

UNIVERSIDAD DE CIENCIAS MÉDICAS
“DR. SERAFÍN RUIZ DE ZÁRATE RUIZ”
SANTA CLARA, VILA CLARA

ARTÍCULO ORIGINAL

EVALUACIÓN DEL COMPORTAMIENTO DE LA FOSFOLIPASA A2 EN LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL

Por:

Lic. Danay Heredia Ruiz¹, Lic. Douglas Fernández Caraballo², Dr. en Ciencias. Emilio González Rodríguez³, MSc. Jesús Alfonso Rodríguez⁴ y Dra. Marianela Ballesteros Hernández⁵

1. Licenciada en Tecnología de la Salud. Laboratorio Clínico. Unidad de Investigaciones Biomédicas. Instructora. UCM-VC. e-mail: danayhr@iscm.vcl.sld.cu
2. Licenciado en Bioquímica. Unidad de Investigaciones Biomédicas. Instructor. Aspirante a Investigador. UCM-VC
3. Ingeniero en Electrónica y Telecomunicaciones. Doctor en Ciencias Técnicas. Universidad Central de Las Villas
4. Licenciado y Máster en Bioquímica. Unidad de Investigaciones Biomédicas. Profesor Auxiliar. UCM-VC.
5. Especialista de I Grado en Fisiología Normal y Patológica. Unidad de Investigaciones Biomédicas. Asistente. UCM-VC.

Resumen

Las especies reactivas del oxígeno, dada su alta reactividad, son capaces de producir peroxidación de los lípidos de membrana, factor que es determinante en el mecanismo del daño endotelial, pues provoca la activación de la enzima fosfolipasa A2, la cual es clave en el recambio de los fosfolípidos de membranas y en la generación de diversas sustancias bioactivas, entre las que se encuentra el ácido araquidónico. Según investigaciones recientes, la patogénesis de la hipertensión arterial debida al incremento de las especies reactivas del oxígeno ha sido atribuida a una disfunción endotelial causada, entre otros factores, por la generación de isoprostanos vasoconstrictores provenientes de la peroxidación del ácido araquidónico. Por ello, nos trazamos como objetivo fundamental comparar la actividad de la enzima fosfolipasa A2 en individuos sanos y en hipertensos pertenecientes a áreas de salud del municipio Santa Clara, para lo cual empleamos una técnica colorimétrica basada en la acción catalítica que tiene esta enzima, la cual produce una acidificación del medio por la liberación de lisofosfolípidos y ácidos grasos. Estos cambios en el pH del medio se traducen en cambios en la absorbancia de la solución sustrato. De acuerdo con el procesamiento estadístico realizado, se encontraron diferencias significativas en los dos grupos de estudio. El aumento de los niveles de fosfolipasa A2 en hipertensos evidencia que constituye un predictor independiente, a largo plazo, de la enfermedad cardíaca coronaria y la enfermedad cerebrovascular.

Descriptor DeCS:

FOSFOLIPASAS A
HIPERTENSION/enzimología
ESPECIES DE OXIGENO REACTIVO

Subject headings:

PHOSPHOLIPASES A
HYPERTENSION/enzymology
ESPECIES DE OXIGENO REACTIVO

Introducción

Las fosfolipasas son un grupo oblicuo y diverso de enzimas descritas desde 1967, que inducen cambios en la composición membranal, activan la cascada inflamatoria y alteran las vías de señalización celular. Las fosfolipasas A2 (FLA2) son las responsables de la movilización de los ácidos grasos, incluido el ácido araquidónico (AA) a partir de los fosfolípidos.

Las FLA2 son una familia de enzimas que hidrolizan el enlace éster sn-2 de los glicerofosfolípidos y liberan ácidos grasos, principalmente el ácido araquidónico y lisofosfolípidos. Estas enzimas son claves en el recambio de los fosfolípidos de membranas y en la generación de diversas sustancias bioactivas. Existen dos grandes clases: las FLA2 intracelulares o citosólicas (FLA2c), de masa molecular elevada (40-85 kDa) y las FLA2 de secreción (FLA2s), de masa molecular pequeña (14-18 kDa). Las formas extracelulares de las FLA2 son extremadamente abundantes en las secreciones de las glándulas exocrinas, como páncreas y glándulas venenosas de serpientes, abejas, escorpiones, así como en sitios inflamatorios¹⁻³.

El ácido araquidónico se encuentra formando parte de la estructura de los fosfolípidos de membrana, de manera que el primer paso en su metabolismo consiste en su liberación, catalizado por la fosfolipasa A2. Esta reacción enzimática se estimula en estados que pueden ser fisiológicos o patológicos^{4,5}. Al observar los estímulos inespecíficos que conducen a la liberación del ácido araquidónico, puede observarse que estos generalmente se manifiestan en estados en los cuales se produce daño celular mediado por la acción de metabolitos reactivos del oxígeno⁶⁻⁸.

En experimentos en los que se logra isquemia por oclusión de la arteria coronaria en animales de laboratorio, el metabolismo del ácido araquidónico se incrementa con abundante producción de leucotrienos, prostaglandinas y tromboxanos, cuando los sistemas de defensa son seriamente deteriorados.

Según investigaciones recientes, la patogénesis de la hipertensión arterial (HTA) debida al incremento de las especies reactivas del oxígeno (ERO) ha sido atribuida a una disfunción endotelial causada por inactivación del óxido nítrico, generación de isoprostanos vasoconstrictores provenientes de la peroxidación del ácido araquidónico, así como de vasopresores o de la disminución de la actividad vasodilatadora⁹⁻¹¹.

Se ha estimado que el efecto final depende del rango y predominio de distribución de la fosfolipasa A2 entre las lipoproteínas de baja densidad oxidada (OxLDL) y las lipoproteínas de alta densidad (LDH). Lo que sí es definitivo es que su elevación es un marcador de inflamación, y la experimentación ha evidenciado que su inhibición dirigida y específica puede tener contundentes efectos antiaterogénicos. Varios estudios han demostrado que la fosfolipasa A2 constituye un predictor independiente a largo plazo de enfermedad cardíaca coronaria y de enfermedad cerebrovascular⁹.

La enfermedad cardiovascular es la más extendida a nivel mundial, es identificada como uno de los principales factores de riesgo de mortalidad y la tercera causa de incapacidad en la población general. La HTA esencial desencadena un gran número de enfermedades, entre las que se encuentran la cardiopatía isquémica, la insuficiencia cardíaca, la enfermedad cerebrovascular, la insuficiencia renal y las afectaciones de la vasculatura periférica y de la retina¹². Por tanto, nos propusimos realizar un estudio que permitiera establecer la relación existente entre la alteración de la actividad de la enzima prooxidante FLA2 y el padecimiento de HTA esencial.

Métodos

El diseño metodológico científico de la investigación fue experimental, y constituye un acercamiento a la caracterización del comportamiento de la enzima FLA2 en relación con la HTA

esencial, en el municipio de Santa Clara, teniendo en cuenta que no se tiene conocimiento de estudios previos en el municipio que reflejen valores probables de este elemento para caracterizar a los normotensos e hipertensos.

Para realizar el estudio se utilizó un total de 198 muestras, obtenidas de un pesquisaje a la población del municipio de Santa Clara. El total de las muestras se clasificó por un grupo de expertos, y se formaron dos grupos: uno control con 145 individuos normotensos y otro con 53 hipertensos.

A cada paciente se le realizó la extracción de 5 mL de sangre con jeringuilla desechable. Las muestras de sangre fueron procesadas y se les determinó la actividad enzimática de FLA2 el mismo día de la extracción.

Las determinaciones fueron realizadas en un espectrofotómetro Génesis 10 UV, en el Laboratorio de Química Sanguínea de la Universidad Médica de Villa Clara. Los reactivos utilizados son de alta calidad y pertenecen a la firma MERCK y SIGMA.

La determinación de la fosfolipasa A2 es una técnica colorimétrica que se basa en la acción catalítica que tiene esta enzima sobre los fosfolípidos, pues provoca la liberación de lisofosfolípidos y ácidos grasos. Estos últimos producen una acidificación del medio que ocasionan cambios en la absorbancia de la solución sustrato. El ensayo fue realizado mediante el empleo de una curva patrón de HCL 0,1N.

Para la hidrólisis espontánea, se midió la absorbancia de una mezcla sustrato (fosfatidilcolina, rojo cresol 0,6 %, glicil-glicina 0,1 M y cloruro de calcio 20 mM) a los 10 seg, 30 seg y al minuto, a una longitud de onda de 578 nm.

Para la hidrólisis total, se hizo reaccionar la mezcla sustrato con HCL 0,1 N y se midió la absorbancia a los 30 seg a 578 nm.

Para el procesamiento de la muestra, se hizo reaccionar la mezcla sustrato con la muestra de suero y se midió la absorbancia a 578 nm durante 10 seg, 30 seg y al minuto.

Los resultados obtenidos fueron procesados mediante el paquete estadístico SPSS (versión 10.0). En primer lugar, se verificó la distribución normal de los datos mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov, y se aplicó la prueba t de Student para evaluar las diferencias entre normotensos e hipertensos con respecto a la actividad enzimática.

Resultados

La tabla 1 muestra los valores medios de la enzima FLA2 para normotensos e hipertensos mediante estadísticos de grupo.

Tabla 1 Valores medios de FLA2 en normotensos e hipertensos. (Estadístico de grupo).

Grupos	Número de muestras	Media	Desviación estándar	Error típico
Normotensos	145	4,4776	2,4854	0,3980
Hipertensos	53	6,8715	3,3108	0,5596

La tabla 2 muestra los resultados informados por la comparación de los valores de actividades enzimáticas para ambos grupos de estudio, mediante la prueba de Levene para igualdad de varianzas y la prueba t para igualdad de medias, con un nivel de confiabilidad de un 95 %.

Tabla 2 Prueba de muestras independientes para la comparación de la actividad de fosfolipasa A2 (FLA 2).

Prueba de Varianza	Prueba de Levene para igualdad de varianzas		Prueba t para la igualdad de medias						
	F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típico de la diferencia	95 % Intervalo de confianza para la diferencia	
								Inferior	Superior
Varianzas iguales	2,80	0,098	-3,54	72	0,001	-2,3939	0,6763	-3,7421	-1,0457
Varianzas desiguales			-3,48	62,73	0,001	-2,3939	0,6867	-3,7663	-1,0215

Discusión

En nuestro estudio se encontró que existe diferencia significativa en cuanto a la actividad de la enzima FLA2 en hipertensos, al compararlos con los normotensos. El nivel de significación determinado mediante la prueba *t* para la comparación de medias fue de un 0,001, y se demostró la existencia de diferencias significativas para el nivel de significación de 0,05 fijado para el desarrollo de nuestro análisis.

Según los parámetros estipulados por la Organización Mundial de la Salud (OMS), en los individuos clasificados como hipertensos se detectó una actividad incrementada de esta enzima, lo que se encuentra en correspondencia con los resultados informados en la bibliografía consultada. La estimulación de la FLA2 y el consiguiente aumento de la concentración del ácido araquidónico estimula la actividad de la NADPH Oxidasa *in vivo* y con ello la producción del O_2^- . Por otra parte, la peroxidación lipídica no enzimática del ácido araquidónico por radicales libres da lugar a los isoprostanos, productos parecidos a las prostaglandinas, los cuales se consideran marcadores de estrés oxidativo y de peroxidación lipídica endógena. Entre las funciones de los isoprostanos, se encuentran las de ser potentes vasoconstrictores, estimular la mitogénesis en las células vasculares del músculo liso e inducir la liberación de endotelina en las células endoteliales, compuesto vasoconstrictor que promueve la agregación plaquetaria y la proliferación de células musculares lisas; contribuye, además, a originar alteraciones, como la disfunción endotelial y la HTA¹⁰⁻¹².

La FLA2 puede ser considerada como un agente prooxidante. Con su activación –mediada por factores específicos, como pueden ser hormonales o proteicos, o por factores inespecíficos, entre los que se encuentra el daño celular mediado por ERO– se propicia un estado en el cual se genera un desequilibrio en el estado oxidativo del organismo, lo que aumenta la producción de metabolitos reactivos.

Summary

Given the high reactivity level of the oxygen reactive species, they have the capacity to produce membrane lipid peroxidation. This factor is determinant for the mechanism of endothelial damage because it provokes the activation of the phospholipase A2 enzyme which is the key for exchanging the phospholipids membranes and in generating different bioactive substances among which we can find the arachidonic acid. According to recent research works, the pathogenesis of the high blood pressure caused by oxygen reactive species has been attributed to an endothelial malfunction originated, among other factors, by the generation of vasoconstrictive isoprostanes as consequence of arachidonic acid peroxidation. Due this, the principal aim we proposed to ourselves was to

compare the phospholipase A2 enzyme activity in healthy subjects and in patients who suffer from high blood pressure who belong to the health area of Santa Clara municipality. A colorimeter technique based on the catalytic action of this enzyme, which generate the medium acidification by liberating lysophospholipids and fatty acids was used. These changes in the medium pH originate changes on the absorbance of the substrate solution. According to the statistical analysis we made, significant differences were found in both study groups. The level increase of phospholipase A2 in patients who suffer from hypertension is the evidence that it can be considered a long term independent predictor for the coronary heart disease as well as for the cerebrovascular disease.

Referencias bibliográficas

1. Boilard E, Rovault M, Surrel F, Le Calvez, Bezzine S, Singer A, et al. Secreted phospholipase A2 inhibitors are also potent blockers of binding to the M-type receptor. *Biochemistry*. 2006;45:13203-18.
2. Murakami M, Kudo I, Inoue K. Secretory phospholipase A2. *J Lipid Med Cell Sig*. 1995;12:119.
3. White MC, Mc Howat J. The therapeutic potential of phospholipase A2 inhibitors in cardiovascular disease. *Cardiovas Hematol Agents Med Chem* 2007;5:91-5.
4. Yedgar S, Cohen Y, Shoseyov D. Control of phospholipase A2 activities for the treatment of inflammatory conditions. *Biochim Biophys Acta*. 2006; 761:1373-82.
5. Garza CA, Montori VM, Mc Connell JP. Association between lipoprotein-associated phospholipase A2 and cardiovascular disease a systematic review. *Mayo Clin Proc*. 2007;82:159-65.
6. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin M, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(1):44–84.
7. Rattan S "Theories of biological aging: genes, proteins, and free radicals". *Free Radic Res*. 2006;40(12):1230–8.
8. Levy R. The role of Cytosolic phospholipase A2-alfa in regulation of phagocytic fuctions. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1761:1323-34.
9. Sudhir K. Lipoprotein-associate phospholipase A2, vascular inflammation and cardiovascular risk prediction. *Vasc Health Risk Manaj*. 2006;2:153-6.
10. Teixeira CF, Landucci EC, Antunes E et al. Inflammatory effects of snake venom myotoxi phospholipase A2. *Toxicon*. 2003;42:947-62.
11. Ganafa A.A, Socci RR, Eatman D, Silvestrov N, Abukalaf IK, Bayort MA. "Effect of palm oil on oxidative stress-induced hypertension in Sprague-Dawley rats." *AJH*. 2002;15:725-31.
12. Benet Rodríguez M, Apollinaire Pinini JJ, Torres Ros J, Perza Pons S. Reactividad cardiovascular y factores de riesgos cardiovasculares en individuos normotensos menores de 40 años. *Rev Esp Salud Pública*. 2003;77:143-50.

Recibido: 1 de febrero de 2009

Aprobado: 5 de junio de 2009