



Fosfolipasas A2 y su importancia clínica

Rafael Buitrago. *QF, Magister en Farmacología Experimental, Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias. Jorge Enrique Gómez Marín, MD, PhD, Profesor Asistente Departamento de Salud Pública y Tropical, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia*

SUMMARY

We review our current knowledge of the molecular and biochemical characteristics of phospholipases A2 (PLA2) enzymes. PLA2 are a superfamily group of enzymes that hydrolyze membrane lipids to produce arachidonic acid and other precursors of prostaglandins. PLA2 are enzymes involved in inflammatory process, remodeling cell membrane and in intracellular signaling. We also describe the pathological process where PLA2 is involved. We describe the specific inhibitor for each group of PLA2 enzymes. Besides, the possible and real clinical applications of each inhibitor is analyzed. The therapeutic field of intervention is wide and inhibition recently developed allows specific inhibition of each group of PLA2. New treatments based on specific inhibition of a particular group of PLA2 enzymes are awaited for diseases as diabetes, sepsis autoimmune diseases and infectious diseases.

Key words: *Phospholipases, Phospholipase A2 enzymatic inhibition membrane lipids. sepsis, inflammation.*

RESUMEN

Se revisa el estado actual del conocimiento con respecto al papel fisiológico de las fosfolipasas A2, su clasificación funcional y molecular. Las PLA2 son enzimas que hidrolizan los ácidos grasos de membrana y llevan a la producción de derivados del ácido araquidónico entre otros. Se describen una serie de procesos patológicos en los cuales se encuentran involucradas. De otra parte se presentan los inhibidores específicos para cada una de las familias de PLA2 y su posible utilización terapéutica. Las PLA2 son enzimas implicadas en procesos inflamatorios, en acciones enzimáticas que deterioran varios sistemas y en el proceso de transducción de señal intracelular. El potencial de intervención con fines de tratamiento es bastante amplio y los inhibidores diseñados en los últimos años han sido muy específicos ya que han tenido en cuenta las particularidades estructurales de cada familia de PLA2, las cuales hacen que tengan funciones muy diferentes entre cada una de ellas. Se pueden augurar la aparición de nuevos tratamientos para enfermedades de tipo metabólico como la diabetes, inflamatorias como la sepsis, enfermedades autoinmunes e infecciones por la inhibición de procesos de invasión de organismos intracelulares obligatorios.

Palabras claves: *Fosfolipasas, fosfolipasas A2, inhibidores enzimáticos, membrana, sepsis, inflamación*

INTRODUCCION

En los últimos años se ha incrementado el interés por el metabolismo de los fosfolípidos en los diferentes sistemas de las células intactas. Descubrimientos recientes muestran que éstos no sólo cumplen actividades estructurales, si no que también son reservorios de moléculas preformadas que actúan como segundos mensajeros y que cumplen papeles importantes en la señalización celular. Los segundos mensajeros son generados por la acción de fosfolipasas intracelulares y extracelulares. Un prominente grupo de la gran colección de fosfolipasas es el de las fosfolipasas A2 (PLA2). Además de las funciones de señalización de las PLA2, éstas enzimas participan en un amplio número de procesos fisiológicos y patológicos los cuales se examinarán más adelante. De acuerdo con resultados experimentales preliminares éstas funciones podrían modificarse con el uso de fármacos inhibidores de las PLA2, lo sugiere que las PLA2 son un blanco terapéutico interesante.

Las fosfolipasas A2 (PLA2) conforman una gran familia de enzimas con una amplia gama de funciones fisiológicas y patológicas, tales como la digestión de alimentos, la fertilización, efectos neurotóxicos, actividad bactericida, señalización celular, etcétera (1). Las fosfatidas Sn-2 acilhidrolasas o fosfolipasas A2 son esterasas que catalizan la hidrólisis del enlace 2 del éster de los 3Sn- fosfoglicéridos.

El resultado de esta actividad enzimática es la liberación de un ácido graso y de un lisofosfolípido (1,2). En 1997 se hizo una clasificación de las PLA2 basada en las secuencias de los nucleótidos de los genes (3). Desde entonces se han identificado nuevos grupos de PLA2: el grupo X y la acetilhidrolasa, que es un nuevo factor activador de plaquetas (PAF). También son recientes la descripción del grupo VIIB y dos nuevas formas del grupo IV denominadas b y g, que han sido clasificadas como grupos IVB y IVC. Si en lugar de utilizar las secuencias del gen que codifica para cada una de ellas se tienen en cuenta sus propiedades biológicas la clasificación de las PLA2 se simplifica en dos principales tipos: **Secretorias** y **No secretorias**, estas últimas pueden a su vez clasificarse en Citosólicas calcio-dependiente (cPLA2 calcio-dependiente) y las intracelulares calcio independiente (grupo VI). Existe otra clase de PLA2 llamada PAF acetilhidrolasas, las cuales parecen actuar sobre el PAF y en la oxidación de lípidos (3).

Las cPLA2 del grupo IV son proteínas de traducción de señales intracelulares de múltiples vías, mediadas por un receptor. Estas han sido clasificadas en reguladas por Ca^{2+} y Ca^{2+} independientes. Las isoformas reguladas por Ca^{2+} tienen una masa molecular de ≈ 85 a 110 KDa, mientras que las isoenzimas Ca-independientes tienen una masa molecular de ≈ 40 KDa. Estas son activadas por fosforilación y muy selectivas por los fosfolípidos que contienen ácido araquidónico (AA). Las reguladas por Ca^{2+} necesitan concentraciones μM de Ca y este no participa en el sitio activo para su funcionamiento pero interactúa con un dominio, encontrado dentro de otras proteínas de señalización intracelular (fosfolipasa C, proteinquinasa C y proteínas G). El Ca^{2+} participa en la transferencia de la cPLA2 del citoplasma hacia la membrana donde se activa. El sitio de la membrana celular de donde la cPLA2 es transferido se ha identificado como parte de la envoltura nuclear. La localización nuclear de la cPLA2 permite el contacto del AA con las proteínas que inducen la oxigenación para su bioactividad. Existe una doble regulación de estas cPLA2. Por una parte el Ca^{2+} que permite la asociación de las proteínas a las membranas para su contacto con el sustrato fosfolípido y por otra una fosforilación de las cPLA2 por las MAP-quinasas sobre el residuo de Serina en la posición 505, lo cual origina un aumento de la actividad de la enzima (4).

Las fosfolipasas A2 de tipo secretorio (sPLA2) son de baja masa molecular de 14 a 18 KDa con una estructura terciaria muy rígida debido a la presencia de 5-8 enlaces disulfuro. Esto le confiere a la enzima, estabilidad contra la proteólisis y resistencia a la desnaturalización, lo cual permite retener su actividad en el fluido extracelular donde ellas actúan. Estas sPLA2 muestran similitud estructural y están ligadas evolutivamente. Estructuralmente las PLA2 de baja masa molecular comparten el mismo tipo de hélice, amino terminal anfipático, un mismo sitio de unión al Ca^{2+} y un mismo sitio activo, el cual incluye una tríada catalítica clásica de Serina estearasa en la que se encuentran puentes disulfuro. Las sPLA2 son relativamente termoestables y necesitan concentraciones de Ca^{2+} a nivel μM para su actividad (4).

Estudios enzimológicos han demostrado que las sPLA2 no forman el intermedio acil característico de las esterasas, pero utilizan la Histidina como sitio activo, acompañada de una Asparragina a fin de polarizar un enlace de H_2O el cual ataca el grupo carbonilo. El ion Ca^{2+} estabiliza la etapa de transición (las cPLA2 no utilizan Ca^{2+} en las etapas del intermediario acil dentro del proceso de catálisis). Las sPLA2 se activan preferencialmente cuando el sustrato hace parte de una micela o de una membrana. Los factores que favorecen la actividad enzimática de la sPLA2 son el diacilglicerol (producto de la actividad de la fosfolipasa C), la lisolecitina y los ácidos grasos libres (2). Basados en su estructura primaria, las sPLA2 pueden ser de 7 tipos: tipo I (sPLA2-I) de las cuales hay subtipo Ia y Ib, tipo II (sPLA2-II) de las cuales hay subtipos IIa y IIb, tipo III (sPLA2-III), tipo V (sPLA2-V), tipo VII (sPLA2-VII), tipo IX (sPLA2-IX) y tipo X (sPLA2-X). En mamíferos la sPLA2-II se encuentra en regiones inflamadas y en el fluido sinovial de pacientes con artritis reumatoidea. Algunas citocinas y lipopolisacáridos incrementan dramáticamente la secreción de sPLA2-II en tejidos de rata, por medio del aumento de la transcripción del gen. Esto implica que la sPLA2-II es uno de los factores que promueven los procesos inflamatorios (5). Otro tipo es la sPLA2-I que se encuentra en el páncreas y actúa como enzima digestiva; se sintetiza y se secreta por las células acinares como una pro-sPLA2-I, la cual es normalmente activada por tripsina en el lumen del duodeno. Además, la sPLA2-I está asociada con la pancreatitis aguda (5). Las sPLA2-IIa se asocian a su sustrato cuando la superficie de la membrana está cargada negativamente, son secretadas en su forma activa y actúan extracelularmente. Sin embargo, las sPLA2-IIa (contrario a las sPLA2-Ib) no presentan selectividad por su sustrato y pueden actuar en la fosfatidiletanolamina y los fosfolípidos aniónicos tales como la fosfatidilserina o el fosfatidilglicerol, que forman la lámina interna de las membranas. La lámina externa de la membrana plasmática está formada esencialmente por fosfolípidos de colina (esfingomielina y fosfatidilcolina). Se cree que una enzima, la aminofosfolípido translocasa provoca el flujo de fosfolípidos de la lámina interna hacia la lámina externa y por lo tanto interviene como mecanismo de regulación de la actividad extracelular de sPLA2-IIa (2).

Otro tipo de isoenzimas de PLA2 asociadas a la membrana (20 a 45 KDa), han sido descritas; sin embargo, actualmente no están bien caracterizadas (4). La Tabla 1 muestra los diferentes grupos de PLA2.

PARTICIPACION DE LAS ENZIMAS PLA2 EN PROCESOS PATOGENICOS DIVERSOS

Se ha demostrado que las PLA2 se encuentran involucradas en diversos procesos patológicos. A continuación se presentan algunos de ellos.

Pancreatitis aguda

Existen dos tipos de fosfolipasas secretorias: pancreática (sPLA2-I) y no pancreática (sPLA2-II), asociadas con la patogenia de la pancreatitis aguda. La ascitis en la pancreatitis se asocia al

Tabla No 1. Clasificación de los diferentes grupos de PLA2.

Grupo	Fuente	Tipo	Tamaño (KDA)	Calcio Necesidad	Enlace Disulfuro	Características Moleculares
IA	Cobras	S	13-15	MM	7	Par His Asp
IB	Porcino/humano pancreáticas	S	13-15	MM	7	Par His Asp
IIA	Serpiente cascabel, víboras protozoarios fluido sinovial /plaquetas	S	13-15	MM	7	Par His-Asp extensión carboxilica
IIB	Víboras	S	13-15	MM	6	Par His-Asp extensión carboxilica
IIC	Ratas /ratones testes	S	15	MM	8	Par His-Asp extensión carboxilica
III	Abejas lagartos	S	16-18	MM	5	Par His-Asp
IVA	Riñon de rata	NS	85	<μM		Secuencias de consenso Ser-228 en GLSGS, Arg-200, necesita Asp-549; sitio de fosforilación Ser-505; dominio CaL B; dominio PH
IVB	Cerebro humano	NS	100	<μM		Extensión N-terminal, Ser-228
IVC	Corazón humano/músculo esquelético	NS	65	Ninguno		Ser228; falta el dominio CaLB; sitios de fosforilación Ser-505/Ser-727
V	Humanos/ratas/ratones corazón/pulmón macrófagos P338D1	S	14	MM	6	Par His-Asp, no extensión carboxilica
VI	macrófagos P338D1, células CHO	NS	80-85	Ninguno		Secuencia de consenso GX SXG, complejo 340-Kda
VIIA	Plasma humano	S	45	Ninguno		Secuencia de consenso GX SXG, Ser273, Asp 296, His, 351
VIIIB	Cerebro bovino	NS	42	Ninguno		Miristolado al N terminal
VIII	Cerebro bovino	NS	29	Ninguno		Ser -47
IX	Caracol marino	S	14	MM	6	Par His-Asp
X	Leucocitos humanos	S	14	MM	7	Par His-Asp

aumento en los niveles de sPLA2-I. mientras que en el plasma se observa aumento en los niveles de sPLA2-II. La sPLA2-I es sintetizada y secretada por las células acinares pancreáticas como una enzima inactiva (pro-sPLA2-I), la cual es normalmente activada por la tripsina en el lumen del duodeno. Aunque el mecanismo de gatillo no se conoce, la sPLA2-I se considera una de las enzimas digestivas más importantes en la destrucción del tejido pancreático. Lo novedoso es que la pancreatitis aguda severa se correlaciona con la concentración de la sPLA2-II y no con la de sPLA2-I. El aumento significativo de la actividad de sPLA2-II en el plasma de las ratas puede contribuir a la alta mortalidad en la fase aguda de una pancreatitis inducida con deoxicolato de sodio (5). El origen celular de las sPLA2-II que circulan en el plasma sanguíneo en enfermedades inflamatorias es desconocido. Se ha observado que una línea celular de hepatocitos secreta sPLA2-II al medio de cultivo cuando se estimula con citocinas. Se ha reportado que la sPLA2-II circulante en el plasma sanguíneo se origina en los hepatocitos (5). Estas observaciones indican que el aumento en la actividad de sPLA2-II esta asociada con el desarrollo de complicaciones hepáticas en la pancreatitis aguda. El incremento

de sPLA2-I en la ascitis en ratas puede contribuir al aumento de la permeabilidad peritoneal observado en la etapa temprana de la pancreatitis inducida con deoxicolato de sodio (5).

Síndrome de dificultad respiratoria aguda del adulto (ARDS)

Los lisofosfolípidos ejercen una mayor lesión sobre las membranas de las células del pulmón durante el síndrome de dificultad respiratoria aguda. El surfactante pulmonar es un complejo lípido-proteína, sintetizado por células epiteliales tipo II alveolares, que disminuyen la tensión superficial a lo largo del epitelio alveolar, favoreciendo la estabilidad alveolar. El surfactante está compuesto de un 10% de proteína y 90% de lípidos, con una alta proporción de dipalmitoil-fosfatidilcolina (DDPC). La destrucción del surfactante aumenta la tensión superficial de la interfase aire-líquido, lo cual provoca colapso alveolar, culminando en un daño agudo del pulmón. La hidrólisis de DDPC es el hecho fisiopatológico temprano que conduce a una acumulación de lisofosfatidilcolina (liso-PC). Esto conduce a un incremento de la permeabilidad capilar y marcada inactividad del

tensoactivo surfactante. Estudios in vivo reportan una relación causal entre la sPLA2-II y la degradación temprana del surfactante. In vitro la sPLA2-II hidroliza los fosfolípidos surfactantes. Esta hidrólisis fue inhibida por la proteína A surfactante (SP-A) a través de una directa y selectiva interacción proteína-proteína entre SP-A y sPLA2-II (6). Por tanto una estrategia terapéutica, sería inhibir la acción de la sPLA2-II.

Fibrosis Quística

La CF es el más común desorden genético recesivo en caucásicos. La enfermedad afecta varios órganos, incluyendo el páncreas y el pulmón, causando un transporte anormal de fluidos y electrolitos en el epitelio exocrino. El defecto básico es un cambio en el gen codificado por la proteína de 170 KDa. La proteína tiene dos unidades similares. La mutación más común es la delección de una fenilalanina en la posición 508 del CFTR ($\Delta F508$ CFTR), en el primer nucleótido. Estudios recientes sobre el mecanismo por el cual la mutación CF afecta la función del CFTR han mostrado que $\Delta F508$ CFTR es retenida en el retículo endoplasmático reduciendo la liberación a la membrana del plasma. El transporte defectuoso y procesamiento de $\Delta F508$ CFTR no está aún bien entendido, pero parece estar involucrada una glicosilación incompleta de la proteína traduciéndose en una mayor sensibilidad a la degradación por proteasas intracelulares. Se ha establecido que CFTR es un canal de cloro regulado por cAMP, que parece tener otras funciones como la modulación de canales de calcio de alta conductancia y el transporte de pequeñas moléculas a través de la membrana. La CF está a menudo asociada con daños en la función pulmonar debido a la infección crónica de las vías aéreas e inflamación. Los pacientes con CF son muy sensitivos a la infección, son más receptores a *Pseudomona aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* en la membrana apical del epitelio de la CF. El incremento de la sensibilidad a la inflamación puede estimular la infección crónica, con altos niveles de elastasa derivada de los neutrófilos en el fluido pulmonar de los pacientes con CF y un aumento en la producción de derivados de IL8 y de 5-lipoxigenasa en las células de pacientes $\Delta F508$. Se ha demostrado que líneas celulares del epitelio traqueal de pacientes con CF que tienen la mutación $\Delta F508$ liberan tres veces más AA y producen más eicosanoides en respuesta a la bradiquinina que un control. Este incremento de la producción de mediadores lípidos no es debido a la diferencia en los receptores de bradiquinina, pero parece estar involucrado en la disregulación de la ruta de la transducción acoplado al receptor de bradiquinina para la estimulación de PLA2. El receptor de bradiquinina pertenece a la familia de receptores con siete dominios transmembrana. El receptor de bradiquinina en células epiteliales traqueales está ligado a la membrana apical y acoplado a la estimulación de la hidrólisis de fosfatidilinositol. La bradiquinina también estimula a la PLA2 liberando AA dando como resultado la síntesis de PGE2. La PLA2 responsable en la liberación de AA de las células epiteliales traqueales no se ha determinado. Los hechos experimentales sugieren que la mutación $\Delta F508$ del CFTR incrementa la habilidad de la PLA2 de hidrolizar los fosfolípidos de membrana, mientras que las formas heterocigotas no. Este incremento parece

estar involucrado a la expresión de $G\alpha_q/11$, dirigiendo una gran estimulación de PLC y MAP-Kinasa incrementando el vertimiento de cPLA2 a la membrana. Por tanto, el incremento de la liberación AA por células $\Delta F508$ CF puede contribuir a aumentar la sensibilidad de los pacientes a las reacciones inflamatorias acompañadas de infección pulmonar. Este defecto, junto con el reciente cambio descrito en los receptores bacterianos puede ser parte del incremento de la sensibilidad de pacientes con CF en la infección pulmonar (7).

Lesión hipóxica experimental de las células del túbulo proximal renal

Varias isoformas de PLA2 se han encontrado en el riñón incluyendo la cPLA2 ($\cong 40-1140$ KDa), la sPLA } 14 -18 KDa) y la mPLA2 (20-45 KDa). La mPLA2 se ha encontrado en el epitelio del túbulo proximal y su actividad es aumentada por estimulación de la angiotensina II a las membranas de las vesículas del borde de cepillo (BBMVs) lo cual origina una breve anoxia. La isoforma Ca^{2+} independiente se ha relacionado con la lesión por hipoxia en las células de túbulo proximal (4). La angiotensina II del epitelio del túbulo proximal produce la liberación de AA previa estimulación de la PLA2 y que es señal independiente de la fosfolipasa C. Además, un receptor subtipo 2 de la Angiotensina II se ha ligado a la cascada de señalización de esta enzima. Se ha demostrado que las fosfolipasas: sPLA2 y la mPLA2 están asociadas con la señal agonista en el epitelio del túbulo proximal renal. La mPLA2 parece regulada de forma diferente que la citosólica. Las observaciones documentan que la Angiotensina II activa la cPLA2 por un mecanismo único que puede involucrar una activación previa a la mPLA2 para liberar AA. Por otra parte el AA y la Angiotensina II han mostrado una actividad MAP-Kinasa la cual activa la cPLA2. Este es un mecanismo nuevo para la activación de la PLA2 en el citosol mediada por MAP-Kinasa (4). El Factor Epidermal de Crecimiento (EGF) induce el metabolismo del AA-(w-hidroxilasa), mientras que la angiotensina II induce el metabolismo de la epoxigenasa en el epitelio del túbulo proximal. Se ha observado que la Angiotensina II estimula la bradiquinina (BK) y el EGF inhibe la actividad de la mPLA2, mientras que la Angiotensina II, la BK y el EGF activan la cPLA2 (4). El sistema del citocromo P450 interviene en la hidroxilación del AA que a su vez modifica la localización y regulación de la actividad de las isoenzimas de PLA2 (4). Este acoplamiento de sistemas, con sus diferencias temporales en la estimulación, lleva a una regulación diferencial de la actividad enzimática de cada subgrupo de PLA2.

Falla multiorgánica

Los niveles circulantes de sPLA2 son marcadores de una lesión en pacientes sépticos o con falla multiorgánica (MOF). El aumento de los niveles de sPLA2 se correlacionan con el desarrollo de la MOF. Varias investigaciones han demostrado que cuando se estimula directamente los neutrófilos (PMNs) se liberan mediadores de inflamación, por degradación enzimática de los lípidos de la membrana plasmática. Además, las sPLA2 pueden actuar como

ligandos y estimular los PMNs independientemente de su actividad enzimática (1). Entendiendo los mecanismos por los cuales la sPLA2 da una vía para modular esta respuesta puede permitir desacoplar la sPLA2 de la MOF.

Diabetes

La secreción de Insulina inducida por colecistoquinina-8 (CCK-8) involucra la activación de la PLA2 calcio- independiente. Al comparar la liberación de insulina por carbacol y la inducción de esta misma secreción por CCK-8 se encontró que la CCK-8 induce la activación de PLA2 en los islotes de manera independiente de la presencia de Ca²⁺ (8). Esto se pudo demostrar en cultivo de células pancreáticas cuando al remover el calcio extracelular, inhibiendo los canales de Ca²⁺ de la membrana plásmica y vaciando los almacenes intracelulares de Ca²⁺, la CCK-8 estimuló aún la liberación de insulina. Esto indica una diferencia entre CCK-8 y el agonista colinérgico carbacol el cual es incapaz de estimular PLA2 en ausencia de Ca²⁺ extracelular. Los estudios experimentales indican que la actividad activadora de CCK-8 es en parte dependiente de una quinasa de proteína C (PKC), aún cuando la mayor parte parece ser independiente de PKC. Esto sugiere que existe como mínimo una ruta adicional de señalización con PLA2 que es independiente de PKC y que está involucrada en la generación de AA y con efecto insulínotropico. La actividad de la PLA2 Ca-independiente debe ser estimulada directamente por ATP, lo que sugiere que esta es una vía alterna al metabolismo de la glucosa para producir la secreción de insulina con pequeñas incrementos en la producción de ATP. Por lo tanto la estimulación con CCK puede ofrecer a las células b una posibilidad alterna para activar la PLA2 Ca-independiente, logrando una afluencia de Ca²⁺ y la exocitosis bajo condiciones de severa reducción en la producción de ATP, en condiciones de baja sensibilidad a la glucosa como es el caso de la diabetes de tipo 2 (8). Si ésta acción de la CCK-8 es conservada y tal vez aumentada en la diabetes tipo 2 puede ser un blanco para el desarrollo de nuevos fármacos especialmente activando los receptores de CCK en las células b.

Aterosclerosis

La sPLA2 del grupo II induce la inflamación y está presente en lesiones ateroscleróticas. Se han emprendido varios estudios para determinar si existe un mecanismo por el cual el grupo II de las sPLA2 puede contribuir a la progresión de la inflamación y aterosclerosis por el incremento en la formación de fosfolípidos oxidados, biológicamente activos. Mediciones in vivo e in vitro de fosfolípidos bioactivos probaron la hipótesis que las sPLA2 pueden incrementar la acumulación de fosfolípidos bioactivos. Se ha demostrado previamente que 3 fosfolípidos oxidados derivados de la oxidación de 1-palmitoil-2- araquinodil-sn-glicero-fosforilcolina (PAPC) estimulan la adhesión de los monocitos a las células endoteliales, un proceso que es conocido por ser un paso importante en la aterogénesis. También se ha demostrado que estos tres fosfolípidos están significativamente aumentados en el hígado de ratones con sPLA2

transgénica, sometidos a dietas altas en grasas, comparados con ratones no transgénicos. Estos estudios han demostrado que los ácidos grasos libres poliinsaturados (PUFA) los cuales son liberados por sPLA2, incrementan la formación de LDL, resultando un aumento en la habilidad para estimular las interacciones monocitos-endotelio (9).

Gingivitis

Se ha podido establecer que las citoquinas IL-1b y TNF α , además de las enzimas PCK, PLA2 y COX-2 estimulan sinérgicamente la producción de las PGE2 en los fibroblastos gingivales, lo que indica un importante papel de estas citoquinas y enzimas en los procesos inflamatorios de los tejidos gingivales in vivo, produciendo un incremento en los niveles de PGE2. Esto implica un papel protagónico en la patogénesis de las enfermedades periodontales (10).

Esquizofrenia

Los estudios con resonancia nuclear magnética han permitido observar cambios de los fosfolípidos de membrana por aumento en la concentración de fosfodiésteres en el cerebro de los pacientes con esquizofrenia. Una posible explicación para este hallazgo es el incremento de la actividad de las enzimas PLA2 que catabolizan los fosfolípidos. Se ha observado un aumento de la actividad de una PLA2 calcio-independiente en el suero de los pacientes con esquizofrenia. Estos cambios, sí se presentan también en el cerebro, pueden explicar el incremento de los niveles de fosfodiésteres observados y por tanto contribuir a los daños fisiopatológicos del desorden. Recientemente, se han utilizado inhibidores de PLA2 en los pacientes con esquizofrenia y se ha encontrado una reducción en la tasa de recambio de los lípidos de membrana (11).

Colitis ulcerativa

Las PLA2 se han encontrado por inmunohistoquímica en células epiteliales del tracto gastrointestinal. Esta enzima fue localizada en las células Paneth, en el borde de cepillo y el citoplasma de los enterocitos. En otro estudio de inmunorreactividad, las PLA2 fueron encontradas en los gránulos secretores de las células de Paneth pero no en otro tipo de células del tracto gastrointestinal. Estos hallazgos indican que las PLA2 cumplen un papel en la patogénesis de las enfermedades inflamatorias del intestino. Sin embargo, las células responsables de la síntesis y almacenamiento de las PLA2-II son las células Paneth, y que ningún otro tipo de células es capaz de sintetizar esta enzima en el tejido normal. Se encontró además, mRNA de PLA2-II en un cultivo de pacientes con colitis ulcerativa y en células metaplásticas de Paneth en el epitelio de un cultivo de mucosa. La activación de la síntesis de PLA2 puede causar daño sobre la mucosa por la generación de radicales libres o provocando la liberación de enzimas lisosomales. Por otra parte, las PLA2-II pueden proteger la mucosa contra la invasión de microbios patogénicos o jugar un papel inmune defensivo mediado por quimiotaxis (12).

Rinitis alérgica

En el lavado nasal de humanos con rinitis alérgica se encuentra actividad PLA2 mientras que en sujetos control no, lo cual sugiere que su actividad aumenta la sensibilidad en sujetos alérgicos cuando este se pone en contacto con alérgenos. El incremento en la actividad de las PLA2 se correlaciona con la aparición de cantidades sustanciales de leucotrienos C4 y lisofosfolípidos. Esto puede representar un evento importante asociado con los desordenes alérgicos (13).

Parasitosis

La PLA2 favorece los procesos de invasión de varios microorganismos tales como *Trypanosoma*, *Entamoeba* y *Rickettsias*. Se ha demostrado que la utilización de inhibidores de la PLA2 disminuye la infección por *Toxoplasma gondii* en una línea de fibroblastos humanos (2). Posteriormente, se caracterizó una fosfolipasa activa en una fracción sonicada de *Toxoplasma gondii*. Su actividad se demostró por dos métodos diferentes: En el primer método la sonicación es seguida de una ultracentrifugación; el sobrenadante es sometido a una cromatografía en columna de separación. En el segundo método, la sonicación de los parásitos es seguida de la solubilización en ácido sulfúrico 0,16 N. Las fracciones sonicadas y extraídas por el método no ácido mostraron una PLA activa calcio-dependiente. Las fracciones obtenidas por solubilización en el ácido son semi-purificadas por cromatografía de exclusión y en cuatro grupos de cuatro fracciones, cada uno mostró una PLA activa. En un ensayo de invasión celular, la adición de estas fracciones solubles en ácido, aumentó entre 1.2 y 2.6 veces el porcentaje de invasión de los taquizoítos. Estos resultados pusieron en evidencia una PLA2 activa parasitaria que favorece la infección. Posteriormente, estos resultados fueron confirmados en los macrófagos murinos y al mismo tiempo se demostró que el parásito activa la producción de derivados de fosfolípidos por las células hospederas (2). Se han propuesto varias hipótesis para explicar cómo la PLA2 puede participar en la penetración de la célula hospedera por el *toxoplasma gondii*. Por una parte los productos de la actividad de la PLA2 parasitaria. El AA puede provocar la lisis de las membranas o una fusión de membrana o la liberación de Ca²⁺. Por otra parte una modificación de la fluidez de la membrana por la hidrólisis de ciertos fosfolípidos facilitaría la invaginación de la membrana de la célula hospedera por el parásito. Se ha demostrado que *Toxoplasma gondii* activa la expresión y la actividad de la sPLA2 tipo IIa por mecanismos aún no determinados lo que podría corresponder a mecanismos de respuesta inflamatoria de los monocitos en presencia de patógenos. En el caso de *Toxoplasma gondii* esto favorece su penetración en la célula hospedera. Las sPLA2 tipo IIa participan en la invasión del *Toxoplasma gondii*, probablemente por fluidificación de la membrana o por la inducción de la expresión de ciertos receptores de membrana, necesarios para la adhesión del parásito a la célula hospedera. De otro lado, el *Toxoplasma* reduce la expresión de la cPLA2 en las fracciones citosólicas de las células infectadas y la inhibición de las cPLA2 celulares no disminuyen el porcentaje de células parasitadas.

Por lo tanto, a la diferencia de procesos de internalización de otros patógenos tales como *Salmonella tiphimurium* la penetración por *Toxoplasma gondii* no implica la cPLA2 celular. Es entonces evidente que el *Toxoplasma gondii* utiliza ciertas funciones celulares (respuesta de las sPLA2) pero de manera diferente a la observada con otros patógenos. Tres isoformas de PLA2 parecen estar presentes en el *Toxoplasma gondii*: dos sPLA2 (tipo Ib y IIa) localizadas en los organelos secretores y una cPLA2 a nivel del citosol y de la membrana perinuclear. Sin embargo sería necesario purificar y caracterizar su actividad enzimática para aclarar sus respectivos papeles. Así la cPLA2 podría intervenir en la producción de prostaglandinas tales como la inhibición de la 5-lipooxigenasa o de la ciclooxigenasa. En las células y en los parásitos se podría demostrar si la acción de la cPLA2 parasitaria se realiza a través de la producción de prostaglandinas y si la actividad de la sPLA2 (celular y parasitaria) se pone en marcha por sus prostaglandinas. Para la confirmación de la existencia de diferentes isoformas de sPLA2 en el *Toxoplasma gondii* (similares a las que existen en células de mamíferos), se deberá realizar la purificación y la caracterización de las enzimas a partir de extractos de los parásitos a fin de determinar su estructura y su actividad. Los resultados con los anticuerpos anti sPLA2 tipo Ia, sPLA2 tipo IIa y anti- cPLA2 demuestran sitios de reconocimiento particular y aportan una evidencia importante de la existencia de estas diferentes isoformas (2). Se ha propuesto un modelo explicativo del rol de las sPLA2 y cPLA2 en el curso de la infección con *Toxoplasma gondii*. El parásito y la célula hospedera poseen fosfolipasas secretorias (sPLA2) y citosólicas (cPLA2). El papel principal de la cPLA2 parasitaria sería la producción del ácido araquidónico que induce un cambio en la simetría de los fosfolípidos de membrana y permite la actividad de sPLA2. La sPLA2 cumple a su vez un papel de "fluidificación" de la membrana de la célula hospedera, facilitando la invaginación y la entrada activa del parásito. El *Toxoplasma gondii* posee una actividad MAP quinasa que puede intervenir en la activación de su propia cPLA2 (2).

PERSPECTIVAS DE APLICACIÓN

Inhibición farmacológica

Las sPLA2 fue la primera forma de PLA2 aislada y caracterizada. Un gran número de reportes aparecieron describiendo las propiedades de algunos inhibidores de las sPLA2, como inhibidores "clásicos" incluidos fármacos antimaláricos (mepacrine), aminoglicosidos, alcoholes y poliaminas. Estos generalmente no inhiben las PLA2 per se, pero actúan en otros sustratos que modifican los niveles de calcio. Por lo tanto existe una falta de especificidad de estos compuestos que impide que puedan ser usados como inhibidores de PLA2. Igualmente existen agentes no específicos modificadores de las PLA2 como la monoalida o bromuro de p-bromofenacil que han recibido gran atención como inhibidores. Este compuesto inhibe in vitro las sPLA2 y no las PLA2 no secretorias por un bloqueo covalente de los residuos expuestos de *Lys* o *His*. Así en un sistema celular estos compuestos pueden interactuar con otras proteínas, haciendo imposible obtener conclusiones sobre sus efectos. Otros compuestos fosfolípidos que

son sustratos análogos sirven como inhibidores reversibles y pueden tener preferencia por las sPLA2. Estos incluyen fosfolípidos de amidas de tioeter y fosfonatos. Infortunadamente, ninguno de éstos parece ser particularmente potente ni in vitro ni in vivo. Además, estos compuestos son anfipáticos y se agregan o se reparten dentro de las miscelas o membranas. Como inhibidores reversibles competitivos en el sitio activo requieren una evaluación cinética para determinar el nivel de inhibición de cada uno (3).

La posibilidad de producir una buena cantidad de PLA2 secretoria no pancreática (sPLA2 tipo IIa) facilitó el proceso de desarrollo de un potente inhibidor para esta sPLA2, partiendo de estructuras que presentaban algún grado de inhibición y que por lo tanto se unen al sitio activo de la enzima. Esto permitió ir haciendo modificaciones a las estructuras, que son derivadas del indol, con el objeto de encontrar una molécula óptima que ejerciera la actividad inhibitoria sobre la PLA2. Esto condujo al desarrollo del compuesto LY311727 o ácido 3-(3-acetamida-benzil-2-etilindolil-5oxy)propano fosfórico (2, 3). En la actualidad se realizan estudios para el uso de derivados del indol para inhibir la sPLA2, para el tratamiento del shock séptico, disturbios respiratorios, inhibidores de la inflamación, rinitis, alergias, pancreatitis y como anti-reumáticos en diferentes formas farmacéuticas (3).

Debido al papel central de las cPLA2 en la señalización con AA, el diseño de inhibidores de cPLA2 es un área reciente y de gran interés. Dos inhibidores de cPLA2 han sido usados ampliamente: araquidonil trifluorometil cetona (AATFMK o también llamado AACOCF3) y el metil araquidonil fluorofosfonato (MAFP). Los dos compuestos tienen una parte común en la estructura: el segmento araquidonil copola con el grupo Ser-activo. Los dos compuestos son inhibidores potentes de las cPLA2 in vitro. Estos pueden actuar como inhibidores de otras enzimas. El uso de bromoenol lactona (BEL) o también llamado haloenol lactona es un sustrato suicida, inhibidor selectivo de fosfolipasa intracelulares calcio independiente. El BEL inhibe también otros importantes efectores en traducción de señales como por ejemplo la fosfatida fosfohidrolasa y cPLA2 calcio dependiente a altas concentraciones (3).

Una lista parcial de sustancias que han reportado en diferentes publicaciones como inhibidores de las diferentes fosfolipasas A2 se resumen en la Tabla 2.

Inhibición antisentido

Para solucionar los problemas inherentes a la falta de especificidad de los inhibidores, se han utilizado oligonucleótidos antisentido para inhibir la expresión de los genes que codifican las diferentes PLA2. Esta estrategia es probablemente una de las más promisorias para obtener inhibidores farmacológicamente activos con baja toxicidad debido a su especificidad a una forma particular de PLA2. Sin embargo estos oligonucleótidos no están desprovistos de efectos colaterales. La inhibición de PLA2 con oligonucleótidos antisentido fue primero descrita para las sPLA2 y desde entonces se han descrito para la

mayoría de las formas de PLA2 presentes en las células (3). Sin embargo al presente, no existen ensayos en humanos oligonucleótidos antisentido como inhibidores de PLA2.

Ensayos in vitro e in vivo de inhibidores de PLA2 para el tratamiento de condiciones específicas Pancreatitis aguda: Se indujo pancreatitis aguda con deoxicolato de sodio (DCA) en ratas. Luego de 1 hora se administró un inhibidor específico de PLA2 tipo II (Thielocin A1b) mostrando una inhibición dosis dependiente contra la actividad de la PLA2 tipo II plasmática (IC50=0.06mM). Además, una solución 10mM de Thielocin A1b inhibió el 96% de la sPLA2 tipo II plasmática. Por otra parte el Thielocin A1b a una concentración 100 mM reduce la ascitis en un 21%. Esto significa que puede inhibir también la sPLA2 tipo I ya que esta es la responsable del aumento en la permeabilidad peritoneal (5).

Síndrome de dificultad respiratoria aguda del adulto (ARDS): Para analizar la relación causal entre la inducción de la sPLA2-II y la generación de derivados lípidos se hizo la administración in vivo en cobayos del inhibidor específico de sPLA2 tipo IIa, el LY311727, a la dosis de 2 mg/Kg de peso disuelto en 25 mL de DMSO, por vía intravenosa e intratecal. Este compuesto inhibe en un 80% los lisofosfolípidos inducidos por la actividad de la sPLA2 y recuperados del fluido de lavado broncoalveolar (BALF) de animales estimulados con LPS. La actividad de PLA2 calcio-independiente fue detectada en homogeneizados de pulmón de animales tratados con lisofosfolípidos. Esta actividad permanece sin cambio cuando se incubaba por 10 minutos con 25 mM de LY311727. A esta concentración, se reduce la actividad de sPLA2 II en el pulmón de los cobayos. Esto fue acompañado por una reducción del 60% en la masa de ácidos grasos libres en el BALF y del contenido de ácido palmítico. Además una disminución en el contenido de lisofosfatidilcolina, principalmente en el nivel 1-palmitoil-2-lisofosfatidilcolina. Para confirmar éstos resultados se administró sPLA2-II recombinante exógeno (r-GP sPLA2-II) lo que indujo un incremento en el nivel de liso-fosfatidilcolina, esencialmente compuesto por 1-palmitoil-2-lisofosfatidilcolina. Esto fue acompañado por un incremento 2.4 veces en la concentración de ácidos grasos en el BALF (6).

Fibrosis Quística: Los estudios se realizaron en cultivos de células fetales epiteliales de la tráquea con CF y normales que fueron inmortalizadas y caracterizadas. Tres líneas celulares fueron estudiadas: una línea celular control (NT-1), una línea celular que tiene una mutación homocigote DF508 de CFTR (CFT-2) y una línea celular que tiene una doble mutación heterocigote S549N y N1303K (CFT-1). La actividad de las PLA2 se analizó en cromatografía en capa fina y se observó que estas tienen una mayor actividad en las células CFT-1 y CFT-2 que en las células de control. El EDTA disminuye la asociación de la cPLA2 con la membrana, pero no con membranas de células estimuladas con BK. Por lo tanto, la estimulación con BK dispara un incremento en el Ca²⁺ intracelular libre, el cual estimula la asociación de la cPLA2 con la membrana.

Tabla No 2. Inhibidores farmacológicos de PLA2

PLA2 NO SECRETORIA	PLA2 SECRETORIA
Oleyloxyethylphosphorycholine OPC (22)	Oleyloxyethylphosphorycholine OPC (22)
[E-6(-Bromomethylene)-tetrahydro-3-(1naphthalenyl)-2H-Pyran-2one] HELSS oBel (22)	Thielocin A1β (3)
Methylarachidonyl fluorophosphonato (20)	Acido 3-(3- acetamida-benzil-2etil-indoli-5-oxi) propano LY311727(2)
Elicosapentaenoic acid EPACOCF 3(20)	[E-6(-Bromomethylene)-tetrahydro-(1naphthalenyl)-2H-Pyran-2one] HELSS oBel (22)
3-(4 octadecyl)-benzoylacrylic acid OBAA (21)	Methylarachidonyl fluorophosphonato (20)
Thioetheramide (21)	12-epi-scalarasial (20)
Wortmannin (21)	Elicosapentaenoic acid EPACOCF3 (20)
Aristolochic acid (21)	p-Bromophenacyl bromide (PBP) (8)
	Cocospongionolide B (18)
	Petrosaspongiolide M. (19)
	Manoalide (18)
	3-(4- octadecyl)- benzoylacrylic acid OBAA (21)
	Thioetheramide (21)
	Wortmannin (21)
	Aristolochi acid (21)
	Ethyleneglycotetraacetic acid 1 (1)
	Ditiotritol (8)
	C- 7 fosfonato (8)

La unión también involucra una interacción con un componente de la membrana que ancla la cPLA2 el cual es mantenido cuando el calcio es removido del medio. La incubación de las células con Thapsigargin, inhibe la recaptación de Ca²⁺ de los almacenes, lo cual indujo una estimulación de AA en el mismo rango que el observado con BK. La estimulación fue alta en células CTF-2 y CTF-1 cuando se compara con las células NT-1. Sin embargo el aumento del calcio intracelular producido por Thapsigargin fue mucho más alto en células CFT-2 que el producido por BK. De estos experimentos se puede concluir que el calcio incrementa la liberación de AA en grado diferente. Por tanto, el aumento del calcio intracelular por BK no explica suficientemente la hipersensibilidad de las células CFT-2 (7).

Lesión experimental hipóxica a las células del túbulo proximal renal: Los estudios se realizaron en células epiteliales de túbulo epitelial renal aislados en conejos machos Zealand White, donde se observó que la Ang II estimula significativamente la actividad de la PLA2 asociada a la membrana en un 88%, mientras que la BK y el EGF inhiben la actividad en un 54% y un 41% respectivamente. Sin embargo, todos los agonistas aumentan significativamente la actividad de la cPLA2 "clásica": la Ang II en 81%, la BK en un 54% y el EGF en 38%. En este grupo, la Ang II es el único agonista que no está ligado al Inositol específico para la PLC en este tipo de células, sugiriendo una estimulación directa de la actividad de la PLA2

asociada a la membrana. Otro aspecto importante de este estudio es que el antisero del péptido Mastoparan inhibe significativamente la actividad de la PLA2 asociada a la membrana en un 70% en contraste con un efecto despreciable sobre la citosólica (4).

Falla multiorgánica: En neutrófilos aislados se incubaron con tres tipos de sPLA2 (veneno de serpiente, pancreática y sinovial) donde se midió la cantidad de superóxido y la elastasa liberada por los PMNs en presencia y ausencia de ácido etilentetracético, un inhibidor enzimático selectivo. Se observó que las sPL2 actúan directamente en los lípidos de la membrana plasmática para estimular los PMNs y producir superóxido y liberación de elastasa. Este mecanismo es bloqueado con una inhibición de las sPLA2. Las sPLA2 provocan liberación de elastasa de los PMNs independientemente de la función enzimática. Este mecanismo no se bloquea con los inhibidores enzimáticos (1).

Diabetes: Las observaciones se realizaron en los islotes pancreáticos de ratas macho Sprague-Dawley, donde se examinó si CCK-8 estimula una forma de PLA2 Ca²⁺-independiente en comparación con la estimulación de un agonista colinérgico activador de PLA2: Carbacol, encontrándose que la CCK-8 induce acumulación de lisop-PC, palmitato como también de AA y que el ácido p-amilcinnamoilantranílico (ACA) inhibidor de PLA2 reduce el flujo

de AA inducido con CCK-8 y de insulina. Ni el antagonista de canales de Ca²⁺, Verapamilo, ni el inhibidor de la Ca²⁺ ATPasa, Thapsigargin, afectan la producción de AA y la secreción de insulina inducidos con CCK-8. Además, a pesar de remover todo el Ca²⁺ extracelular, la CCK-8 incrementa la producción de AA y secreción de insulina. Por el contrario la producción de AA estimulada con Carbacol se redujo con Verapamilo y se abolió por remoción del Ca²⁺ extracelular. Incubando los islotes durante toda la noche con 12-O-tetradecanoil forbol-13-acetato (TPA), la PKC hace una contraregulación que reduce la producción de AA y la secreción de insulina inducida con CCK-8. Estos resultados muestran que la CCK-8 contrario al Carbacol activa una PLA2 Ca²⁺-independiente en los islotes y que la capacidad activadora de PLA2 de la CCK-8 es en parte dependiente de la PCK. Por tanto, la PLA2 Ca²⁺-independiente parece importante para el efecto insulínico de la CCK-8, pero no para el carbacol (3).

Atherosclerosis: Se realizó el estudio en ratones hembras transgénicos con sPLA2 con dieta aterogénica (1.25% de colesterol, 15.75% de grasa y 0.5% de colato de sodio durante 12 semanas); donde se observó que la sPLA2 se expresa en gran medida en el hígado y la aorta de los ratones transgénicos, comparados con ratones no transgénicos. Los fosfolípidos se separaron del hígado de los transgénicos y no transgénicos y se cuantificaron encontrándose que los fosfolípidos nativos: 1-palmitoil-2-araquidonil-sn-glicero-3-fosforilcolina (PAPC) no son significativamente diferentes de los ratones transgénicos y no transgénicos. Contrario a lo observado con los metabolitos 1-palmitoil-2-(5)oxovaleroil-sn-glicero-3-fosforilcolina (POVPC) y 1-palmitoil-2-glutaroil-sn-glicero-3-fosforilcolina (PGPC) cuyos niveles estaban significativamente aumentados en los transgénicos comparados con los no transgénicos. Se demuestra así que la presencia de sPLA2 tipo II puede incrementar los fosfolípidos oxidados activos que tienen actividad aterogénica (9).

Gingivitis: El estudio se realizó en un cultivo de células de fibroblastos de biopsias de 4 pacientes con signos de periodontitis de 8-12 años de edad. Los fibroblastos (3 × 10³) se sembraron en platos en el medio Eagle's suplementado con 5% de suero fetal de ternera (FCS) por 48 horas y se colocaron en presencia y ausencia de IL-1b, TNFα, forbol 12-miristato-13-acetato (PMA), dexametasona (DEX), indometacina (INDO), bromuro de 4-bromofenacil (BPB). Los fibroblastos fueron incubados con el inhibidor de la PCK, bisindolilmaleimida I (BIS) durante un período de 24 horas para luego determinar la producción de PGE2 y PGI2. Observándose que la IL-1b y el TNFα estimulan la producción de PGE2 y PGI2. El tratamiento simultáneo de las células con IL-1b y TNFα origina una estimulación sinérgica de PGE2 y PGI2. La IL-1b y en menor grado el TNFα estimulan la liberación de AA. Además, la IL-1b y en menor grado el TNFα inducen la expresión del mRNA de la COX-2. La adición simultánea de IL-1b y TNFα aumentan sinérgicamente los niveles del mRNA de la COX-2 acompañado de la correspondiente estimulación de la síntesis de PGE2. Ni IL-1b, TNFα, ni la combinación de estas dos citoquinas

afectan los niveles del mRNA de la COX-1. El conocido PMA, un activador de la PCK, aumenta el efecto estimulador de IL-1b y/o TNFα aumenta la expresión del mRNA de la COX-2, lo cual fue acompañado por el incremento correspondiente en la producción de PGE2. El inhibidor de PLA2, BPB y el inhibidor de PKC BIS reducen la producción de PGE2, mientras que la DEX y la INDO suprimen completamente la producción inducida por IL-1b y/o TNFα. Este estudio indicó que la estimulación sinérgica de la producción de prostaglandinas por IL-1b y TNFα es mediada en parte por los niveles de COX-2 y en parte a los niveles de PLA 2 y que la PKC está involucrada en el sistema de transducción de señal del sinérgismo entre las dos citoquinas. El sinérgismo entre IL-1b y TNFα puede jugar un papel importante en el proceso inflamatorio en el tejido gingival in vivo (10).

Esquizofrenia: En este estudio se analizó la actividad de las PLA2 en muestras de suero obtenidos de 24 pacientes con esquizofrenia; donde se observó con el ensayo fluorométrico que la actividad de PLA2 de los individuos está marcadamente aumentada en un 49% comparada con los sujetos control. En contraste en los ensayos radiométricos de las mismas muestras de sueros la actividad de la PLA2 no es significativamente diferente entre los pacientes y los controles. Además las investigaciones demostraron que mientras el ensayo radiométrico mide la actividad de la enzima Ca-dependiente, el ensayo fluorométrico detecta la actividad de la enzima Ca-independiente que posee un pH óptimo ácido-neutro (11).

Colitis ulcerativa: El propósito del estudio fue investigar la expresión de sPLA2 tipo II e identificar las células responsables de la síntesis de sPLA tipo II en muestras de tejido del colon y los nodos linfáticos de pacientes con colitis ulcerativa. Para dicho propósito se utilizó muestras de colon, ileum y nodos linfáticos mesentéricos de 6 pacientes operados consecutivamente de colitis ulcerativa (panproctocolectomía), se utilizó microscopía de luz, inmunohistoquímica para la enzima e hibridización para el mRNA de la sPLA2 tipo II, observándose que el mRNA de las sPLA2 y la enzima sPLA2 se encuentran en las células Paneth en seis pacientes y en células del epitelio columnar de las células de la mucosa del colon en cuatro de los seis pacientes con colitis ulcerativa. Únicamente dos de los seis pacientes controles tienen una débil señal para mRNA de la sPLA tipo II y uno de estos, tiene una inmunorreacción débil para la enzima sPLA2 en células del epitelio columnar en la mucosa del colon. Ninguno de los pacientes control tiene células Paneth metaplásicas (12).

Rinitis alérgica: El objetivo de estudio fue investigar el papel de la PLA2 en la inflamación de la rinitis alérgica. Se utilizaron voluntarios, masculinos y femeninos, sanos, entre 18 y 40 años de edad que tienen reacción negativa a la prueba en piel de un extracto alérgico a una concentración de 100 PNU/mL y pacientes alérgicos seleccionados por su historia clínica o por presentar una reacción intradérmica a una concentración de 10 PNU/mL o menos, de un extracto alérgico (6). Todos los experimentos fueron realizados cuando los sujetos estaban asintomáticos y no tomaban medicamentos,

como mínimo en dos semanas, para identificar los mediadores de la inflamación en el lavado nasal humano seguido con la exposición a una concentración variable de antígeno. Se observó un aumento de la actividad de la PLA2 en los sujetos alérgicos cuando hubo exposición al antígeno. La PLA2 fue parcialmente purificada por extracción ácida, cromatografía de exclusión de tamaño y cromatografía de intercambio iónico. La enzima parcialmente purificada del lavado nasal fue comparada con la PLA2 recombinante humana identificada en el fluido sinovial de pacientes artríticos. Las dos enzimas muestran similar peso molecular (15-16 KDa) en electroforésis en gel de sulfato de dodecil y sodio-poliacrilamida (SDS-PAGE) y las dos reaccionan con el suero policlonal de conejo para la galactoquinasa-PLA2. La actividad de las dos PLA2 fue indistinguible cuando se compararon por dependencia iónica, selectividad a sustratos y sensibilidad a inhibidores: Ditiotreitól (DTT) que inhibe completamente la actividad enzimática y el fosfolípido C-7

fosfonato que muestran una inhibición competitiva dosis dependiente (13).

PERSPECTIVAS

La importancia de las enzimas PLA2 en el control de los aspectos claves de la fisiología celular está bien establecida pero es anticipado afirmar que las nuevas formas de PLA2 y sus funciones lo estén. El reto es identificar las funciones de cada una de las múltiples formas PLA2. Muchos de los datos disponibles sobre la regulación a nivel celular se soportan en el uso de inhibidores que no son específicos para cada uno de los tipos. Sin embargo, estos inhibidores pueden ofrecer caminos para el desarrollo de agentes más selectivos para una enzima blanco determinada. Por otra parte la inhibición con RNA antisentido de las diferentes fosfolipasas puede ser una alternativa muy importante para descubrir los papeles de las nuevas PLA2 en la función celular, además como mecanismo de regulación con fines terapéuticos.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1- **Zallen G, Moore E.** New mechanisms by which secretory phospholipase A2 Stimulates Neutrophils to provoke the release of cytotoxic agents. Arch Surg Vol 1998; 133 : 1229 -1233.
- 2- **Gomez JE, Bonhomme A, Pinon JM.** Une famille d'enzymes présentes des protozoaires aux mammifères: comment les phospholipasas A2 participent au processus d'invasion de Toxoplasma gondii. L'Année biologique 1998; 78: 185 -202.
3. **Balsinde J, Balboa M, Insel P.** Regulation and inhibition of phospholipase A2. annu Pharmacol Toxicol .1999; 39: 175-189.
4. **Harwalkar S., Chang CH., Dulin N.,** Role of phospholipase A2 isozymes in agonist-mediated signaling in proximal tubular epithelium. Hypertension 1998; 31: 809-814.
5. **Furue S, Hori Y, Kuwabara K.** Increased activity of group II Phospholipase A2 in plasma in rat sodium deoxycholate induced acute pancreatitis. Gut 1997; 41: 826-831.
6. **Arbibe L., Kamen k., Vial D., Rougeot C.** Generation of Lyso-phospholipids from surfactant in acute lung injury is mediated by tipe-II phospholipase A2 and inhibited by a direct surfactant protein A-phospholipase A2 protein interaction. J. Clin Invest 102: 1152-1160.
7. **Berguerand M., Klapisz E., Thomas G.** 1997. Differential stimulation of cytosolic phospholipase A2 bradykinin in human cystic fibrosis cell lines. Am. J. Respir Cell Mol.Biol 1997; 481-490.
- 8 **Simonsson E., Karlsson S., Ahren B.,** 1998. Ca-Independent Phospholipase A2 contributes to the insulinotropic action of cholecystokinin-8 in rat islets. Diabetes 1998; 47: 1436-1443.
9. **Leitinger N, Watson A, Roel** of group II secretory phospholipase A2 in atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1999; 19: 1291-1298.
10. **Lindberg Y, Nilson S, Modeer T.** Signal transduction pathways involved in the synergistic stimulation of prostaglandin production by interleukin 1b and tumor necrosis factor a in human gingival fibroblasts J. Dent Res 1999; 78: 61-68.
11. **Brian M, Hudson C, Erlich J.** Increased phospholipid bresakdown in schizopherenia. Arch. Gen. Psychiatry. 1997; 54: 487-494.
12. **Haapamaki M. Gronroos J, Nurmi H.** Gene expression of group II.