ejemplo, las toxinas específicas para insectos.

Primeramente, se realizó un estudio sistemático para distinguir los diferentes componentes protéicos del veneno en varios sistemas electroforéticos. Se emplearon dos sistemas para la resolución de proteínas en condiciones nativas (sin SDS): en el sistema básico (Fig. 4) se observaron 8 bandas principales, en tanto que en el ácido (Fig. 5), las proteínas evidentes son 9. En el gel de poliacrilamida con SDS (Fig. 6), se

separaron 14 bandas conspicuas; este número pudiera ser tomado como el mínimo de componentes protéicos en el veneno. La discrepancia en el número de bandas entre los diferentes sistemas electroforéticos pudiera explicarse por las siguientes alternativas que no son excluyentes entre sí: (1) que las bandas que encontramos en los geles cilíndricos (no desnaturalizantes) están compuestas por más de una proteína y (2) que algunas proteínas no entran en los geles cilíndricos (nativos) dado que su carga es similar al electrodo en que se mueven las demás.

El patrón electroforético reportado para *P. rugosus* en gel de gradiente (5-20 %) (Leluk y col., 1989) es muy similar al obtenido en nuestro laboratorio utilizando un gel al 12.5 % en presencia de SDS (14 bandas). En otras hormigas del mismo género como la *P. maricopa*, y en *P. badius* (Schmidt y col. 1978a; 1978b; Leluk y col. 1989), el patrón fué similar al obtenido en geles de gradiente (15 y 13 bandas, respectivamente). Por otra parte, los componentes glicosilados de los venenos de *P. rugosus* y de *P. maricopa* son muy pocos (3 a 4 bandas), habiendo pequeñas diferencias en cuanto a la posición de las bandas (Leluk y col. 1989 y Schmidt y col. 1978a).

El efecto tóxico del veneno total de la hormiga *P. rugosus* fue probado en ratones e insectos. El veneno fue letal para mamíferos (ratones) como ya se había descrito previamente (Evans y col. 1990; Schmidt y col., 1989b; Schmidt, J.O. 1986; Schmidt y col. 1978b; Schmidt y col. 1989a). Si bien, por limitaciones del material biológico, no se obtuvo un valor cuantitativo de la potencia (dosis letal media, DL₅₀), el hecho de que todos los ratones inyectados con 100 µg hayan muerto indica que el veneno de *P. rugosus* es altamente tóxico para los mamíferos. Para ilustrar esta aseveración baste mencionar que la DL₅₀ para ratones de los venenos de alacranes mexicanos peligrosos cae en el intervalo de 2 a 10 µg y la de las serpientes crotálicas de 10 a 100 µg. En cualquier caso la dosis aplicada de veneno en el caso de los ratones fué superior a la DL₅₀ de 3 a 15 µg/ratón reportada por otros autores (Schmidt, J.O. 1986; Schmidt y col. 1989a). Además, se probó la toxicidad en grillos e isópodos; 10 µg de veneno fueron tóxicos para los primeros y letales para los segundos. El análisis de la toxicidad de las diferentes fracciones del veneno obtenidas de la columna de filtración molecular confirmó los resultados obtenidos con

el veneno sin fraccionar (ver Tabla II). Hay que destacar que las distintas fracciones mostraron toxicidad diferencial hacia las especies ensayadas en este trabajo. Este resultado puede interpretarse como que, en el veneno de la hormiga existen toxinas específicas para distintos grupos animales, como ocurre en el veneno de alacranes y arañas (Alagón y col., 1988; Grishin y col. 1989).

Los ensayos enzimáticos realizados en diferentes géneros de hormigas han revelado la presencia de una gran variedad de enzimas (Schmidt y col. 1978a; Schmidt y col. 1984a; Schmidt y col. 1986b; Leluk y col. 1989), entre las que se encuentran: fosfolipasa A, lipasa, esterasa, fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina, hialuronidasa, fosfoesterasas y otras proteasas.

Las fosfolipasas se han encontrado en los venenos de otros himenópteros, como las abejas y las avispas, así como en varios de alacranes y muchos de serpientes, generalmente con altos niveles de actividad (Schmidt y col. 1986b; Amezcua, J. 1987; Sosa y col., 1979). La actividad fosfolipásica del veneno de la hormiga *P. rugosus* se determinó por dos sistemas diferentes y se encontraron valores tan altos como los reportados para la avispa, la abeja y el monstruo de cuentas (ver Tabla V) (Amezcua, J.L. 1987; Schmidt y col. 1986; Sosa y col. 1979).

La detección *in situ* de la actividad de fosfolipasa después de separar el veneno electroforéticamente (Fig. 7) mostró una sola banda con una masa molecular de 35,000 Da. Su aspecto turbio era indicativo de que poseía una actividad tipo A₁ (Reynaud, 1990), lo que se confirmó directamente utilizando sustratos marcados radioactivamente en una posición específica. Esta actividad se encontraba principalmente en los venenos de avispas (King y col., 1982) y con este estudio se extiende al veneno de las hormigas. De hecho, este hallazgo y que la masa molecular sea similar a la de las avispas, es congruente con el origen evolutivo de las hormigas a partir de las avispas (Hollodler y col. 1990) y abre la pregunta sobre las propiedades alergénicas de la fosfolipasa A₁ de hormiga y las relaciones antigénicas con las de avispas, que son potentes alérgenos (King y col., 1978, 1983 y 1984).

La estrategia de purificación de la fosfolipasa del veneno de la hormiga *P.*

rugosus se realizó utilizando dos sistemas de purificación a base de tres columnas cromatográficas. En el primer paso de purificación el veneno de la hormiga se fraccionó a través de una columna de filtración en gel, en la que se obtuvo una fracción con actividad fosfolipásica después de aplicar un pulso de NaCl 1 M (fracción V). Posteriormente la fracción V se procesó en la columna de afinidad. El análisis electroforético de diferentes fracciones del cromatograma reveló dos bandas en el pico eluido con ácido acético, lo cual indicó que la fosfolipasa del veneno no está pura. En virtud de esto, un procedimiento alterno fué utilizar como primer paso una columna de intercambio iónico. En este caso la actividad fosfolipásica se encontró distribuida en dos fracciones la B y la C, principalmente (ver Figura 14). La fracción C de la columna de intercambio iónico se aplicó a la columna de afinidad. El pico obtenido de esta columna al ser analizado electroforéticamente reveló solo una banda, con actividad de fosfolipasa. Esta fracción fué concentrada 10 veces por ultrafiltración, con el objeto de inmovilizar a la proteína sobre una membrana (Immobilon), para realizar la secuencia de la misma. Dos concentraciones diferentes de esta proteína fueron inmovilizadas sobre la membrana, para su posterior análisis de secuencia de aminoácidos. Sin embargo, este análisis no se pudo realizar por encontrarse el grupo amino terminal bloqueado. En estudios futuros, se tendrán que utilizar otras estrategias alternativas para su secuenciación como la generación de péptidos y la determinación individual de la secuencia de los mismos. Hay que mencionar que aun no existen reportes en la literatura de intentos de secuenciación de fosfolipasas A₁ de venenos de avispas, por lo que no se sabe si su grupo amino terminal también está bloqueado.

TABLA V. COMPARACION DE LA ACTIVIDAD DE FOSFOLIPASA DE AVISPAS, HORMIGAS Y OTRAS ESPECIES.

ESPECIE	ACTIVIDAD FOSFOLIPASICA U/mg

AVISPAS:	
<i>Polister infuscatus</i> ¹	560.0
<i>Polister dorsalis</i> (Fabricius) ²	189.6
<i>Apoica pallens</i> ¹	0.6

HORMIGAS:	
<i>Pogonomyrmex badius</i> ¹	94.0
<i>Platythyrea cribrinodis</i> ¹	8.0
<i>Odontomachus hematodus</i> ¹	0.7
<i>Pogonomyrmex rugosus</i> ⁴	517.0

OTRA ESPECIES:	
<i>Crotalus basiliscus</i> ³	15.12
<i>Crotalus alamantius</i> ³	18.45
<i>Heloderma suspectum</i> ³	537.60

1 Schmidt y col., 1986b.

2 Amezcua, J., 1987.

3 Sosa y col. 1979

4 Esta tesis

BIBLIOGRAFIA

Amezcuca, J.L. (1987) Caracterización Bioquímica del veneno de avispas *Polistes dorsalis* (Fabricius) y *polyvia occidentalis nigritella* du Bysson. Tesis Profesional para Licenciatura presentada en la Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Ciencias. México.

Bernheimer, A.W., Avigad, L.S. y Schmidt, J.O. (1980). A hemolytic polypeptide from the venom of the red harvester ant, *Pogonomyrmex barbatus*. *Toxicon* 18: 271-278.

Bium, M.S. y Hermann H.R. (1978) Venoms and venom apparatuses of the Formicidae: Myrmeciinae, Ponerinae, Dorylinae, Pseudomyrmecinae, Myrmicinae and Formicinae. En *Arthropod venoms, Handb Exp. Pharm.* Vol 48. (S. Bellini, ed.), pp.01-869. Springer-Verlag: Berlin.

Bosh, H.V.D. (1974). Phosphoglyceride metabolism. *Ann. Rev. Biochem.* 43: 243-277.

Chang, J., Musser, J.H. y McGregor, H. (1987). Phospholipase A₂: function and pharmacological regulation. *Biochem. Pharmacology* 36: 2 429-2436.

Cole, A.C. Jr. (1968). *Pogonomyrmex* harvester ants. A study of the genus in North America. Knoxville: University of Tennessee Press. pp. 3-181.

Dijkstra, W.B., Drenth, J., Kalk, K.H. y Van Der Maalen, P.J. (1978). Three-dimensional structure and disulfide bond connections in bovine pancreatic phospholipase A₂. *J. Mol. Biol.* 129: 53-60

Dio, O., Ohki, M., y Nojima, S. (1972). Two of phospholipase A and lysophospholipase in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys.* 60: 244-258.

Dufton, M.J. y Hider, R.C. (1983). Classification of phospholipases A₂ according to sequence. Evolutionary and pharmacological implications. *Eur. J. Biochem* 137:

545-551.

Evans, D.L. y Schmidt, J.O. (1990). Hymenopteran venoms: striving toward the ultimate defense against vertebrates. En *Insect defenses. Adaptive mechanisms and strategies of prey and predators*. State University of New York Press. pp. 387-419. Albany, N.Y.

Givskov, M., Olsen, L. and Molin, S. (1988). Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene for extracellular phospholipase A₁ from *Serratia liquefaciens*. *J. of Bacteriology* 170: 5855-5862.

Grishin, E.V., Volkova, T.M. and Arisenviev, A.S. (1989). Isolation and Structure Analysis of Components from the Venom of the Spider *Argiope lobata*. *Toxicon*, 27: 541-549.

Habermann, E. y Hardt, K.L. (1972). A sensitive and specific plate test for quantitation of phospholipases. *Anal. Biochem.* 50: 160-173.

Harris, J.B. (1985). Phospholipases in snake venoms and their effects on nerve and muscle. *Pharmac. Ther.* 31: 79-102.

Hawthorne, S.N. y Ansell, G.B. (1982). *Phospholipids* pp. 313-426. Edition Elsevier Biomedical Press

Holldobler, B. y Wilson, E.O. (1990). The importance of ants and communication. En: *The ants*. The Belknap Press of Harvard University, University Press. pp. 1-3 y 227-297. Cambridge, Massachusetts.

Jackson, R.L., Balasubramaniam, A., Murphy, R.F. y Demel, R.A. (1986). Interaction of synthetic peptides of apolipoprotein C-II and lipoprotein lipase at monomolecular lipid films. *Biochim. et Biophys. Acta* 875: 203-210.

Jovin, T., Chrbach, A. and Naughton, M.A. (1964). An apparatus for preparative

temperature-regulated polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* 9: 351-356.

Khimasa, M., Morooka, T. y Niimura, T. (1984). Purification and properties of a membrane-bound phospholipase B from baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *J. Biochem.* 95: 137-145.

King, T.P., Sobotka, A.K., Kochoumian, L. and Lichtenstein, L.M. (1976). Allergens of honey bee venom. *Arch. Biochem. Biophys.* 172: 661-671.

King, T.P., Sobotka, A.K., Alagón, A.C., Kochoumian, L. y Lichtenstein, L.M. (1978). Protein allergens of white-faced Hornet, Yellow Hornet and Yellow Jacket Venoms. *Biochemistry.* 17: 5165-5174.

King, T.P., Alagón, A.C., Kuan, J., Sobotka, A.K. and Lichtenstein, L.M. (1983). Immunochemical studies of yellow jacket venom proteins. *Molec. Immunol.* 20: 297-308.

King, T.P., Kochoumian, L. and Joslyn, A. (1984). Wasp Venom Proteins: Phospholipase A₁ and A₂ *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 230: 1-12.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

Lehninger, A.L. (1979) *Bioquímica*. Ed. Omega, S.A. pp. 307-312. Barcelona, España.

Leluk, J., Schmidt, J.O. and Jones, D. (1989). Comparative studies on the protein composition of hymenopteran venoms reservoirs. *Toxicon* 27: 105-114.

Merril, C.R., Goldman, D., Sedman, S.A. y Ebert, M.H. (1980). Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins. *Science* 211: 1 437-1 438.

Nieder, M. y Law, J.H. (1983). A phospholipase A₁ from the hemolymph of the

tobacco hornworm, *Manduca sexta*. J. of Biol. Chem. 258: 4304- 4310.

Oda, N., Sakai, H., Snieh, T.Ch., Nkamura, H., Sakamoto, S., Kihara, H., Chang, Ch.Ch., y Ohno, M. (1987). Purification and characterization of phospholipase A₂ from *trimeresurus granineus* venom. J. Biochem. 102: 1441-1449.

Opperdoes, F.R. y Roy, J.V. (1982). The phospholipases of *Trypanosoma brucei* bloodstream forms and cultured procyclics. Mol. and Biochem. Parasitol. 5: 309-319.

Piek, T., Schmidt, J.O., Jong, J.M. y Mantel, P. (1989). Kinins in ant venoms -a comparison with venoms of related Hymenoptera. Comp. Biochem. Physiol. 92: 117-124.

Rosenberg, P. (1976). Toxins. Animal, plant and microbial. En: 5th International Symposium on Animal, Plant and Microbial Toxins. San José, Costa Rica, pp. 1-1134. P. Rosenberg (Ed) Pergamon Press Ltd. Headigton Hill Hall.

Reisfeld, R.A., Lewis, V.J. and Williams, D.E. (1962). Disc electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels. Nature 195: 281-283.

Reisner, A.H., Nemes, P. and Bucholtz, C. (1975). The Coomassie brilliant blue G-250 perchloric acid solution for staining in electrophoresis and isoelectric focusing on polyacrylamide gel. Anal. Biochem. 64: 509-516.

Reynaud, E., Vargas-Villarreal, J., Martin-Polo, J.J., Oliveira, A. y Alagón, A.C. (1990). Un ensayo de alta sensibilidad para la detección *in situ* de fosfolipasa A₁ y A₂ despues de la electroforesis en geles de poliacrilamida. XVIII Congreso Nacional de Bioquímica. pp. 186

Schmidt, J.O. (1982). Biochemistry of insect venoms. Ann. Rev. Entomol. 27: 339-368.

Schmidt, J.O. (1986). Chemistry, pharmacology and chemical ecology of ants venoms. Venoms of the Hymenoptera. Academic press Inc. (London) Ltd., pp. 425-

Schmidt, J.O. y Blum, M.S. (1978a). A harvester ant venom: chemistry and pharmacology. *Science* 200: 1064-1066.

Schmidt, J.O. y Blum, M.S. (1978b). Pharmacological and toxicological properties of harvester ant, *Pogonomyrmex badius*, venom. *Toxicon* 16: 645-651.

Schmidt, J.O., Blum, M.S. y Overal, W.L. (1984a). Hemolytic activities of stinging insect venoms. *Arch. of Insect Biochem. and Physiol.* 155-160.

Schmidt, J.O., Meinke, G.C., Chen, T.M. y Pinna, J.L. (1984b). Demonstration of cross-allergenicity among harvester ant venoms using rast and rast inhibition. *J. Allergy Clin. Immunol.* 73: 158.

Schmidt, J.O., Yamane, S., Matsuura, M. y Starr, C.K. (1986a). Hornet venoms: lethalties and lethal capacities. *Toxicon* 24: 950-954.

Schmidt, J.O., Blum, M.S. y Overal, W.L. (1986b). Comparative enzymology of venoms from stinging Hymenoptera. *Toxicon* 24: 907-921.

Schmidt, P.J. y Schmidt, J.O. (1989a). Harvester ants and horned lizards: predator-prey interactions. En *Special Biotic Relationships in the Arid Southwest*. (Schmidt, J.O. ed.), pp. 25-51. University of New Mexico Press: Albuquerque.

Schmidt, P.J., Sherbrooke, W.C. y Schmidt, J.O. (1989b). The detoxification of ant (*Pogonomyrmex*) venom by a blood factor in horned lizards (*Phrynosoma*). *Copeia* 3: 603-607.

Scott, D.L., White, S.P., Otwinowski, Z., Yuan, W., Gelb, M.H. Sigler, P.B. (1990). Interfacial catalysis: the mechanism of phospholipase A₂. *Science* 250: 1541-1546.

Shier, W.T. (1979). Activation of high levels of endogenous phospholipase A₂ in

cultured cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 195-199.

Snyder, W.R., (1987). A continuous spectrophotometric assay for the *Bacillus cereus* phospholipase C using a thiophosphate substrate analog: Evaluation of assay conditions and chromogenic agents. Analytical. Biochemical.. 164: 199-206.

von Sicard, N.A.E., Candy, D.J. y Anderson, M. (1989). The biochemical composition of venom from the pavement ant (*Tetramorium caespitum* f). Toxicon 27: 1127-1133.

Sosa, B.P., Alagón, A.C., Possani, L.D. y Julia, J.Z. (1979). Comparison of Phospholipase activity with direct and indirect lytic effects of animal venoms upon human red cells. Comp. Biochem. Physiol. 64: 231-234.

Sugatani, J., Okumura, T., Sugatani, J. y Hamaguchi, K. (1984). Studies on two types of phospholipase B from *Penicillium notatum*. J. Biochem. 95: 199-206.

Takeuchi, Y., Okumura, T., Sugatani, J. y Saito, K. (1987). Molecular relationship between two types of phospholipase B from *Penicillium notatum* and reconstitution of active enzymomer from its peptide fragments. Arch. Biophys. 252: 206-217.

Vadas, P., Wasi, S., Mouat, H.Z. y Hay, J.B. (1981). Extracellular phospholipase A₂ mediates inflammatory hyperaemia. Nature 293: 583-585.

Van Der Bosch, H. (1980). Intracellular phospholipases A. Biochim. et Biophys. Acta 604: 191-246.

Vargas-Villarreal, J., Martín-Polo, J.J., Reynaud, E. y Alagón, A.C. (1991). A new affinity adsorbent for the purification of phospholipases A₁ and A₂ from animal venoms. Toxicon 29: 119-124.

Verheij, H.M., Boffa, M.C., Rotten, C., Bryckaert, M.C., Verger, R and Haas, G.H. (1980). Correlation of enzymatic activity and anticoagulant properties of phospholipase A₂. Eur. J. Biochem. 112: 25-32.

Verheij, H.M., Slotboom, A.J. and Hass, G.H. (1981). Structure and function of phospholipase A₂. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacology* 91: 91-203.

Well, M.A. (1974). A phospholipase A₂ model system. Calcium enhancement of the aminocatalysed methanolysis of phosphatidilcholine. *Biochim. 13*: 2258-2264.

Wilson, E.O. (1971). *The insect societies*. The Belknap Press of Harvard University Press. pp 28- 436. Cambridge, Massachusetts.

Yu, L., Deems, R.A., Hajdu, J. and Dennis, E.A. (1990). The interaction of phospholipase A₂ with phospholipid analogues and inhibitors. *J. Biol. Chem.* 265: 2657-2664.