

Artículos de Revisión

Instituto de Farmacia y Alimentos
Universidad de La Habana

ORIGEN E IMPORTANCIA DE LA FOSFOLIPASA A₂ DE SECRECIÓN

Yolanda C. Valdés Rodríguez,¹ Miguel Bilbao Díaz,² José L. León Álvarez³ y Francisco Merchán González¹

RESUMEN

Las fosfolipasas A₂ son una familia de enzimas que hidrolizan el enlace éster sn-2 de los glicerofosfolípidos liberando ácidos grasos, principalmente el ácido araquidónico y lisofosfolípidos. Las fosfolipasas A₂ de secreción son producidas por numerosas células bajo la acción de diferentes estímulos como la interleucina-1, el factor de necrosis tumoral α y los lipopolisacáridos, los cuales provocan su acumulación en los líquidos inflamatorios y en el plasma de pacientes con diversas enfermedades inflamatorias. Recientemente se propuso que las fosfolipasas de secreción actúan preferencialmente sobre microvesículas emitidas por las células cuyas membranas han perdido la asimetría fosfolipídica.

DeCS: FOSFOLIPASAS A/aislamiento & purificación; FOSFOLIPASAS A/uso terapéutico; FOSFOLIPASAS A/historia; ENZIMAS; INTERLEUCINA-1; FACTOR DE NECROSIS TUMORAL; LIPOPOLISACARIDOS.

Las fosfolipasas A₂ (FLA₂) forman una familia de enzimas claves en el recambio de los fosfolípidos de membranas y en la generación de diversas sustancias bioactivas: lisofosfolípidos, ácidos grasos libres y mediadores lipídicos de la inflamación¹⁻⁴ (fig.1). Existen 2 grandes clases, las FLA₂ intracelulares o citosólicas (FLA_{2c}), de masa molecular

elevada (40-85 kDa) y las FLA₂ de secreción (FLA_{2s}), de masa molecular pequeña (14 - 18 kDa).^{3,5,6} Las formas extracelulares de las FLA₂ son extremadamente abundantes en las secreciones de las glándulas exocrinas como páncreas y glándulas venenosas de serpientes, abejas, escorpiones, así como en sitios inflamatorios^{3,7,8} (tabla).

¹ **Profesor Titular.**

² **Licenciado.**

³ **Máster en Ciencias. Profesor Auxiliar.**

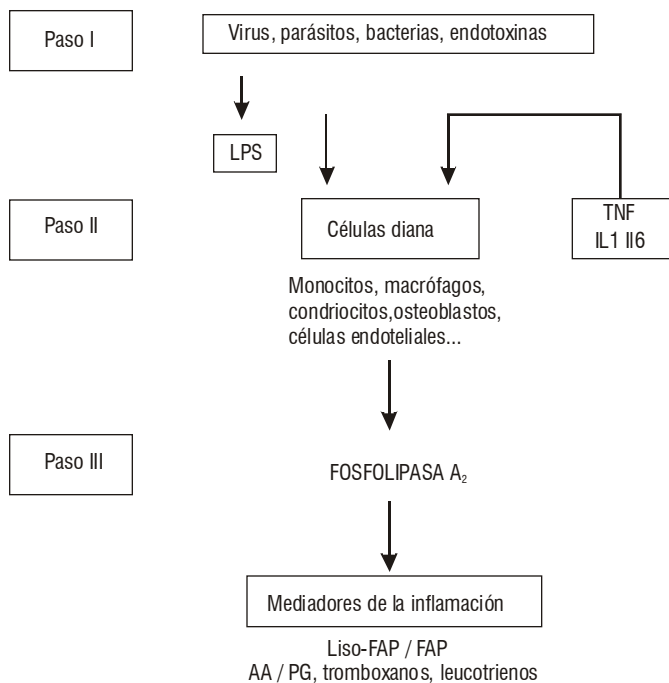


FIG. 1. Mecanismo por el cual transcurre la activación de la FLA₂ y su papel en la síntesis de diversos mediadores de la inflamación.

TABLA. Localización y funciones de diferentes tipos de FLA₂s

FLA ₂ s	Localización	Efectos fisiológicos
Grupo I o pancreática	Jugo pancreático, pulmón, hígado, riñón, bazo, suero	Digestión de fosfolípidos, contracción muscular lisa, proliferación celular, migración celular
Grupo II o inflamatoria	Fluido sinovial, plasma, pulmón, hígado, plaquetas, macrófagos, polimorfonucleares	Producción de potentes mediadores lipídicos de la inflamación, activación de linfocitos T, eliminación de bacterias, migración celular, degranulación de mastocitos
FLA ₂ -8 FLA ₂ -10	Cerebro, testículos, intestino, corazón, placenta, hígado	? ?
Insectos Serpientes	Venenos	Digestión, neurotoxicidad, miotoxicidad, efectos anticoagulantes

FLA₂s, CARACTERÍSTICAS

Bajo la denominación de FLA₂s se agrupan numerosos tipos de estas enzimas con funciones biológicas muy diversas.^{1,2,8,9} Dentro de estas la enzima tipo II, también conocida como FLA₂s de la inflamación, es sintetizada y secretada por una variedad de células mesenquimatosas: células musculares lisas de los vasos sanguíneos, células de Paneth de la mucosa intestinal, células mesagiales, hepatocitos, osteoblastos, condriocitos ma-crófagos, neutrófilos y otras células, hiperactivadas por citocinas proinflamatorias.^{1,2,10}

La FLA₂s tipo II es sintetizada en su forma activa, la cual se almacena en los granulos de secreción (plaquetas) o se va incrementando progresivamente fuera de la célula (condriocitos) cuando el gen es estimulado por la interacción de citocinas proinflamatorias con receptores específicos de la membrana celular.

CLASIFICACIÓN DE LAS FLA₂s

Las FLA₂s presentan una gran homología estructural entre sí, tienen en común el bajo peso molecular (13-18 kDa), la presencia al menos de 5 puentes disulfuros, que las hace particularmente estables y un péptido señal.^{2,3,11} El péptido señal permite la secreción de las FLA₂s por una vía celular clásica, que no se acompaña de glicosilación. En el plano catalítico, estas enzimas funcionan con una pseudo triada catalítica en la cual la serina es remplazada por una molécula de agua. Todas las FLA₂s tienen en común un sitio de unión para el ion calcio el cual es importante para la presentación del sustrato y la triada Tir-Arp. El ion calcio estabiliza el estado de transición, a la vez que participa directamente en la catálisis.¹²

La clasificación en diferentes tipos o grupos de las FLA₂s se basa en la posición

de los puentes disulfuros, la localización histórica, la función y los mecanismos de señalización celular que regulan su expresión. La FLA₂s pancreática fue inicialmente aislada e identificada en el jugo pancreático, su función principal es la digestión de los lípidos de la dieta, posteriormente fueron aisladas e identificadas otras formas de FLA₂s tipo I en el pulmón y el estómago así como en el veneno de cobra. La FLA₂s (no pancreática) tipo II está ampliamente distribuida en los tejidos de mamíferos (hígado, bazo, células sanguíneas, condriocitos, etcétera).

La biosíntesis de las FLA₂s puede ser de tipo constitutiva como las formas que se expresan en las plaquetas y la próstata, o producirse en respuesta a mecanismos de señalización celular que han sido particularmente estudiados en diversos modelos celulares como fibras musculares lisas y macrófagos.¹²

Existen otros diversos tipos de FLA₂s que han sido aislados y caracterizados a partir de diferentes fuentes biológicas, como el tipo III, de 14-16 kDa con 5 enlaces disulfuros, presente en el veneno de las abejas y las conocidas como tipo "cardíaco", abundante en el corazón, tipo "testicular"^{13,14} y la presente en los teratocarcinomas, en fase de estudio.¹⁵

FOSFOLIPASA A₂ DE SECRECIÓN TIPO II. MECANISMO DE ACCIÓN

En general las FLA₂ muestran selectividad por la posición del enlace éster acilo de los fosfolípidos. Sin embargo, existen ciertas diferencias entre los diferentes tipos de FLA₂ por la selección del sustrato. Se ha observado que la FLA₂c muestra cierta preferencia por los fosfolípidos que contienen un resto de ácido araquidónico (AA) esterificado en la posición sn-2 del glicerol; mientras que la FLA₂s muestra una

selectividad de ascenso gradual por el grupo polar en posición sn-3 del glicerol:fosfatidil glicerol (FG)>fosfatidil etanolamina (FE)>fosfatidil colina (FC)^{5,16} al parecer no tiene especificidad por el enlace sn-2; las lisofosfolipasas tienen una especificidad muy pronunciada por el enlace sn-1 y catalizan la hidrólisis de los ácidos grasos de los sustratos en el orden siguiente: oleoil > estearoil > palmitoil > miristoil.¹⁷

La distribución asimétrica de los fosfolípidos en las membranas está regulada por la acción de una aminofosfolípido translocasa que posee las características de una ATPasa de membrana. Esto asegura que la hemicapa externa esté formada esencialmente por fosfolípidos de colina: esfingomielina y FC, mientras que la hemicapa interna esté integrada por la FE y los fosfolípidos aniónicos como la fosfatidilserina (FS), el FG y el fosfatidilinositol (FI).

Una de las características de la FLA₂s es su acción preferencial sobre los fosfolípidos localizados en la hoja interna de las membranas: las FE y los fosfolípidos aniónicos como la FS o el FG, particularmente abundantes en esta hemicapa; mientras que es poco activa sobre la FC, de la hemicapa externa. Teniendo en cuenta su selectividad catalítica, la pérdida de la asimetría fosfolipídica pudiera ser el fenómeno celular que desencadenaría la acción de las FLA₂s. Este fenómeno ha sido correlacionado con la actividad bactericida mostrada por la FLA₂s, atribuyéndose a la abundancia de FE y fosfolípidos aniónicos en las membranas de las bacterias.¹⁸ Considerando que la FLA₂s actúa fuera de la célula, resulta obvio que a diferencia de la FLA₂s no está en contacto directo con el sustrato, por lo que requiere de la exposición de este para actuar.

Bajo ciertas condiciones fisiológicas y/o fisiopatológicas se produce la pérdida

brusca de la distribución asimétrica de los fosfolípidos de membrana, como se ha observado en las plaquetas tratadas simultáneamente con la trombina y el colágeno, en células endoteliales y plaquetas sometidas a la acción de las porforinas (complejos de ataque a la membrana) o células en apoptosis. La disasimetría fosfolipídica facilita la acción de la FLA₂s al quedar expuestos los fosfolípidos de la hemicapa interna de la membrana.

CÓMO OCURRE LA PÉRDIDA DE LA SIMETRÍA FOSFOLIPÍDICA DE LAS MEMBRANAS

Recientemente se ha planteado la existencia de una enzima conocida como escambrasa o flipasa que cataliza el paso de los fosfolípidos de la cara interna a la externa (movimiento de flip-flop) con la consiguiente pérdida de la distribución asimétrica de estos en la membrana, lo que provoca la evaginación de esta y la formación de microvesículas que se desprenden. Existen evidencias experimentales de la formación de estas microvesículas y su correlación con el incremento de la actividad de la FLA₂s (fig.2).

De forma general, los mecanismos puestos en juego implican un fuerte aumento de la concentración del calcio en el citoplasma y la pérdida de la asimetría. Independientemente de una discusión semántica la implicación de una escambrasa o una flipasa, al parecer es el evento que inicia la pérdida de la asimetría, es decir, el flujo vectorial rápido de los fosfolípidos de la cara interna hacia la hoja externa, compensado ulteriormente por un equilibrio entre las 2 hemicapas. El exceso de fosfolípidos en la hoja externa provoca la evaginación de la membrana, que se adapta así a la disasimetría de la superficie de las 2 hemicapas lipídicas y progresa hacia la

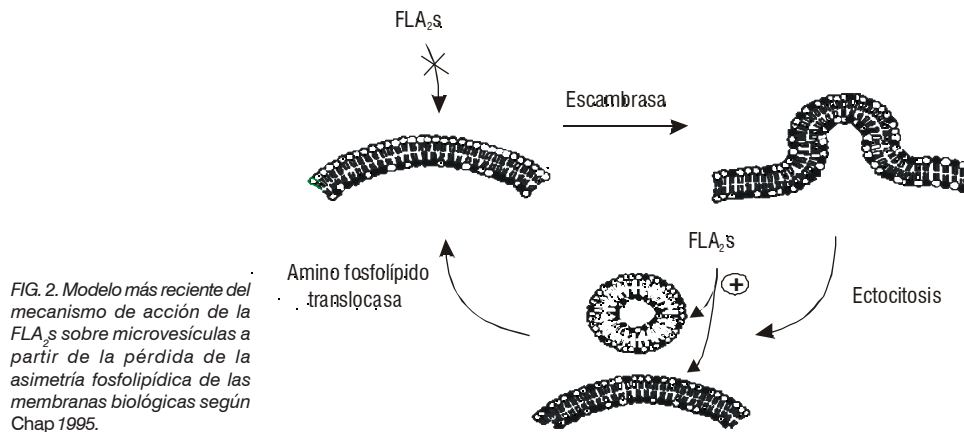


FIG. 2. Modelo más reciente del mecanismo de acción de la FLA₂s sobre microvesículas a partir de la pérdida de la asimetría fosfolipídica de las membranas biológicas según Chap 1995.

emisión de microvesículas (ectocitosis). Estas microvesículas conservan su distribución transversa alterada, después la aminofosfolípido translocasa puede restablecer la asimetría membranar en las células.¹⁹ (fig.2).

Evidencias experimentales de la formación de microvesículas fueron aportadas por el equipo de *Fourcade* en 1996, quienes demostraron que los eritrocitos tratados con el ionóforo de calcio A23187 emiten microvesículas que resultan buenos sustratos para la FLA₂s, a diferencia de las células intactas que son resistentes a la acción de la enzima. Otro interés de este modelo es que el ionóforo de calcio activa una fosfolípasa C (FLC). Esta hidroliza el FI y libera diacil glicerol (DAG), el cual es convertido en fosfatidato (AF) por una kinasa específica. Estos eventos tienen lugar hacia el lado citoplasmático, pero aparentemente el AF es también transferido en parte sobre la hoja externa, donde él puede ser hidrolizado a ácido lisofosfatídico (ALF) por la FLA₂s.¹² Esto permite explicar la implicación de la FLA₂s en la producción de este mediador fosfolípido para el cual se han descrito múltiples actividades biológicas como: activación de plaquetas, efecto vasomotor, estimulación de la proliferación celular o la invasión tumoral.²⁰

MICROVESÍCULAS Y SIGNIFICACIÓN FISIOLÓGICA DE LAS FLA₂s

La significación fisiológica de la acción de las FLA₂s sobre las microvesículas aporta un nuevo fenómeno, la pérdida de la asimetría fosfolipídica. Este hecho llamó poderosamente la atención por sus consecuencias sobre la hemostasia, debido a que la PS expuesta resulta un fuerte activador de la coagulación y del reconocimiento de las células o vesículas apoptóticas por los macrófagos.²¹ *Satta* y otros en 1994 informaron sobre la formación de microvesículas a partir de monocitos estimulados por lipopolisacáridos (LPS), bien conocida por sus efectos inductores sobre la producción del factor de necrosis tumoral α (FNT α), la interleucina-1 (IL-1) y secundariamente sobre las FLA₂s.¹

Fourcade y otros en 1995 establecieron un modelo de microvesículas a partir de hematíes con el cual demostraron que una esfingomielinasa exógena favorece la acción de las FLA₂s sobre las microvesículas. Este efecto establece una nueva vía de señalización utilizada por el FNT α , la IL-1

o el interferón γ (INF- γ) en la cual es activada una esfingomielinasa endógena.

Los estudios más recientes proponen que las FLA₂s actúan preferiblemente sobre microvesículas emitidas por las células cuando han perdido la asimetría fosfolipídica de la membrana. Entre los fosfolípidos que devienen accesible a estas FLA₂s extracelulares, el AP aparece como un precursor potencial del ALP, mediador fosfolipídico dotado de diferentes actividades biológicas. El descubrimiento de un receptor para las FLA₂s abre perspectivas interesantes en diversos dominios de la fisiopatología y la farmacología.¹²

FLA₂s Y ESTADOS FISIOPATOLÓGICOS

Las FLA₂s humanas están implicadas en numerosas funciones biológicas. Ellas provocan las contracciones de los músculos lisos en el sistema cardiovascular y en el parénquima pulmonar, inducen la proliferación de células, están asociadas con una variedad de afecciones inflamatorias como la artritis reumatoide (AR),

el *shock* endotóxico, el síndrome de distrés respiratorio y varios tipos de cáncer gastrointestinal.²²

Pruzanski y Vadas en 1991 postularon la hipótesis de que las FLA₂s aparecen como un efector distal de la inflamación y responsable final de la producción de mediadores lipídicos.²³ La determinación de los niveles de FLA₂s, tanto en los fluidos inflamatorios como en el plasma, tiene valor diagnóstico y pronóstico en pacientes con *shock séptico*²⁴ pancreatitis²⁵ con AR^{5,26} o en estado terminal de SIDA, por la posible relación entre la variación analítica y la evolución de la enfermedad.^{12,27} Estudios realizados indican que aproximadamente el 25 % de los pacientes con AR se les encontró un alto nivel de actividad FLA₂s en suero. Esta mostró una significativa correlación con el resto de los marcadores clínicos y analíticos de la enfermedad.²⁶ En la AR juvenil se observa un incremento extremo de las FLA₂s en las formas sistémicas más severas. Por el contrario, las FLA₂s en circulación disminuyen marcadamente en unión con la remisión clínica, por lo que se considera que esta enzima constituye un buen marcador bioquímico en el monitoreo de esta enfermedad y su terapia.

SUMMARY

Phospholipases A₂ form a family of enzymes that hydrolyzes the ester sn-2 binding of the glycerophospholipids and release fatty acids mainly arachidonic acid and lysophospholipids. Secretory phospholipids A₂ are produced by a number of cells activated by various stimuli like interleukin-1, tumor necrosis factor α and lipopolysaccharides that cause the accumulation of secretory phospholipases A₂ into inflammatory fluids and plasma of patients suffering from several inflammatory diseases. It was recently pointed out that secretory phospholipases preferably act upon microvesicles from cells whose membranes have lost their phospholipid asymmetry.

Subject headings: PHOSPHOLIPASES A/isolation & purification; PHOSPHOLIPASES A/therapeutic use; PHOSPHOLIPASES A/history; ENZYME; INTERLEUKIN-1; TUMOR NECROSIS FACTOR; LIPOPOLYSACCHARIDES.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fourcade O, Simon MF, Leballe F, Gaigé B, Gaits F, Delagebeaudeut C, et al. New concepts on the role of secretory non-pancreatic phospholipase En: New phospholipases and ciclooxigenases as novel drug targets. Paris: Institut Pasteur; 1996.
2. Kudo I, Murakami M, Hara S, Inoue K. Mammalian non-pancreatic phospholipases A₂. *Biochim Biophys Acta* 1993;1170:217.
3. Dennis EA. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A₂. *J Biol Chem* 1994;269:13057-61.
4. Clark JD, Schievella AR, Nalefski EA, Lin LL. Cytosolic phospholipase A₂. *J Lipid Med Cell Sig* 1995;12:83-5.
5. Pruzanski W, Vadas P, Kennedy BP, Beer FC. Physiologic and pathologic roles of phospholipases A₂. New Phospholipases and cyclooxygenases, as novel targets. Paris: Institut Pasteur; 1996.
6. Bereziat G, Maliash J, Olivier JL, Mouloud Z, Berguerand M. Role of intracellular secretory phospholipase in the production of lipid mediators upon cell stimulation. New Phospholipases and cyclooxygenases, as novel targets. Paris: Institut Pasteur; 1996.
7. Waite M. The phospholipases. New York: Plenum; 1987.
8. Mayer RJ, Marshall LA. New insights on mammalian phospholipase A₂s; comparison of arachidonoyl-selective and-nonselective enzymes. *FASEB J* 1993;7:339.
9. Murakami M, Kudo I, Inoue K. Secretory phospholipases A₂. *J Lipid Med Cell Sig* 1995;12:119.
10. Vadas P, Pruzanski W. Role of secretory phospholipases A₂ in the pathobiology of disease. *Lab Invest* 1986;55:391-404.
11. Vadas P, Browning J, Edelson J, Pruzanski W. Extracellular phospholipase A₂ expression and inflammation: the relationship with associated disease states. *J Lipid Med* 1993;8:1-30.
12. Fourcade O, Simon MF, Leballe F, Gaigé B, Gaits F, Delagebeaudeuf C, et al. Phospholipases A₂ et pathologie inflammatoire consensus et nouveaux concepts. *Medicine* 1995;12:323-32.
13. Chen J, Engle SJ, Seilhamer JJ, Tischfield JA. Cloning and recombinant expression of a novel human low-molecular-weight Ca²⁺-dependent phospholipase A₂. *J Biol Chem* 1994;269:2365.
14. _____. Cloning and characterization of novel rat and mouse low-molecular-weight Ca²⁺-dependent phospholipase A₂s containing 16 cysteines. *J Biol Chem* 1994;269:23018.
15. Feuchter-Murthy AE, Freeman JD, Mager DL. Splicing of a human endogenous retrovirus to a novel phospholipase A₂ related gene. *Nucleic Acids Res* 1993;21:135-43.
16. Mizushima H, Kudo I, Horigome K, Murakami M, Hayakawa M, Kim DR, et al. Purification of rabbit platelet secretory phospholipase A₂ and its characteristics. *J Biochem* 1989;105:520.
17. Clark MA. Isolation and characterization of a novel phospholipase A₂ that generates a potent bioactive En: New phospholipases and ciclooxigenases as novel drug targets: lysophospholipid, lysophosphatidic acid. Paris: Euroconferences. Institut Pasteur; 1986.
18. Harwing SSL, Tan I, Qu XD. Bactericidal properties of murine intestinal phospholipase A₂. *J Clin Invest* 1995;95:603-10.
19. Zwaal RFA, Comfurius P, Bevers EM. Platelet procoagulant activity and microvesicle formation. Its putative role in hemostasis and thrombosis. *Biochem Biophys Acta* 1992;1180:1-8.
20. Moolenaar WH. Lisophosphatidic acid signaling. *Curv Op Cell Biol* 1995;7:203-10.
21. Fadok VA, Savill JS, Haslett C, Bratton DL, Doherty DE, Campbell PA, et al. Different population of macrophages use either the vitronection receptor on the phosphatidylserina receptor to recognize and remove apoptotic cell. *J Immunol* 1992;149:4029-35.
22. Lambeau G, Ancian P, Barhanin J, Nicolas JP, Zvaritch E, Beiboer S, et al. A family of receptors for secretory phospholipase A₂. En: New phospholipases and cycloxygenases as novel drug target. Paris: Euroconferences. Institut Pasteur; 1996;1-7.
23. Pruzanski W, Vadas P. Phospholipase A₂ a mediator between proximal and distal effectors of inflammation. *Inmunol Today* 1991;12:143-6.
24. Snyder DW. Development of potent inhibitors of non-pancreatic, group II, secretory phospholipase A₂ and their potential utility for sepsis. En: New Phospholipases and cyclooxygenases, as novel targets. Paris: Institut Pasteur; 1996.
25. Schroder T, Lempinen M, Kivilaakso E, Nikki P. Serum phospholipases A₂ and pulmonary changes in acute fulminant pancreatitis. *Scand J Gastroenterol* 1982;10:79-87.

26. Pruzanski W, Keystone EC, Bombardier C, Snow K, Sternby B, Vadas P. Serum phospholipase A₂ correlates with disease activity in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1988;15:1351-5.
27. Cohen C, Genestal M, Fauvel J, Marquez-Vidal P, Chap H, Cathala B. Pronostic value of plasma type II phospholipase A₂ activity in septic shock. *New Phospholipases and cyclooxygenases, as novel targets*. Paris: Institut Pasteur; 1996.

Recibido: 29 de enero del 2002. Aprobado: 28 de febrero del 2002.

Dra. *Yolanda C. Valdés Rodríguez*. Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de La Habana. San Lázaro y L, El Vedado, municipio Plaza de la Revolución, Ciudad de La Habana, Cuba.