

ARTÍCULO DE REVISIÓN

BIOLOGIA CELULAR Y MOLECULAR DE LAS FOSFOLIPASAS A₂

KARIM L. JIMÉNEZ¹, AMPARO I. ZAVALA¹, VÍCTOR IZAGUIRRE¹, ARMANDO YARLEQUE²

RESUMEN

Las fosfolipasas A₂ (PLA₂) son enzimas que pertenecen a una gran familia de proteínas, actualmente clasificadas en 12 grupos; que comparten similar función enzimática y estructural. De acuerdo con las características bioquímicas y el origen celular, las fosfolipasas se clasifican como: citosólica (cPLA₂), secretora (sPLA₂) e intracelular (iPLA₂). La relación estructura-actividad, de este grupo de proteínas es un reto para bioquímicos, biólogos moleculares, toxicólogos, farmacólogos y fisiólogos. Las PLA₂ se han identificado en tejidos de mamíferos, en diversos venenos principalmente de serpientes y en algunas bacterias y plantas. Numerosas funciones fisiológicas y fisiopatológicas sin toxicidad se le han atribuido a las PLA₂ de mamíferos. En contraste, las PLA₂ de venenos son tóxicas e inducen efectos farmacológicos que son mediados probablemente por receptores de membrana, las diversas isoenzimas de las PLA₂ de venenos están involucradas en un proceso evolutivo acelerado debido al rápido cambio en los exones, más no en los intrones ni en las regiones reguladoras de los genes, estas modificaciones son completamente opuestas a las que ocurre en los genes de isoenzimas ordinarias. En esta revisión se describe la enzimología, la regulación celular, los últimos criterios de clasificación, los receptores de membrana, la diversidad biológica de las fosfolipasas de secreción en venenos, mamíferos y bacterias, además se presenta las nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de enfermedades en las que se encuentran involucradas.

Palabras Clave: Fosfolipasas A₂, PLA₂, receptores, inhibidores.

SUMMARY

Phospholipases A₂ (PLA₂) are enzymes that belong to a great protein family, at the moment classified in 12 groups; that they share similar enzymatic function and structure. In agreement with the biochemical characteristics and the cellular origin, phospholipases are classified like: cytosolic (cPLA₂), secretory (sPLA₂) and intracellular (iPLA₂). The relation structure-activity, of this protein group is a challenge for biochemists, molecular biologists, toxicologists, pharmacologists and physiologists. PLA₂ has been identified in tissues of mammals, mainly in diverse snake venoms and some bacteria and plants. Numerous physiological and physiopathological functions without toxicity have been attributed to PLA₂ of mammals. In opposite, PLA₂ of venoms are toxic and induce pharmacological effects that are half-full probably by membrane receivers, diverse isoenzimas of PLA₂ of venoms are involved in an accelerated evolutionary process due to the fast change in exones, more not in intrones nor in the regulating regions of the genes, these modifications completely are opposed to which it happens in the ordinary genes of isoenzymes. In this revision the enzymology is described, the cellular regulation, the last criteria of classification, membrane receptors, the biological diversity of phospholipases of secretion from venoms, mammals and bacteria, in addition it appears the new therapeutic strategies for the treatment of diseases in which they are involved.

Key Words: Phospholipases A₂, PLA₂, receptors, inhibitors.

INTRODUCCIÓN

La superfamilia de las fosfolipasas A₂ (PLA₂) contiene una amplia gama de enzimas definidas por su capacidad de catalizar específicamente la hidrólisis sn-2 del enlace éster de los fosfolípidos

(1), dando como productos ácidos grasos libres y lisofosfolípidos (Fig. 1). Los ácidos grasos liberados como el ácido araquidónico (AA) y el ácido oleico (OA), son almacenes de energía y además, actúan como precursores de eicosanoides, los cuales son potentes mediadores en las señales de transducción en la inflamación (2); y los metabolitos del AA funcionan como segundos mensajeros (3). Los lisofosfolípidos participan en la señalización celular y en el remodelamiento fosfolípido de la membrana (4).

¹ Laboratorio de Biología Molecular, Instituto de Química Biológica, Microbiología y Biotecnología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica.

² Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

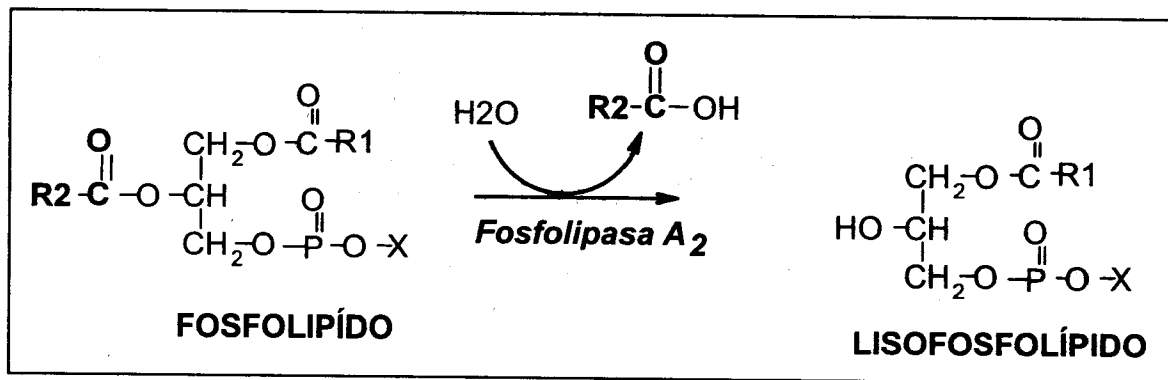


Figura 1. Sitios de acción de PLA₂

Las PLA₂ se caracterizaron, por primera vez, en el veneno de cobra en 1980 (5), inicialmente fueron definidas como enzimas Ca⁺⁺ dependientes, con enlace disulfuro, que contienen histidina y aspartato en el centro catalítico (1); posteriormente se dividieron en dos grupos en base a las posiciones del enlace disulfuro (6). Con el descubrimiento de nuevas PLA₂ se formaron otros grupos y subgrupos; por ejemplo la PLA₂ aislada de líquido sinovial clasificada en el grupo IIA (7) y la PLA₂ descrita en el veneno de abeja incluida en el grupo III (1).

En años recientes, se han descubierto numerosas isoenzimas de PLA₂ relacionadas con los grupos I, II y III. Además, se reportaron otras que no se ajustaron a los grupos iniciales; lo cual llevó a la formación de los grupos V, IX, X, XI y XII.

La definición general de las PLA₂ como enzimas pequeñas, secretadas que contenían histidina en el centro catalítico, cambió en 1991 con el descubrimiento de la fosfolipasa citosólica (cPLA₂); el aislamiento inicial se realizó en el citosol de neutrófilos y de plaquetas (8); el peso molecular elevado de 85 kDa no mantenía ninguna relación con las sPLA₂, en el centro catalítico se encontró serina, además no tenían enlaces disulfuros (8). Estas enzimas se clasificaron como PLA₂ del grupo IV; actualmente asignadas al grupo IVA.

Posteriormente, se encontraron los grupos VI, VII y VIII sin relación con las PLA₂ ya clasificadas, originando un total de 12 grupos tal como se muestra en las tablas 1 y 2. Con la secuenciación de aminoácidos se incrementó el número de subgrupos de forma rápida, lo cual facilitó su caracterización y uso potencial como biomoléculas para el diagnóstico y el diseño de nuevas drogas.

TABLA 1. GRUPO DE PLA₂ QUE TIENEN HISTIDINA EN EL CENTRO CATALÍTICO

Grupo	Fuentes	Tamaño (kDa)	Nº Enlaces S-S	Nº aa extremo carboxilo
I A	Cobra	13 - 15	7	Ninguno
B	Páncreas de mamíferos	13 - 15	7	Ninguno
II A	Líquido sinovial humano, Plaquetas serpiente cascabel, Veneno de víbora.	13 - 15	7	7
B	Veneno de víbora Gabón.	13 - 15	6	6
C	Testículo de rata y ratón.	15	8	7
D	Humano, páncreas de ratón, bazo.	14 - 15	7	7
E	Humano, cerebro de ratón, corazón, útero.	14 - 15	7	7
F	Testículo de ratón, embrión.	16 - 17	7	30
III	Abeja, lagarto, escorpión, humano.	15 - 18	5	ND
V	Corazón de mamíferos, pulmón y macrófagos.	14	6	Ninguno
IX	Veneno de caracol (Conodipina M).	14	6	ND
X	Bazo humano, timo, leucocito	14	8	8
XI A	Retoño de arroz verde (PLA ₂ I)	12.4	6	ND
B	Retoño de arroz verde (PLA ₂ II)	12.9	6	ND
XII	Humano (hGXII)	18	14	ND

AA. aminoácidos

ND. No determinado

TABLA 2. GRUPOS DE PLA₂ QUE TIENEN SERINA EN EL CENTRO CATALÍTICO

Grupo	Fuentes	Nombres alternativos	Tamaño (kDa)
IV A	Células humanas U937, Plaquetas RAW 264.7, riñón de rata	cPLA ₂ α	85
B	Páncreas humano, hígado de rata, cerebro	cPLA ₂ β	114
C	Corazón humano, músculo esquelético	cPLA ₂ γ	61
VI A1	P388D1 macrófagos, CHO	iPLA ₂ o iPLA ₂ A	84 - 85
A2	Linfocitos B humanos, testículos	iPLA ₂ B	88 - 90
B	Corazón humano, músculo esquelético	iPLA ₂ γ , iPLA ₂ -2	88
VII A	Humano, ratón, cerdo, plasma de bovino	PAF - AH	45
B	Humano, hígado de bovino, riñón.	PAF - AH (II)	40
VIII A	Cerebro humano	PAF - AH1b α ₁	26
B	Cerebro humano	PAF - AH1b α ₁	26

CLASIFICACIÓN Y NOMENCLATURA

Ante la dificultad de clasificar la superfamilia de PLA₂ (6), surge la necesidad de estandarizar criterios que ayuden a obtener un esquema lógico de codificación, por ello se han establecido 4 criterios siguientes:

1. La enzima identificada debe hidrolizar el ácido graso en la posición sn-2 de los fosfolípidos con una elevada actividad específica, pudiendo tener otras actividades.
2. Se debe conocer la secuencia aminoacídica de la proteína madura, para asignar el número de grupo y subgrupo; las adiciones futuras a la superfamilia deberían ser previo clonaje, expresión y purificación de la proteína a fin de correlacionar la secuencia con la actividad específica.
3. Las enzimas que tengan secuencias aminoacídicas homólogas deben pertenecer al mismo grupo. Específicamente, si más de un gen existe en una misma especie, se le asigna una letra al subgrupo, por ejemplo los grupos IVA, IVB y IVC. También es posible que los parálogos existan solamente en una especie como es el caso del grupo IIC. Los homólogos de especies diferentes (ortólogos) se deben clasificar siempre que las asignaciones sean posibles, por ejemplo las PLA₂ del grupo IVA del pez cebra y del humano. Por otra parte, a veces es difícil clasificar las enzimas homólogas en subgrupos establecidos, un buen ejemplo para esta situación es el caso de las enzimas de fosfolipasas B (PLB) de varios hongos, que son

homólogas a PLA₂ del grupo IV pero que no son clasificadas en las actuales PLA₂ del subgrupo IV.

4. Las variantes activas del mismo gen de PLA₂ que codifican proteínas distintas, son clasificadas en el mismo subgrupo. Cada variante debe ser enumerada cuando se confirme su actividad, por ejemplo se tienen dos miembros pertenecientes a PLA₂ del grupo VIA, las variantes activas del gen se designan con números arábigos como PLA₂ del grupo VIA-1 y VIA-2.

Estos cuatro criterios permiten agrupar las PLA₂ particulares que no encajan en los grupos iniciales y clasificar los nuevos miembros encontrados. Por consenso se utiliza la abreviatura G para denominar el grupo, por ejemplo PLA₂GIA, para la PLA₂ de grupo IA.

ENZIMOLOGÍA

La clasificación tradicional de las PLA₂ se basa en las características biológicas de la familia y considera tres tipos: secretora, citosólica e intracelular.

Fosfolipasas A₂ Secretoras (sPLA₂). Son enzimas cuyo peso molecular oscila entre 14 kDa, con una estructura terciaria estabilizada por 5 a 8 enlaces disulfuros. Estas características le confieren estabilidad contra la proteólisis, resistencia a la desnaturalización y actividad en los líquidos extracelulares donde se encuentran. En ensayos *in vitro* no muestran selectividad significativa a ningún ácido graso, pero si requieren cantidades milimolares de Ca⁺⁺ (tabla 1).

Varios investigadores han demostrado que los mecanismos de catálisis para las sPLA₂ no ocurren vía la formación clásica de la acil enzima por intermedio de serinestearasas (9). En su lugar, las sPLA₂ utilizan un residuo His estabilizado por aspartato para polarizar un enlace de H₂O, el cual ataca el carbonilo. El ión Ca⁺⁺ conserva el enlace que se requiere para estabilizar el estado de transición tetraédrico intermedio (9). Para esta clase de PLA₂, el Ca⁺⁺ desempeña un papel activo en su catálisis.

Fosfolipasas A₂ Citosólicas (cPLA₂). Se encuentran en la fracción citosólica de todos los tipos de células estudiadas, tienen peso molecular mayor que 85 kDa y se clasifican en el grupo IV (tabla 2). Las características que poseen estas enzimas sugieren alguna relación con receptores que activan cascadas de señalización molecular; la fosforilación se realiza mediante quinasas similar a la activación de las proteinquinasas, lo cual origina un ligero aumento en su actividad específica. Por otra parte, la enzima es capaz de atravesar la membrana celular en respuesta al aumento de Ca⁺⁺ intracelular por unión calcio-lípido (CaLB, «calcium-lipid binding») en el dominio que se encuentra dentro de la proteína. Cabe resaltar que las PLA₂ citosólicas muestran preferencia por el ácido araquidónico contenido en el fosfolípido (9).

Al parecer las cPLA₂ funcionan de forma similar a las serinhidrolasas, actúan como una acil enzima intermediaria. Estas enzimas podrían ser una clase nueva de serinhidrolasa, por el rol de la His en la tríada clásica Ser/His/Asp (9).

Fosfolipasas A₂ Intracelulares (iPLA₂). Recientemente identificadas como enzimas Ca⁺⁺ independientes, se encuentran en muchos tejidos y homogenatos de células, sólo un subtipo de estas enzimas ha sido secuenciado, caracterizado detalladamente y clasificado en el grupo VI de las PLA₂ (10). Además, las iPLA₂ comparten algunas características con la sPLA₂ como no presentar especificidad evidente por el ácido araquidónico y no estar sujetas a modificaciones covalentes postranscripcionales y con la cPLA₂ comparten el tamaño, la localización intracelular, y posiblemente los elementos del mecanismo catalítico (10).

Por otro lado, la iPLA₂ parece funcionar como una serinhidrolasa análoga a cPLA₂ con el residuo activo de Ser situado en el centro de la secuencia consenso GX SXG, lo cual es común en otras lipasas

(10). Estudios recientes sugieren que esta enzima funciona vía un intermediario acilenzima (11); pero no se han descrito otros residuos que participan en su catálisis.

REGULACIÓN CELULAR

Los avances recientes han revelado que varias PLA₂ están implicadas en la formación y regulación de mensajeros lipídicos celulares. En el mecanismo de liberación del ácido araquidónico participan por lo menos dos PLA₂, una citosólica y otra secretora; la activación de la cPLA₂ (12) sería mediada por varias señales, tales como cascadas de fosforilación, aumento de Ca⁺⁺ intracelular y probablemente por los niveles del fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato.

El acoplador sincrónico entre estas señales puede converger para producir una activación prolongada de la cPLA₂ (12). En las células que no expresan sPLA₂, probablemente la cPLA₂ moviliza el AA que se produce durante la activación celular. Sin embargo, en las células que contienen sPLA₂, la liberación de AA parece estar mediada por estas enzimas y no por cPLA₂ (12). Coincidentemente, algunos tipos de células como fagocitos, mastocitos, plaquetas productoras de eicosanoides sintetizan y secretan sPLA₂ (13). Las sPLA₂ liberadas se unen a la superficie externa de las células y producen AA, el cual puede ser capturado por las células circundantes para producir eicosanoides (13). Estudios recientes demuestran que las sPLA₂ a pesar de no tener especificidad por el AA, producen este ácido graso en mayor proporción que otras (13), las razones de esta producción son aún desconocidas.

La acción de la sPLA₂ parece ser dependiente de una cPLA₂ (12). La cPLA₂ es importante en la formación del AA e incluso señala los ajustes que dirigen a las sPLA₂ como efectores de la respuesta. El papel esencial de la cPLA₂ en el metabolismo del AA se ha demostrado utilizando células nulas («Knock out») de ratón, las cuales produjeron metabolitos derivados de AA en menor cantidad (14).

Con respecto a la iPLA₂ parece no estar relacionado directamente en la estimulación de la liberación del AA, pero si es importante en el metabolismo de éste, en particular remodela el ácido graso del fosfolípido (10, 12, 15). Así, la iPLA₂ participa en las cascadas de señalización donde las células

incorporan el AA y otros ácidos grasos a los fosfolípidos de membrana (10). Esta vía de síntesis del ácido graso es nueva, ya que sólo había evidencia de la liberación de AA de las reservas celulares por acción de las sPLA₂ (12), de esta manera las iPLA₂ regularían las reacciones de síntesis del ácido graso, controlando la distribución y concentración subcelular del AA en diversos compartimentos.

RECEPTORES DE FOSFOLIPASAS A₂ SECRETORAS

Hasta el momento, se han descrito receptores para las sPLA₂, la primera evidencia fue obtenida utilizando las enzimas del veneno de serpiente (Tabla 3). Además del rol en la digestión de la presa, las sPLA₂ del veneno de serpiente presentan una amplia variedad de efectos tóxicos y farmacológicos (16). El modelo propuesto por Kini y Evans permite explicar los diferentes efectos farmacológicos de las sPLA₂ del veneno (16). Este modelo se basa en la presencia de receptores específicos localizados en la superficie de las células blanco que tienen alta afinidad por enzimas tóxicas, pero no por las sPLA₂ atóxicas. En base a este modelo se identificaron receptores específicos para varias sPLA₂ (Tabla 4). La neurotoxina sPLA₂ OS₂ al ser utilizada como ligando permitió determinar dos tipos de receptores denominados N y M (17) los cuales son estructural y farmacológicamente diferentes. El tipo N está presente principalmente en la membrana cerebral de ratas, posee al menos dos sitios de unión específicos OS₂, se une con gran afinidad a una variedad de sPLA₂ neurotóxicas, pero muestra baja afinidad por las sPLA₂ no tóxicas como SO₁, estas diferencias de afinidad de las sPLA₂ podrían explicar los efectos neurotóxicos que presentan (18).

Los receptores tipo M constituyen una familia de proteínas con alta afinidad por las sPLA₂ OS₂ (17), y sPLA₂ OS₁ no tóxicas; sin embargo, la neurotoxina del veneno de abeja, tiene gran afinidad por los receptores tipo N, pero no por el M.

Los receptores tipo M se han clonado de varias especies e incluso de humanos (17), presentan una organización estructural (Fig 2) similar al receptor de manosa del macrófago, forman parte de un nuevo subgrupo de receptores de membrana que pertenecen a la superfamilia de lectinas tipo C (18). Los receptores de este nuevo subgrupo presentan aproximadamente el 30% de identidad en secuencia

aminoacídica, tienen un dominio transmembrana singular, poseen un pequeño lazo citoplasmático y una región extracelular grande formada por los dominios N-terminal rico en cisteína y tipo II similar a la fibronectina; y una región de 8 a 10 dominios de reconocimiento de carbohidratos (CDR) distintos. Hasta el momento se han clonado y descrito dos isoformas del receptor tipo M de origen humano, una está unida a la membrana celular y la otra es citoplasmática de forma soluble, carece del dominio transmembrana y de lazo citoplasmático (17). Diversos estudios permitieron elucidar la estructura-función de los receptores de sPLA₂ (Fig. 2) y proponer lo siguiente (19):

- El dominio CDR5 del receptor tipo M es fundamental para la unión de la sPLA₂.
- Los residuos de la enzima cercanos al lazo de unión al Ca⁺⁺ estarían involucrados con la unión al receptor.
- La unión de la sPLA₂ al receptor podría inducir la inhibición de la actividad catalítica.
- El receptor tipo M tiene propiedades endocíticas que rápidamente internalizan las sPLA₂.

Receptores para las sPLA₂ en mamíferos

Las PLA₂ de los grupos IB y IIA del ratón fueron recientemente encontradas con afinidad nanomolar al receptor tipo M, indicando que podrían ser ligandos endógenos de los receptores tipos M y N, de este último con menor afinidad (20).

Al parecer, el receptor tipo M de sPLA₂ desempeña un papel crucial durante los procesos de inflamación inducidos por LPS que conducen al shock endotóxico (21). Los ratones deficientes del receptor después de la exposición a LPS, sobreviven más tiempo, son también resistentes a los efectos letales de las sPLA₂ del grupo IB. Los resultados de estos experimentos sugieren la participación de los receptores en los procesos que conducen al shock endotóxico después de la exposición a LPS (21).

El grupo V de las sPLA₂, desempeñaría un rol en la inflamación, es probable que estas sPLA₂ sean también ligandos naturales del receptor tipo M implicados en los procesos inflamatorios causados por LPS (21).

TABLA 3. DIVERSIDAD MOLECULAR DE LOS RECEPTORES sPLA₂

sPLA ₂	Receptor	Fuente	Ubicación	Peso molecular (kDa)	Afinidad (nM)
Veneno					
OS ₁	Tipo-M	Pulmón	Membrana	180	0.010
OS ₂	Tipo-N	Cerebro	Membrana	36-88	0.006
Crotoxina	Crocalbina	Cerebro	Citosol	50	11.000
Taipoxina	NP1/NP2/NPR	Cerebro	Soluble/soluble/membrana	47/50/65	ND
	Similar tipo-N	Cerebro	Membrana	25/55	4.000
A	Similar tipo-M	Cerebro	Membrana	180	145.000
<i>A. blomhoffii</i>	sPLA ₂	Suero	Citosol	75	4.000
	inhibidor α	Suero	Citosol	160	0.700
	sPLA ₂	Suero	Citosol	160	100.000
	inhibidor β				
	sPLA ₂ inhibidor γ				
Mamífero					
IB	Tipo-M	Pulmón	Membrana	180	1.000
IIA	Tipo-M	Pulmón	Membrana	180	7.000

ND. No determinado

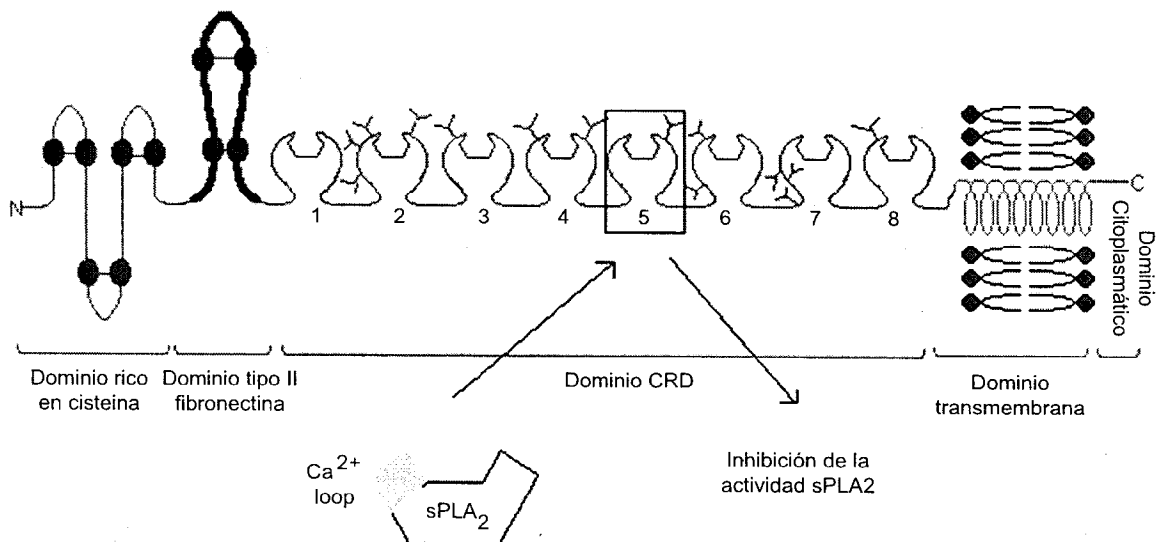


Figura 2. Esquema de la estructura del receptor tipo M de sPLA₂.

INHIBIDORES DE PLA₂

Los inhibidores de PLA₂ de serpientes (PLI) son glicoproteínas multiméricas grandes encontradas en el suero de serpientes, forman complejos solubles con PLA₂ y de esta forma inhiben la acción enzimática y la toxicidad. Estos inhibidores también se han encontrado en el suero de serpientes no venenosas sugiriendo que podrían tener funciones adicionales desconocidas contra sPLA₂ del veneno de otras especies. Hasta el momento, se

han descrito tres tipos de inhibidores de sPLA₂ purificados del suero de *Agkistrodom blomhoffii siniticus*, *Trimeresurus flavoviridis* y *Bothrops asper*.

Los inhibidores tipo á están constituidos de tres a cinco subunidades idénticas o diferentes de 20 a 25 kDa con gran afinidad por las sPLA₂ (22). Este tipo de inhibidores pertenecen a la superfamilia

de lectinas tipo-C y cada una de las subunidades contiene dominios similares a CDR y comparten aproximadamente un 20% de identidad con otros CDRs de lectinas tipo-C (19).

Los inhibidores tipo α son trímeros de 50 kDa que contienen una región rica en leucina, y presentan homología con las alfa glicoproteínas del suero humano (23) y la decurina, una proteína proteoglicano mamífera conocida como receptor sPLA₂ hGIIA (24).

Los inhibidores tipo β son polímeros de 20 a 30 kDa, tienen modelos de cisteínas que asemejan a varias proteínas de mamíferos de la superfamilia triple dedo (25), que incluyen al receptor activador de plasminógeno tipo urokinasa, proteínas Ly-6 relacionadas y una variedad de proteínas específicas del hueso denominadas RoBo-1 (26), pero ninguna de ellas han sido reportadas como receptor de la sPLA₂.

DIVERSIDAD BIOLÓGICA DE sPLA₂

Fosfolipasas A₂ secretoras de venenos

Las formas extracelulares de las sPLA₂ son abundantes en las secreciones de las glándulas

exocrinas como páncreas y glándulas venenosas de serpientes, abejas, escorpiones; y se clasifican en diversos grupos (tabla 5). Las sPLA₂ tienen igual organización estructural y parecido mecanismo catalítico que las de mamíferos, sin embargo la contribución de la actividad enzimática a los efectos adversos es confusa porque no todos los venenos presentan efectos tóxicos e incluso las sPLA₂ tóxicas y no tóxicas pueden tener actividad catalítica similar.

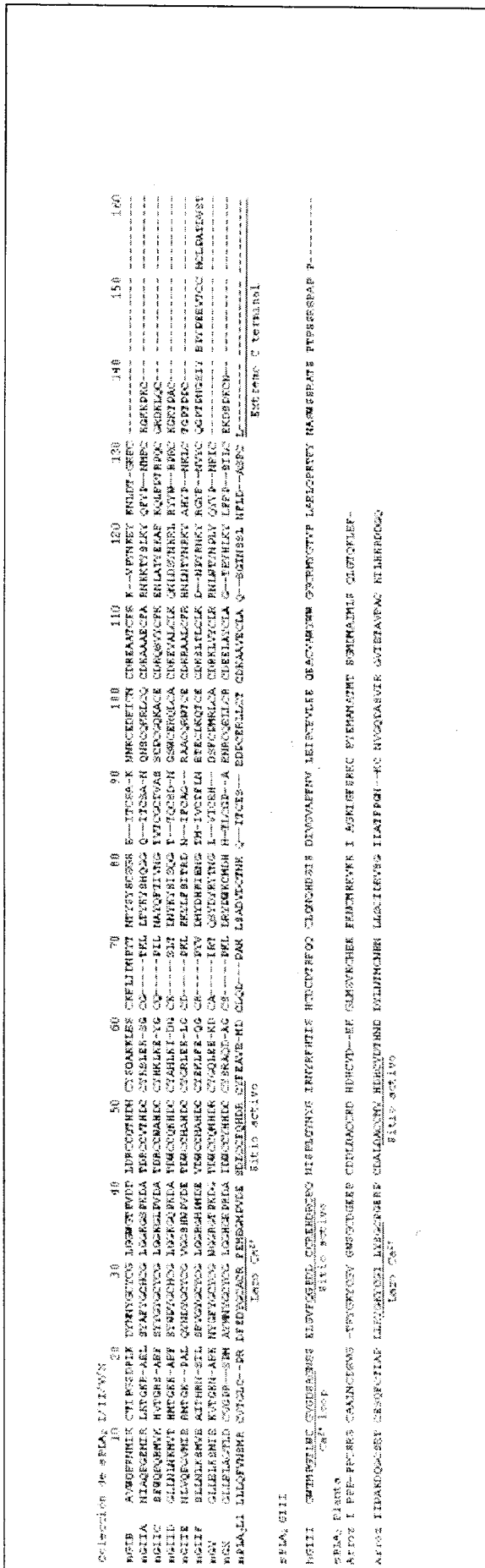
Varias sPLA₂ catalíticamente inactivas presentan propiedades miotóxicas, de acuerdo con estas observaciones, se ha propuesto que las sPLA₂ del veneno podrían actuar como ligandos específicos de los receptores de membrana, cuya interacción posiblemente desempeñe un papel crucial en su mecanismo de acción.

Del análisis de los cDNA y de los genes que las codifican se evidencia que estas enzimas han evolucionado de manera acelerada, lo cual es una excepción de la mayoría de isoenzimas que se conocen hasta el momento. Se cree que la adquisición de las diversas actividades fisiológicas de las isoenzimas de PLA₂ del veneno, explicaría esta evolución acelerada.

TABLA 4. GRUPOS DE FOSFOLIPASAS SECRETADAS EN VENENOS Y MAMÍFEROS

Grupo	Nº S-S	Fuentes sPLA ₂ del veneno	Nombre común	sPLA ₂ de mamíferos	
				Abundante en:	Roles Biológicos Propuestos
I A	7	Cobras y ranas	Equivalente no mamífero	ND	ND
I B	7	Cobras y ranas	sPLA ₂ pancreática	Páncreas, pulmón, bazo	Digestión de lípidos, formación de eicosanoides, contracción celular, proliferación, migración.
II A	7	Veneno serpiente cascabel, víboras.	sPLA ₂ inflamatoria	Tejidos y células inflamadas	Formación de eicosanoides, cáncer, defensa antibacteriana.
II B	6	Víbora Gabón	Equivalente no mamífero	ND	ND
II C	8	Equivalente no venenoso.	sPLA ₂ del Grupo IIC	Testículos	ND
III A	5	Abejas, lagartos	Equivalente no mamífero	ND	ND
III B	5	Escorpión	Equivalente no mamífero	ND	ND
V	6	Equivalente no venenoso	Grupo sPLA ₂ V	Corazón, placenta, macrófagos	Formación de eicosanoides
IX	6	Caracol marino	Equivalente no mamífero	Caracol marino	ND
X	8	Equivalente no venenoso	sPLA ₂ Grupo X	Bazo, timo, leucocitos, colon, páncreas.	ND

ND. No determinado



CLASIFICACIÓN DE LA SECUENCIA AMINOACÍDICA DE LAS sPLA₂ DEL VENENO DE SERPIENTE

En base a la secuencia de aminoácidos, y al patrón de puentes disulfuros las sPLA₂ del veneno de serpientes pertenecen a los grupos I y II (Fig.3 y 4) (27). Las de tipo I están en el veneno de las serpientes de la familia Elapidae (Géneros Elapidae y Hydrophinae) mientras que las de tipo II se encuentran en los venenos de serpientes de la familia Viperidae (Géneros Viperidae y Crotalinae).

Las del grupo II a su vez se subdividen en dos subgrupos: PLA₂ [Asp⁴⁹] y PLA₂ [Lys⁴⁹] (28, 29). Ambos subtipos tienen de 118 a 124 aa y contienen 7 puentes disulfuros cuyas ubicaciones varían a lo largo de la secuencia aminoácida.

El grupo I posee un puente disulfuro entre las posiciones 11 y 77, mientras que la PLA₂ del grupo II tiene un puente disulfuro enlazado en las posiciones 50 y carboxilo terminal.

ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE FOSFOLIPASAS A₂ SECRETORAS DEL VENENO DE SERPIENTES

Estas enzimas exhiben además de la actividad lipolítica, una variedad de actividades fisiológicas tales como: hemólisis, mitotoxicidad, neurotoxicidad, anticoagulante, inductora de edema y agregante plaquetaria.

En el estudio de las diversas actividades fisiológicas se tomó como base el veneno de *T. flavoviridis* (Crotalinae). Se encontró 3 subtipos de PLA₂ [Asp⁴⁹]:

- PLA₂ con *pl* 7.9 en mayor cantidad (30) altamente hemolítica en presencia de fosfolípidos, también presenta actividad miolítica.
- PLA-B con *pl* 8.6 exhibe actividad inductora de edema (31)
- PLA-N con *pl* 10.3 posee actividad neurotóxica (32)

Y dos subtipos de PLA₂ [Lys⁴⁹].

Figura 3. Secuencias aminoacídicas de sPLA₂. Se muestran diferentes sPLA₂ de ratón de los grupos I/II/V/X y mPLA₂L1 de serpiente. El ácido aspártico en la posición 49 es esencial para la catálisis.

Las PLA₂ BPI y BPII son básicas con *pI* 10.2 y 10.3 respectivamente, cuya actividad miolítica es mayor que la PLA₂ (33). Las secuencias aminoacídicas de ambos sub-tipos son idénticas excepto en la posición 67 donde existe un cambio de Asp por Asn en BPII. La actividad de BPII es de 10 a 100 veces mayor que BPI, el residuo Asn en la posición 67 favorece la contracción muscular.

Todas las isoenzimas de las PLA₂ de los venenos de serpientes tienen estructura terciaria similar, sus diversas actividades fisiológicas han sido adquiridas por sustituciones en sitios particulares de los genes y por ende en la secuencia aminoacídica durante el proceso evolutivo.

En términos de miotoxicidad las PLA₂ BPI y BPII del veneno de *T. flavoviridis* son evidentemente miotóxicas. Debido a su naturaleza básica las PLA₂ B y PLA₂ N también pueden presentar actividad miotóxica. Se han descrito cuatro isoenzimas de sPLA₂ miotóxicas de naturaleza básica aisladas del veneno de *B. asper* denominadas como miotoxinas I, II, III y IV (34). Las miotoxinas I y III son PLA₂ [Asp⁴⁹]; y II y IV son PLA₂ [Lys⁴⁹]. Es probable que todas las sPLA₂ de naturaleza básica posean actividad miotóxica, pudiendo ser esta actividad alta o baja. Las PLA₂ miotóxicas son las que se encuentran en mayor cantidad, especialmente en el veneno de serpientes de la familia Viperidae. Así estas PLA₂ juegan un rol principal en el daño a la presa.

ESTRUCTURAS DEL cDNA Y DE LOS GENES QUE CODIFICAN LAS ISOENZIMAS FOSFOLIPASAS A₂ SECRETORAS DE VENENOS DE SERPIENTES

Hasta el momento, se han descrito en la familia Viperidae 81 cDNA y 20 genes que codifican las sPLA₂ tipo II y en la familia Elapidae 67 cDNA y 26 genes del tipo I.

Las isoenzimas del cDNA de la glándula del veneno de *T. flavoviridis* contienen 414 pb y 138 aminoácidos (35). Las regiones no traducidas (UTR) 5' y 3' son más conservadas que las regiones codificantes, presentan una identidad de nucleótidos de 95%, 67% y 89% en las regiones 5'UTR, codificante y 3'UTR respectivamente. En principio, se espera encontrar mayor similitud en las zonas codificantes que en las UTRs (35), esta característica de similitud tan baja entre la zona codificante y las UTRs no es común. Por otro lado, el péptido señal contiene 16 aminoácidos muy conservados con similitud de secuencia de 92%.

En la región que codifica la proteína se calculó el porcentaje de sustituciones nucleotídicas en la primera, segunda y tercera posición de los codones y se encontró que son de 32.1%, 30.0%, y 28.6% respectivamente. El alto porcentaje de sustituciones nucleotídicas en la primera y segunda posición comparado con la tercera es inusual, en la mayoría de casos la tercera posición es más variable que la primera y segunda posición. Las sustituciones en la primera y segunda posición originan numerosas isoenzimas que contienen actividades biológicas diversas.

FOSFOLIPASAS A₂ SECRETORAS EN OTROS ANIMALES

Fosfolipasas A₂ secretoras en mamíferos

Intervienen principalmente en la digestión de lípidos de la dieta, participan además en otras actividades biológicas tales como: proliferación celular, migración celular, liberación de eicosanoides, injuria aguda del pulmón.

Las sPLA₂ del grupo IIA de esta familia también son conocidas como tipo inflamatorio, ya que se encuentra en altas concentraciones en patologías que cursan con inflamación: pacientes con artritis reumatoide, shock séptico, en la mucosa colonizada de pacientes con la enfermedad de Crohn's, colitis ulcerativa, etc. (36). También se detectaron altos niveles de estas enzimas en plasma seminal y fluidos broncoalveolar, peritoneal y sinovial (37). Además la expresión de sPLA₂ se incrementa en pacientes con cánceres de mama (38) y órganos del sistema digestivo (39).

Los inductores más potentes de las sPLA₂ del grupo IIA incluyen a las citocinas proinflamatorias, como las interleucinas 1L-1 α y 1L-1 β , el factor α de necrosis tumoral, y las endotoxinas tales como los lipopolisacáridos. Por otra parte, glicocorticoides, citocinas antiinflamatorias, factor derivado del crecimiento de plaquetas y factores de crecimiento I y II de insulina son potentes supresores de la inducción enzimática de sPLA₂ (40). Todas estas evidencias sugieren que las sPLA₂ del grupo IIA podrían desempeñar un rol importante en la patogénesis y en el desarrollo de la inflamación (41); esta hipótesis se sustenta en los reportes de numerosos estudios donde se muestra la participación del grupo IIA en la producción de mediadores lipídicos y en la liberación de células o microvesículas activas durante la inflamación (42). Sin embargo, algunos resultados indican que el rol del grupo IIA en la inflamación probablemente no está muy clara, ya que las modificacio-

nes en el gen de sPLA₂ del grupo IIA, que codifica enzimas no funcionales (43); muestra un comportamiento fenotípico similar a las enzimas expresadas naturalmente, incluso ambas responden a varios procesos inflamatorios como por ejemplo la artritis inicial (43). Estas contradicciones sugieren que otras sPLA₂ podrían compensar su pérdida o que no tienen un papel importante en la inflamación. Se ha reportado que las sPLA₂ del grupo V intervienen en la liberación de mediadores lipídicos y que podrían compensar la pérdida del grupo IIA (44). Aparte de la liberación de mediadores lipídicos en la inflamación, las sPLA₂ del grupo IIA actúan también como agentes bactericidas, como por ejemplo, en *Escherichia coli* (45).

La participación de las sPLA₂ del grupo IIA como modificadores genéticos en la formación de tumores del cáncer colorectal en ratones es interesante. Los animales con el gen deficiente de sPLA₂ del grupo IIA, presentan más tumores que los ratones que poseen el gen funcional (43), los ratones transgénicos que sobreexpresan el gen de esta enzima llegan a ser resistentes a la tumorigénesis intestinal (46). Hasta el momento, se desconoce el mecanismo por el cual las sPLA₂ del grupo IIA del ratón confieren protección contra la formación de tumores; en el caso del humano diversos estudios sugieren que no son modificantes importantes de cáncer colorectal (47). Al parecer las funciones de la sPLA₂ del grupo IIA del ratón y del humano son distintas, en primer lugar porque el patrón de distribución de la enzima en el ratón y en el humano es muy diferente. En el caso del ratón la enzima se encuentra principalmente en el tejido intestinal, mientras que en el hombre se encuentra distribuida en varios tejidos.

Recientemente, se han clonado y expresado tres nuevos genes de sPLA₂ (Tabla 4). El gen del grupo IIC se clonó de rata y ratón, en el humano parece corresponder a un pseudogen (48). Debido a su alta expresión en los testículos del roedor, se ha propuesto su participación en la espermatogénesis de este animal (49).

Al clonar los genes de sPLA₂ del grupo V del hombre, rata y ratón se encontró que se expresa altamente en corazón, pulmón y placenta (50); también se sensibilizan durante la inflamación en células como macrófagos y mastocitos, donde desempeñan un papel importante en la liberación de mediadores lipídicos en lugar del grupo IIA (45).

Las sPLA₂ del grupo X en el hombre, se expresan altamente en el bazo, timo, leucocitos de sangre periférica, indicando que podrían tener un rol en

el sistema inmune y/o en la inflamación (51). Además, estas sPLA₂ se han descrito en el colon y en el páncreas sugiriendo un posible rol biológico adicional desconocido.

Fosfolipasas A₂ secretoras bacterianas

En 1971, Doi y col. (52) reportaron una fosfolipasa soluble en la membrana externa de *E. coli* la cual no tenía homología, con las fosfolipasas secretoras, citosólicas ni intracelulares anteriormente descritas, la enzima de 31 kDa denominada como fosfolipasa A de la membrana externa (outer membrane phospholipase A, OMPLA) aparentemente contiene 269 aminoácidos con una secuencia señal de 20, es Ca⁺⁺ dependiente, tiene un amplio rango de sustratos específicos presentando actividades fosfolipásicas A₁ y A₂ (53).

En otras especies bacterianas no están completamente estudiadas, hasta el momento se han descrito las PLA de *Vibrio parahaemolyticus* (54), *Rickettsia prowasekii* (55) y *Campylobacter coli* (56), las cuales se han comprobado que tienen actividad hemolítica debido a la acumulación de lisofosfolípidos que desestabilizan las membranas.

La PLA de *Helicobacter pylori* está implicada en la formación de úlcera, esta facilita la exposición del epitelio gástrico a los lisofosfolípidos hemolíticos, facilitando su degradación a pH bajo (57). Algunas PLA bacterianas son consideradas como factores de virulencia que muestran otras funciones además de la ruptura de la membrana celular. La capacidad de la PLA bacteriana de inducir la cascada del ácido araquidónico no está muy bien estudiada.

NUEVAS ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS

Los productos de la hidrólisis de fosfolípidos desempeñan un rol biológico estratégico como mediadores lipídicos en diversos procesos patológicos, la supresión de su producción se considera un tema novedoso de estudio para diseñar alternativas terapéuticas. Los metabolitos del ácido araquidónico son de particular interés por constituir una gran familia de eicosanoides principalmente los productos de COX y LOX. Los eicosanoides están implicados en numerosas actividades fisiológicas y la producción excesiva está relacionada con la fisiopatología de numerosas enfermedades como: inflamación, alergia, daño cerebral, cáncer, metástasis, desórdenes cardiovasculares, etc.

Las sPLA₂ podrían ser un buen blanco terapéutico para el control de procesos inflamatorios, ya que muchas células productoras de eicosanoides como fagocitos y mastocitos sintetizan y secretan estas enzimas (58). Las sPLA₂ desempeñan un papel muy importante en la producción excesiva de ácido araquidónico en condiciones patológicas. Además de la producción de lisofosfolípidos, las sPLA₂ también se sinergizan con otros mediadores inflamatorios (Como ROS) en tejido dañado y podrían actuar como ligandos de receptores que inducen la activación y la proliferación de células normales y cancerosas (59). Las sPLA₂ son denominadas como fosfolipasas A₂ inflamatorias, estas enzimas constituyen blancos de elección para la inhibición y el control de patologías relacionadas con el incremento de estas enzimas o sus productos.

Los inhibidores de estas enzimas se han propuesto como drogas potenciales para el tratamiento de procesos inflamatorios (60). Actualmente existe

gran interés por el desarrollo de inhibidores (Tabla 5) más específicos para cada una de las isoformas de las PLA₂ para impedir que atraviesen la membrana celular y que interfieran con las funciones normales de otras enzimas intracelulares. En este aspecto se están desarrollando los inhibidores PLA₂ extracelulares (EX-PLIs), hasta el momento se cuenta con los derivados de N-fosfatidil-etanolamina y transportadores poliméricos (61). Los últimos incluyen macromoléculas naturales, tal como el ácido hialurónico, heparina y sulfato de condroitina o polímeros usados en la administración y tratamientos clínicos como hidroxietilalmidón, poligelina, carboximetilcelulosa o dextranos. El soporte polimérico adicional de EXPLIs inhibe diferentes tipos de sPLA₂ y protege la membrana celular de su acción; introduciendo de este modo un prototipo potencial de células impermeables a los inhibidores PLA₂ para el tratamiento de condiciones patológicas mediadas por derivados fosfolipídicos.

TABLA 5. INHIBIDORES PARA LAS ISOFORMAS DE PLA₂

Inhibidor	Especificidad	Tipo de inhibición
Manoalida	General	Irreversible
<i>p</i> -Bromofenacil bromuro	General	Irreversible
3-(3-Acetamida-1-bencil-2-etilindolil-5-oxi) propano sulfónico ácido (LY311727)	sPLA ₂	Competitiva
Araquidonil trifluorometil ketoneb	cPLA ₂	Reversible
Metil araquidonil fluorofosfonato	cPLA ₂ , iPLA ₂	Irreversible
BEL	iPLA ₂	Irreversible

Inhibición Antisentido

Los problemas de baja o nula especificidad asociados al uso de inhibidores disponibles en principio se podrían mejorar inhibiendo la expresión de las PLA₂ con oligonucleótidos antisentido. Esta estrategia es probablemente la más prometedora ya que permite obtener inhibidores farmacológicos activos con baja toxicidad y específicos para una forma particular de PLA₂.

La inhibición de PLA₂ empleando oligonucleótidos antisentido primero fue descrita para sPLA₂ (62) y luego para las otras formas importantes de PLA₂

presentes en células como sPLA₂ GV (63), cPLA₂ (64) e iPLA₂ (65). A su vez el desarrollo de este tipo de moléculas específicas para cada isoforma permitirá determinar con mayor certeza el rol que desempeñan las sPLA₂ en la señalización celular.

CONCLUSIONES

La importancia de las PLA₂ en el control de aspectos claves de la fisiología celular está establecida. Sin embargo, las nuevas formas y el descubrimiento de receptores en la membrana celular para estas enzimas podrían presentar funciones fisiológicas desconocidas.

Aún no se ha establecido exactamente la diversidad molecular de las PLA₂ existentes tanto en los venenos como en los tejidos de los mamíferos. Además, esta gran familia de enzimas aumentará si consideramos a las bacterias, animales invertebrados y plantas como fuentes de PLA₂.

Las funciones biológicas de estas enzimas, principalmente la de las sPLA₂, están en estudio por intervenir en numerosos procesos fisiopatológicos. Muchas de las sPLA₂ descritas hasta el momento, son enzimas catalíticamente activas cuya función primaria se relaciona, por ejemplo, con la liberación de potentes mediadores lipídicos, el control de infecciones bacterianas, remoción de células apoptóticas, etc; el desafío es identificar estos roles para cada una de las enzimas pertenecientes a esta gran familia. El conocimiento de las nuevas funciones permitirá el diseño de fármacos específicos para tratar los procesos fisiopatológicos en las que PLA₂ se encuentran involucradas.

El descubrimiento de que algunas enzimas se unen con alta afinidad a los receptores identificados sugiere la existencia de funciones biológicas independientes de la actividad enzimática. Considerando los diversos tipos de receptores que se vienen identificando se espera encontrar nuevas funciones fisiológicas aún no descifradas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Balsinde J, Balboa MA, Insel PA, Dennis EA. Regulation and inhibition of phospholipase A₂. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999; 39: 175-189.
- Austin SC, Funk CD. Insight into prostaglandin, leukotriene, and other eicosanoid functions using mice with targeted gene disruptions. *Prostaglandins Other Lipid Mediators* 1999; 58: 231-252.
- Gijon MA, Leslie CC. Regulation of arachidonic acid release and cytosolic phospholipase A₂ activation. *J Leukocyte Biol* 1999; 65: 330-336.
- Moolenaar WH, Kranenburg O, Postma FR, Zondag GC. Lysophosphatidic acid: G-protein signalling and cellular responses. *Curr Opin Cell Biol* 1997; 9: 168-173.
- Fairbairn D. The Phospholipase of the Venom of the Cottonmouth Moccasin *Agkistrodon piscivorus* L *J Biol Chem*. 1945; 157: 633-644.
- Dufton MJ, Hider RC. Classification of phospholipases A₂ according to sequence. Evolutionary and pharmacological implications. *Eur J Biochem* 1983; 137: 545-551.
- Seilhamer JJ, Pruzanski W, Vadas P et al. Cloning and recombinant expression of phospholipase A₂ present in rheumatoid arthritic synovial fluid. *J Biol Chem* 1989; 264: 5335-5338.
- Sharp JD, White DL, Chiou XG et al. Molecular cloning and expression of human Ca⁺⁺-sensitive cytosolic phospholipase A₂. *J Biol Chem* 1991; 266: 14850-14853.
- Dennis EA. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A₂. *J Biol Chem* 1994; 269: 13057-60.
- Balsinde J, Dennis EA. Function and inhibition of intracellular calcium independent phospholipase A₂. *J Biol Chem* 1997; 272: 16069-72.
- Lio YC, Dennis EA. Interfacial activation, lysophospholipase and transacylase activity of Group VI Ca⁺⁺-independent phospholipase A₂. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1392: 320-32
- Balsinde J, Balboa MA, Dennis EA. Functional coupling between secretory phospholipase A₂ and cyclooxygenase-2 and its regulation by cytosolic Group IV phospholipase A₂. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 7951-56.
- Murakami M, Shimbara S, Kambe T, Kuwata H, Winstead MV, et al. The functions of five distinct mammalian phospholipase A₂s in regulating arachidonic acid release. *J Biol Chem* 1998; 273: 14411-2345.
- Uozumi N, Kume K, Nagase T, Nakatani N, Ishii S, et al. Role of cytosolic phospholipase A₂ in allergic response and parturition. *Nature* 1997; 390: 618-22
- Balsinde J, Balboa MA, Dennis EA. Antisense inhibition of group VI Ca⁺⁺-independent phospholipase A₂ blocks phospholipids fatty acid remodeling in murine P388D1 macrophages. *J Biol Chem* 1997; 272: 29317-21.
- Kini RM, Evans HJ, A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A₂. *Toxicon* 1989; 27: 613-635.
- Lambeau G, Ancian P, Barhanin J, Lazdunski M. Cloning and expression of a membrane receptor for secretory phospholipases A₂. *J Biol Chem* 1994; 269: 1575-578.
- Nicolas JP, Lin Y, Lambeau G, Ghomashchi F, Lazdunski M, Gelb MH. Localization of structural elements of bee venom phospholipase A₂ involved in N-type receptor binding and neurotoxicity. *J Biol Chem* 1997; 272: 7173-180.

19. Lambeau G, Ancianm P, Nicolas JP, Beiboer S, Moinier D, Verheij H, Lazdunski M. Structural Elements of Secretory Phospholipasas A₂ Involved in the Binding to M-type Receptors. *J Biol Chem* March 1995; 10: 5534-540.
20. Ishizaki J, Hanasaki K, Higashino K, Kishino J, Kikuchi N, Ohara O, Arita H. Molecular cloning of pancreatic group I phospholipase A₂ receptor. *J Biol Chem* 1994; 269: 5897-5904.
21. Ancian P, Lambeau G, Lazdunski M. Multifunctional activity of the extracellular domain of the M-type (180 kDa) membrane receptor for secretory phospholipasas A₂. *Biochemistry* 1995; 34: 13146-13151.
22. Inoue, Kogaki H, K Ikeda, Y Samejima, and T Omori-Satoh. Amino acid sequences of the two subunits of a phospholipase A₂ inhibitor from the blood plasma of *Trimeresurus flavoviridis*. Sequence homologies with pulmonary surfactant apoprotein and animal lectins. *J Biol Chem* 1991; 266: 1001-1007.
23. Lizano S, Lomonte B, Fox JW and Gutiérrez JM. Biochemical characterization and pharmacological properties of a phospholipase A₂ myotoxin inhibitor from the plasma of the snake *Bothrops asper*. *Biochem J* 1997; 326: 853-859.
24. Ohkura N, Inoue S, Ikeda K and Hayashi K. Isolation and amino acid sequence of a phospholipase A₂ inhibitor from the blood plasma of *Agkistrodon blomhoffii siniticus*. *J Biochem Tokyo* 1993; 113: 413-419.
25. Ohkura, N, Inoue S, Ikeda K and Hayashi K. The two subunits of the phospholipase A₂ inhibitor from the plasma of Thailand cobra having structural similarity to urokinase-type plasminogen activator receptor and Ly-6 related proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 204: 1212-1218.
26. Kogaki H, Inoue S, Ikeda K, Samejima Y, Omori-Satoh T and Hamaguchi K. Isolation and fundamental properties of a phospholipase A₂ inhibitor from the blood plasma of *Trimeresurus flavoviridis*. *J Biochem Tokyo* 1989; 106: 966-971.
27. Dufton MJ, Hider RC. Classification of phospholipasas A₂ according to sequence. Evolutionary and pharmacological implications. *Eur J Biochem* 1983; 137: 545-551.
28. Maraganore JM, Heinrikson RL. The lysine-49 phospholipase A₂ from the venom of *Agkistrodon piscivorus piscivorus*. Relation of structure and function to other phospholipasas A₂. *J Biol Chem* 1986; 261: 4797-4804.
29. Maraganore JM, Merutka G, Cho W, Welches W, Kezdy FJ, Heinrikson RL. A new class of phospholipase A₂ with lysine in place of aspartate 49. Functional consequences for calcium and substrate binding. *J Biol Chem* 1984; 259: 13839-13843.
30. Oda N, Ogawa T, Ohno M, Sasaki H, Sakaki Y, Kihara H. Cloning and sequence analysis of cDNA for *Trimeresurus flavoviridis* phospholipase A₂, and consequent revision of the amino acid sequence. *J Biochem Tokyo* 1990; 108: 816-821.
31. Yamaguchi Y, Shimohigashi Y, Chijiwa T, Nakai M, Ogawa T, Hattori S, Ohno M. Characterization, amino acid sequence and evolution of edema-inducing, basic phospholipase A₂ from *Trimeresurus flavoviridis* venom. *Toxicon* 2001; 39: 1069-1076.
32. Chijiwa T, Hamai S, Tsubouchi S, Ogawa T, Deshimaru M, Oda-Ueda N and col. Interisland mutation of a novel phospholipase A₂ from *Trimeresurus flavoviridis* venom and evolution of Crotalinae group II phospholipasas A₂. *J Mol Evol* 2001; 57: 546-554.
33. Yoshizumi K, Liu SY, Miyata T, Saita S, Ohno M, Iwanaga S, Kihara H. Purification and amino acid sequence of basic protein I, a lysine-49-phospholipase A₂ with low activity, from the venom of *Trimeresurus flavoviridis* (habu snake). *Toxicon* 1990; 28: 43-54.
34. Gutierrez JM, Ownby CL, Odell GV. Isolation of a myotoxin from *Bothrops asper* venom: partial characterization and action on skeletal muscle. *Toxicon* 1984; 22: 115-128.
35. Ogawa T, Oda N, Nakashima K, Sasaki H, Hattori M, Sakaki Y, Kihara H, Ohno M. Unusually high conservation of untranslated sequences in cDNAs for *Trimeresurus flavoviridis* phospholipase A₂ isozymes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 8557-8561.
36. Arbibe L, Koumanov K, Vial D, Rougeot C, Faure G, Havet N, et al. Generation of lyso-phospholipids from surfactant in acute lung injury is mediated by type-II phospholipase A₂ and inhibited by a direct surfactant protein A-phospholipase A₂ protein interaction. *J Clin Invest* 1998; 102: 1152-1160.

37. Yamashita S, Yamashita J, Sakamoto K, Inada K, Nakashima Y, Murata K, et al. Increased expression of membrane-associated phospholipase A₂ shows malignant potential of human breast cancer cells. *Cancer* 1993; 71: 3058-3064.
38. Ogawa M, Yamashita S, Sakamoto K and Ikei S. Elevation of serum group II phospholipase A₂ in patients with cancers of digestive organs. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1991; 74: 241-244.
39. Vadas P, Pruzanski W, Stefanski E, Ellies LG, Aubin JE, Sos A, et al. Extracellular phospholipase A₂ secretion is a common effector pathway of interleukin-1 and tumour necrosis factor action. *Immunol Lett* 1991; 28: 187-193.
40. Jacques C et al. Posttranscriptional effect of insulin-like growth factor-I on interleukin-1 beta-induced type II-secreted phospholipase A₂ gene expression in rabbit articular chondrocytes. *J Clin Invest* 1997; 99: 1864-1872.
41. Murakami M et al. The functions of five distinct mammalian phospholipase A₂ in regulating arachidonic acid release. Type IIa and type V secretory phospholipase A₂ are functionally redundant and act in concert with cytosolic phospholipase A₂. *J Biol Chem* 1998; 273: 14411-14423.
42. Fourcade O et al. Secretory phospholipase A₂ generates the novel lipid mediator lysophosphatidic acid in membrane microvesicles shed from activated cells. *Cell* 1995; 80: 919-927.
43. Kennedy BP et al. A natural disruption of the secretory group II phospholipase A₂ gene in inbred mouse strains. *J Biol Chem* 1995; 270: 22378-22385.
44. Balboa MA, Balsinde J, Winstead MV, Tischfield JA and Dennis EA. Novel group V phospholipase A₂ involved in arachidonic acid mobilization in murine P388D1 macrophages. *J Biol Chem* 1995; 271: 32381-32384.
45. Harwig SS et al. Bactericidal properties of murine intestinal phospholipase A₂. *J Clin Invest* 1995, 95: 603-610.
46. Cormier RT et al. Secretory phospholipase PLA₂G2A confers resistance to intestinal tumorigenesis. *Nat Genet* 1997; 17: 88-91.
47. Riggins GJ, Markowitz S, Wilson JK, Vogelstein B and Kinzler KW. Absence of secretory phospholipase A₂ gene alterations in human colorectal cancer. *Cancer Res* 1995; 55: 5184-5186.
48. Chen J et al. Localization of group IIC low molecular weight phospholipase A₂ mRNA to meiotic cells in the mouse. *J Cell Biochem* 1997; 64: 369-375.
49. Cupillard L, Koumanov K, Mattei MG, Lazdunski M and Lambeau G. Cloning, chromosomal mapping, and expression of a novel human secretory phospholipase A₂. *J Biol Chem* 1997; 272: 15745-15752.
50. Tischfield JA et al. Low molecular weight, calcium-dependent phospholipase A₂ genes are linked and map to homologous chromosome regions in mouse and human. *Genomics* 1996; 32: 328-333.
51. Chen J, Engle SJ, Seilhamer JJ and Tischfield JA. Cloning and recombinant expression of a novel human low molecular weight Ca⁺⁺-dependent phospholipase A₂. *J Biol Chem* 1994; 269: 2365-2368.
52. Doi O, Ohki M and Nojima S. Two kinds of phospholipase A and lysophospholipase in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Acta* 1972; 260: 244 - 258.
53. Snijder HJ, Dijkstra BW. Bacterial phospholipase A: structure and function of an integral membrane phospholipase. *Biochimica et Biophysica Acta* 2000; 1488: 91-101.
54. Shinoda S, Matsuoaka H, Tsuchie T, Miyoshi SI, Yamamoto S, Taniguchi A and Mizuguchi Y. Purification and characterization of a lecithin dependent haemolysin from *Escherichia coli* transformed by a *Vibrio parahaemolyticus* gene. *J Gen Microbiol* 1991; 137: 2705-2711.
55. Winker HH. Rickettsia species (as organisms) *Annu Rev Microbiol* 1990; 44: 131-153.
56. Grant KA, Belandia IU, Derrer N, Richardsdon PT y Park SF. Molecular characterization of *pld A*, the structural gene for a phospholipase A from *Campylobacter coli*, and its contribution to cell-associated hemolysis. *Infect Immun* 1997; 65: 1172-1180.
57. Slomiany BL, Slomiany A. Mechanism of *Helicobacter pylori* pathogenesis: Focus on mucus. *J Clin Gastroenterol* 1992; 14: 5114-5121.
58. Wong PYK and Dennis ED. Phospholipase A₂: Role and Function in Inflammation, Plenum Press, NY. 1990.

59. Pruzanski W, Vadas P. Pruzanski W, Vadas P. Phospholipase A₂, a mediator between proximal and distal effectors of inflammation. *Immunol Today* 1991; 12: 143-6.
60. Hack CE, Wolbink GJ, Schalkwijk CT, et al. A role for secretory phospholipase A₂ and C-reactive protein in the removal of injured cells. *Immunol Today* 1997; 18:111-115.
61. Dan P, Dagan A, Krinsky M, Pruzanski W, Vadas P, Yedgar P. Inhibition of type I and type II phospholipase A₂ by phosphatidyl-ethanolamine linked to polymeric carriers. *Biochemistry* 1998; 37: 6199-6204.
62. Barbour SE, Dennis EA. Antisense inhibition of group II phospholipase A₂ expression blocks the production of prostaglandin E₂ by P388D1 cells. *J Biol Chem* 1993. 268:21875-82.
63. Roshak A, Sathe G, Marshall LA. Suppression of monocyte 85-kDa phospholipase A₂ by antisense and effects on endotoxin-induced prostaglandin biosynthesis. *J Biol Chem* 1994; 269:25999-6005.
64. Locati M, Lamorte G, Luini W, Introna M, Bernasconi S, et al. Inhibition of monocyte chemotaxis to C-C chemokines by antisense oligonucleotide for cytosolic phospholipase A₂. *J Biol Chem* 1996; 271: 6010-16.
65. Balsinde J, Balboa MA, Dennis EA. Antisense inhibition of group VI Ca⁺⁺-independent phospholipase A₂ blocks phospholipids fatty acid remodeling in murine P388D1 macrophages. *J Biol Chem* 1997; 272: 29317-21.