

## Arilesterasa. Aspectos metodológicos y funcionales de una enzima clave en la enfermedad cardiovascular. Parte II

Recibido el 9 de julio de 2007

MERITXELL NUS<sup>1</sup>, FRANCISCO J. SÁNCHEZ-MUNIZ<sup>1</sup>,  
JOSÉ M. SÁNCHEZ-MONTERO<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Dpto. de Nutrición y Bromatología I (Nutrición); <sup>2</sup>Grupo de Biotransformaciones, Dpto. de Química Orgánica y Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid

### RESUMEN

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) suponen la primera causa de muerte en los países desarrollados y se ha estimado que en el año 2010 también liderarán las causas de muerte en los países en vías de desarrollo. Numerosos estudios epidemiológicos han confirmado la relación entre colesterolemia y ECV, postulándose que el descenso de los niveles séricos de colesterol produce una dismi-

\* Profesor Doctor J. M. Sánchez-Montero.

Grupo de Biotransformaciones. Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense.

Plaza de Ramón y Cajal, s/n. Ciudad Universitaria. 28040-Madrid.

e-mail: jsanchez@farm.ucm.es

**Abreviaturas:** **PON1:** paraoxonasa; **PDB:** protein data bank; **HPBP:** proteína que une grupos fosfato; **ECV:** enfermedad cardiovascular; **LDL:** lipoproteínas de baja densidad; **HDL:** lipoproteínas de alta densidad; **SBF:** Simulated Body Fluid (mimético de suero humano); **SBFb:** SBF modificado en bicarbonato; **SBFc:** SBF modificado en cloruro; **SBFp:** SBF igual que el plasma IC 95%; intervalo de confianza al 95%; **HEPES:** ácido 2-[4-(2-hidroxietil-1-piperazino)]propilsulfónico; **K<sub>m</sub>:** constante de Michaelis-Menten; **V<sub>max</sub>:** velocidad máxima; **IMC:** índice de masa corporal; **P:** percentil; **IC 95%:** intervalo de confianza al 95%; **MOPS:** ácido 3-(N-morfolino)-propilsulfónico; **TES:** ácido N-[tris-(hidroximetil)-metil]-2-aminoetilsulfónico; **BICINE:** N,N-bis(2-hidroxietil) glicina; **FL:** Fosfolípidos; **HDL:** lipoproteínas de alta densidad; **VLDL:** lipoproteínas de muy alta densidad; **AGS:** ácidos grasos saturados.

nución de la incidencia y la prevalencia de muerte por cardiopatía isquémica y ECV. Además se ha demostrado que la concentración elevada de lipoproteínas de baja densidad (LDL) es un factor de riesgo, mientras que la de lipoproteínas de alta densidad (HDL) es un factor protector frente a la ECV.

Muchos autores han sugerido que esta acción beneficiosa de las HDL se debe a que, unida a su molécula, existe una enzima denominada paraoxonasa (PON1). La PON1 es una enzima que presenta varias actividades *in vitro*: paraoxonasa, arilesterasa y lactonasa. Parece inhibir la oxidación tanto de las LDL como de las HDL y facilitar el transporte reverso del colesterol, disminuyendo así el riesgo de aterosclerosis.

Su mecanismo de acción, propiedades catalíticas y sustratos naturales aun se desconocen. Se han desarrollado algunos métodos espectrofotométricos y calorimétricos para determinar su actividad arilesterasa que aunque muy utilizados no son muy sensibles y los resultados obtenidos no son muy reproducibles. En este trabajo se revisan muchos aspectos centrales referentes a esta enzima: mecanismos de acción, regulación por diferentes sustratos y mecanismos genéticos y dieta. Además se presenta un método que, utilizando como tampón un mimético de suero, permite obtener resultados más fiables y reproducibles de actividad arilesterasa en humanos y ratones. Por otra parte, se detectan posibles efectos de los polimorfismos sobre los valores basales de actividad arilesterasa en individuos con riesgo cardiovascular incrementado.

**Palabras clave:** Arilesterasa.—Aterosclerosis.—LDL-oxidada.—Mimético de suero humano.—Polimorfismos.

## SUMMARY

### **Arylesterase. Methodological and Functional Aspects of a Key Enzyme in the Cardiovascular Disease. Part II**

Cardiovascular diseases (CVD) are the first cause of death in developed countries and it is estimated that by 2010 they will also be the leading cause of death in developing countries. Epidemiologic studies have demonstrated that reduction of total serum cholesterol decreases prevalence and death rates associated with ischemic cardiopathy and CVD. Furthermore, a high concentration of LDL is considered a risk factor, while high levels of HDL are thought to be a protective factor.

Many authors have suggested that HDL-bound PON1 enzyme may confer the protective effects to HDL. PON1 is an enzyme with several *in vitro* activities: paraoxonase, arylesterase, and lactonase. It has been reported that PON1 inhibits LDL and HDL peroxidation, as well as it facilitates the cholesterol reverse transport, helping to inhibit the developing of atherosclerosis.

Its native substrates, its *in vivo* mechanism of action and its molecular targets in the human body are still unknown. Nevertheless, calorimetric and spectrophotometric methods, very often employed but reaching to low very precise

and sensible results, to determine its arylesterase activity have been developed. In this paper several aspects of this enzyme such as the mechanism of action, the regulation by substrates, genes and diet, are reviewed. Moreover, we present a method that uses a serum mimetic buffer that permits to obtain more precise and repeatable results of the arylesterase activity in humans and mice. Furthermore the relationship between PON1 polymorphisms and arylesterase activity is also tested in subjects at increased CVD-risk.

**Keywords:** Arylesterase.—Atherosclerosis.—Oxidized-LDL.—Human serum mimetic.—Polymorphisms.

### **MÉTODOS PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD ARILESTERASA**

El proceso de purificación del enzima paraoxonasa (PON1) ha dado lugar a muchas controversias, ya que aunque en muchos estudios se asegura haber utilizado el enzima «purificado», resulta paradójico que no se hubieran incluido sus coordenadas en el Protein Data Bank (PDB) hasta el año 2004 (1-3). Parece obvio que tal purificación no debió ser completa, además estudios muy recientes han asegurado haber desarrollado un método fiable de purificación de PON1, porque según comentan, en los estudios anteriores junto con la PON1 siempre aparecía una proteína que une grupos fosfato (HPBP) (4).

Por otro lado, la purificación de un enzima suele ser un proceso bastante largo y complejo, por lo que en un laboratorio de rutina para realizar la determinación de la actividad arilesterasa es mejor hacerlo con un método que emplee directamente suero. Así pues, se han intentado desarrollar métodos rápidos de detección de la actividad arilesterasa a fin de asociar su actividad o su concentración con el riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular. La determinación de la actividad de la enzima PON1 tiene limitaciones ya que aun no se conocen los valores normales en suero debido a la variabilidad interindividual condicionada por polimorfismos de la enzima. Esto condiciona que su valor predictivo aun no esté totalmente definido.

El primer método propuesto para determinar la actividad arilesterasa, y el que ha sido utilizado en la mayoría de los estudios de intervención (5-11), es el método elaborado por Eckerson y col. (12),

que se considera el método de referencia. En este método se usa acetato de fenilo como sustrato, ya que es específico de esta esterasa. Las medidas se hacen espectrofotométricamente a una longitud de onda de 270 nm. El acetato de fenilo se disuelve hasta una concentración 1 mM en un tampón Tris/HCl 20 mM, con una concentración de  $\text{CaCl}_2$  0.9 mM y de un pH = 8 a 25° C. La actividad del enzima se calcula usando un coeficiente de extinción molar de  $1310 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Una unidad (U) de actividad arilesterasa se define como 1  $\mu\text{mol}$  de acetato de fenilo hidrolizado por minuto.

Sin embargo, el método de Eckerson y col. (12) da lugar a resultados de actividad arilesterasa poco reproducibles, además de muy bajo orden de actividad enzimática, por lo que numerosos autores han intentado modificarlo para aumentar la sensibilidad (Tabla 1).

TABLA 1. *Modificaciones realizadas al método de Eckerson y col. (12)*

<i>Estudio</i>	<i>Tampón</i>	<i>Concentración sustrato</i>	<i>pH</i>	<i>Temperatura</i>
Beltowsky y col. (13)	100 mM Tris/HCl 2 mM $\text{Ca Cl}_2$	2 mM	8	25 °C
Reiner y col. (14)	100 mM Tris/HCl	5 mM	7,4	37 °C
Liao y col. (15)	50 mM Tris/HCl 2 mM $\text{Ca Cl}_2$	40 mM	8	25 °C
Wallace y col. (16)	20 mM Tris/HCl 20 mM Tris/HCl	1 mM	7,4	25 °C
Azarsiz y col. (5)	0,9 mM $\text{Ca Cl}_2$ 1 M NaCl*	1 mM	8	25 °C

\* El NaCl se añade como potenciador de la actividad.

A pesar de todas estas modificaciones aún no se han obtenido resultados óptimos de actividad arilesterasa.

Otro método de determinación de la actividad arilesterasa más reciente es el propuesto por Lorentz y col. (17). Se trata de un ensayo automatizado basado en la medida de la disminución del hexacianohierro-III como consecuencia de la reacción acoplada de la hidrólisis del acetato del tiofenilo por acción de la arilesterasa (Figura 1).

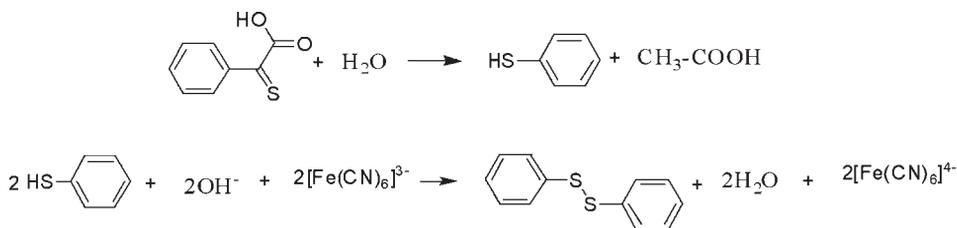


FIGURA 1. *Esquema del método propuesto por Lorentz y col. (13).*

Las medidas se llevan a cabo a 37° C y a un pH = 7,73 a una longitud de onda de 405 nm (a la que absorbe el hexacianohierro-III). En algunas de las muestras, cuando las velocidades iniciales eran muy pequeñas, se sustituyó el hexacianohierro-III por ácido 5-5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) haciéndose las medidas a 546 nm (17). Sin embargo este método resulta muy largo y tedioso para ser empleado como ensayo de rutina.

Otro método espectrofotométrico es el descrito por Butte y col. (18) usando como sustratos acetato y benzoato de p-nitrofenilo en un tampón fosfato 66 mM con 0,1% de Triton X-100 a pH = 7,5 y 37° C. El método se basa en el incremento de absorbancia a 321 nm, debido al aumento de concentración de  $\alpha$ -naftol (producto de la hidrólisis de la arilesterasa sobre los sustratos). El inconveniente de este método es que los ésteres del  $\alpha$ -naftol no son sustratos específicos de este enzima.

Los estudios llevados a cabo por Debord y col. (19-21) con muchos de los inhibidores de la actividad arilesterasa llevaron a la conclusión de que el método espectrofotométrico tenía muchas limitaciones por el efecto de los inhibidores de la actividad arilesterasa. Por ello pensaron que desarrollando un método microcalorimétrico evitarían estos problemas. Estos autores han puesto a punto un método calorimétrico usando acetato de fenilo como sustrato en un tampón Tris/HCl 9 mM con 1 mM CaCl<sub>2</sub> a pH = 8 y 37° C. Se mezcla la disolución de sustrato con el enzima purificado en un microcalorímetro y se mide la diferencia de entalpía hasta que se alcanza el estado estacionario (22). Los resultados obtenidos se ajustaron a una ecuación integrada de Michaelis-Menten no lineal y se ajustó por mínimos cuadrados (22). Observaron que se trata de una reacción ligeramente endotérmica ( $\Delta H = 8,2 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) (18). Sus resultados coinciden con los de Lorentz y col. (17). Sin embargo el manejo de la microcalorimetría

es muy complicado, por lo que tampoco parece una buena solución para sustituir al método de Eckerson y col. (12).

## NUEVO MÉTODO PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD ARILESTERASA

### A) Estudios en humanos

Nuestro equipo se planteó que todos estos inconvenientes podrían solucionarse empleando un medio que reprodujera la composición del medio interno en el que trabaja la arilesterasa. El Simulated Body Fluid (SBF), introducido por Kokubo y col. (23), es un líquido artificial que presenta la misma concentración iónica del suero y que ha sido utilizado con éxito en experimentos con biomateriales (24, 25). No obstante, hasta el momento nunca había sido utilizado para medir actividades enzimáticas. Como el SBF no tiene exactamente la misma composición electrolítica que el suero, ya que presenta 1,8 veces más cloruro y seis veces menos bicarbonato que el suero, se diseñaron tres tampones más (Tabla 2) (26):

- SBFc: modificado en cloruro y tamponado con ácido 2-[4-(2-hidroxietil-1-piperazino)]propilsulfónico (HEPES)/NaOH.
- SBFb: modificado en bicarbonato y tamponado con Tris/HCl.
- SBFp: con la misma composición que el plasma y tamponado con HEPES/NaOH.

TABLA 2. Composición iónica del suero, del SBF y de los SBF modificados

	<i>Suero</i>	<i>SBF</i>	<i>SBFc</i>	<i>SBFb</i>	<i>SBFp</i>
	mM	mM	mM	mM	mM
Na <sup>+</sup>	142	142	142	142	142
Ca <sup>2+</sup>	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Cl <sup>-</sup>	103	187	103	187	103
K <sup>+</sup>	5	4,6	4,6	4,6	5
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	27	4,6	4,6	27	27
Mg <sup>2+</sup>	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5

El diseño de la composición de los tampones se hizo mediante una hoja de cálculo Excel, modificando la concentración del ion que nos interesaba y manteniendo una fuerza iónica fija de 0,26 M.

Para compararlo con el método de Eckerson y col. (12) se diseñaron los siguientes experimentos:

## 1. Obtención de curvas patrón de actividad arilesterasa

Este ensayo se hace a concentración de sustrato fija (0,25 mM de acetato de fenilo) y distintos volúmenes de un *pool* de sueros humanos control. Las medidas en los cuatro SBF se llevaron a cabo a 37° C y pH = 7,34-7,4 (condiciones fisiológicas). Las medidas por el método de Eckerson y col. (12) según bibliografía ya descrita en el apartado anterior. Una unidad de actividad arilesterasa es igual a 1 mol de acetato de fenilo hidrolizado por L y por minuto.

Los resultados obtenidos se representan en la Figura 2. En la Tabla 3 se presentan los valores de las pendientes obtenidas. En ella

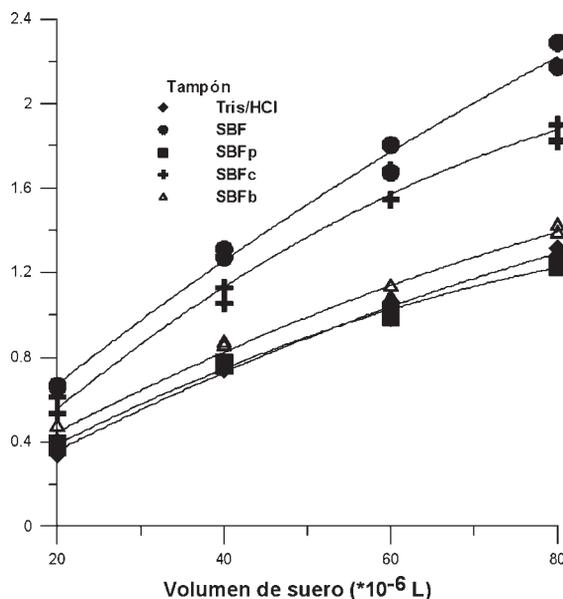


FIGURA 2. **Determinación de la actividad arilesterasa en humanos a concentración de enzima variable usando el método de Eckerson y col. (12), SBF, SBFc, SBFp y SBFb.**

se puede observar que el SBF da los mejores resultados, seguido del SBFc. Las actividades obtenidas con los otros tampones SBFb y SBFp fueron equivalentes a las observadas, empleando el método de Eckerson y col. (12).

TABLA 3. *Pendiente de la actividad arilesterasa en cinco tampones diferentes*

<i>Tampón</i>	<i>Pendiente</i>	<i>IC 95%</i>	<i>R<sup>2</sup></i>
	U/L	U/L	
Tris/HCl	15,53	13,8-17,3	0,987
SBF	25,84	22,8-28,8	0,989
SBFc	21,97	18,0-25,9	0,969
SBFb	15,73	13,6-17,8	0,983
SBFp	13,92	12,0-15,9	0,981

## 2. Obtención de los parámetros cinéticos de la actividad arilesterasa

Este ensayo se llevó a cabo a un volumen de enzima fijo (50  $\mu$ L de suero humano control) y variando la concentración de sustrato (0,10-0,50 mM de acetato de fenilo) en tampón SBF (con el que se habían obtenido los mejores resultados) (22) y con el método de Eckerson y col. (12).

Por ambos métodos el enzima mostró una cinética de Michaelis-Menten. Los valores de  $K_m$  y  $V_{max}$ : obtenidos con el método de Eckerson y col. (12) fueron los siguientes:  $V_{max} = 5,299 \cdot 10^{-5}$  U (IC 95% =  $4,18 \cdot 10^{-5} - 6,42 \cdot 10^{-5}$  U) and  $K_m = 2,765 \cdot 10^{-4}$  M (IC 95% =  $1,62 \cdot 10^{-4} - 3,91 \cdot 10^{-4}$  M) y por el nuevo método (26) usando SBF  $V_{max} = 6,305 \cdot 10^{-5}$  U (95% IC =  $4,62 \cdot 10^{-5} - 7,99 \cdot 10^{-5}$  U) y  $K_m = 2,643 \cdot 10^{-4}$  M (95% IC =  $1,13 \cdot 10^{-4} - 4,16 \cdot 10^{-4}$  M).

## 3. Validación del nuevo método en 23 pacientes con riesgo cardiovascular incrementado

Los criterios de inclusión eran: edad: hombres > 45 años; mujeres postmenopáusicas (> 50 años); Índice de masa corporal (IMC)

> 25 kg/m<sup>2</sup>. Además, una de las siguientes características debía ser presentada: colesterol total = 5,69 mmol/L, ser fumador (= 10 cigarrillos al día) y/o hipertensión (140-90 mm Hg de presión arterial sistólica/diastólica, respectivamente).

Se determinó su actividad arilesterasa por el método de Eckerson y col. (12) y por el nuevo método (26), obteniendo los resultados que aparecen en la Tabla 4. Los valores obtenidos, usando el método que utiliza SBF (26) fueron significativamente más bajos ( $p < 0,038$ ; + 26,4%) que usando el método de Eckerson y col. (12). El coeficiente de variación, usando el SBF como tampón, fue un 6% inferior que cuando empleamos el Tris/HCl. Por otro lado, la precisión del nuevo método (26) fue significativamente superior que usando el método de Eckerson y col. (12) ( $F = 4,627$ ;  $p = 0,038$ ). Teniendo en cuenta los percentiles de actividad arilesterasa de nuestra población obtenidos con el SBF: percentil (P)  $P_{25} = 30,6$  U/L;  $P_{50} = 37,5$  U/L;  $P_{75} = 50,7$  U/L, se observa que las muestras con actividad arilesterasa inferior a la del  $P_{75}$  estaban hiperestimadas ( $p = 0,038$ , + 53%) al utilizar el método de Eckerson y col. (12).

Por tanto, con todos estos resultados experimentales, se puede concluir que el nuevo método propuesto (26) da resultados menos erráticos y más reproducibles que el método de referencia (12). El rango de linealidad de la actividad arilesterasa fue muy superior usando el SBF, por lo que puede usarse para un mayor intervalo de concentración de arilesterasa (26). Esto implica que para una misma concentración de arilesterasa, al usar el método que emplea SBF (26) el enzima debe estar hiperactivada debido a que se encuentra en un medio iónico más favorable con lo que se obtiene un valor mayor de actividad arilesterasa. Por tanto debe concluirse que el nuevo método (26) puede sustituir al de Eckerson y col. (12) como método de referencia.

Por otro lado, el método de Eckerson y col. (12) sobreestima los valores de actividad en pacientes con muy baja actividad arilesterasa, aspecto de gran importancia ya que, como se ha comentado anteriormente, las personas con alto riesgo cardiovascular tienen disminuida la actividad de dicha enzima.

TABLA 4. Actividad pseudo-específica arilesterasa determinada por el método de Eckerson y col. (12) y por el nuevo método (26) en pacientes con riesgo cardiovascular incrementado

Tampón	n	Actividad arilesterasa U/L	Coficiente de variación %
SBF	23	38,6 ± 13,8	35
Tris/HCl	23	48,8 ± 20,3*	41
SBF (A)	6	19,2 ± 5,7	30
Tris/HCl (A)	6	46,3 ± 30,6	66
SBF (B)	17	31,2 ± 10,3	33
Tris/HCl (B)	17	47,8 ± 21,5*	45
SBF (C)	11	37,8 ± 4,4	12
Tris/HCl (C)	11	48,7 ± 16,5	34

(A) Pacientes con muy baja actividad arilesterasa [ $< 30,6$  U/L, Percentil (P)<sub>25</sub> con SBF].  
 (B) Pacientes con baja y con muy baja actividad arilesterasa [ $< 50,7$  U/L (P<sub>75</sub> con SBF)].  
 (C) Pacientes con actividad arilesterasa entre =  $30,6$  U/L y  $< 50,7$  o entre el P<sub>25</sub> y el P<sub>75</sub> con SBF). \*  $p < 0,05$ ; diferente significativamente vs. su respectivo valor usando el SBF (Student-t test pareado).

## B) Estudios en ratones

También nos propusimos poner a punto el método de determinación de la actividad arilesterasa en otros animales de experimentación y para ello se seleccionaron ratones balb-c, que es una estirpe muy resistente a desarrollar aterosclerosis (A. H. Terpstra, comunicación personal).

El diseño experimental para comparar el método de Eckerson y col. (12) y el método empleando SBF (26) en ratones fue el mismo que el comentado en el apartado anterior. Sin embargo, se alcanzaron resultados ligeramente diferentes (Figura 3).

El nuevo método (26) dio lugar a los mejores resultados en ratones al igual que en humanos, sin embargo este incremento de actividad fue más importante en ratones ya que se consiguió incrementar la actividad 180 veces respecto al método de Eckerson y col. (12). Resultados similares a los del SBF se obtuvieron al emplear el SBFc y el SBFp (Tabla 5) (27).

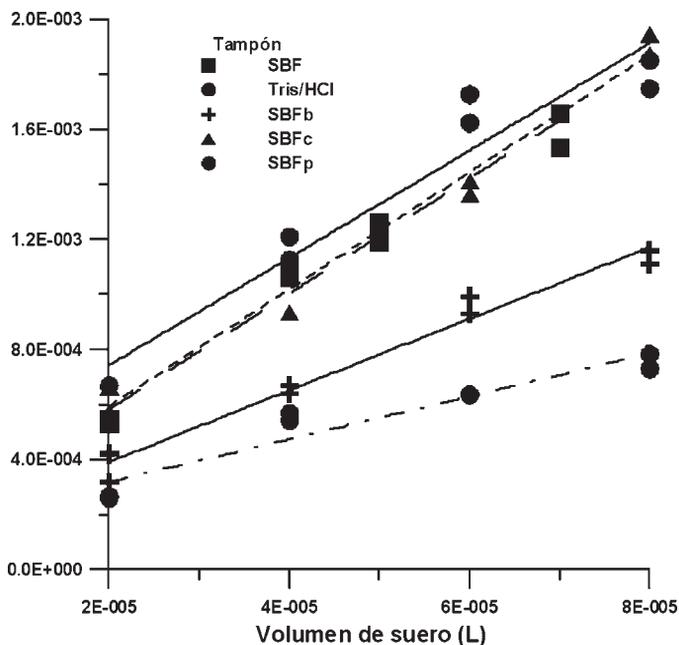


FIGURA 3. **Determinación de la actividad arilesterasa en ratones balb-c a concentración de enzima variable usando el método de Eckerson y col. (12), SBF, SBFc, SBFp y SBFb.**

TABLA 5. *Pendientes de la actividad arilesterasa en ratones usando cinco tampones diferentes*

Tampón	Pendiente	IC 95%	R <sup>2</sup>
	U/L	U/L	
Tris/HCl	0,13	0,096-0,167	0,917
SBF	21,03	17,9-24,2	0,988
SBFc	21,20	18,7-23,7	0,986
SBFb	13,22	11,1-14,4	0,974
SBFp	18,70	13,6-22,4	0,965

Los parámetros cinéticos obtenidos de la arilesterasa de ratones fueron por el método de Eckerson y col. (12):  $K_m = 2,008 \cdot 10^{-4}$  (IC 95% =  $9,52 \cdot 10^{-5} - 3,06 \cdot 10^{-4}$ ) y  $V_{max} = 3,236 \cdot 10^{-5}$  (IC 95% =  $2,54 \cdot 10^{-5} -$

$3,93 \cdot 10^{-5}$ ) y por el nuevo método (26)  $K_m = 1,442 \cdot 10^{-3}$  (IC 95% =  $5,01 \cdot 10^{-3} - 3,39 \cdot 10^{-3}$ ) y  $V_{max} = 1,854 \cdot 10^{-4}$  (IC 95% =  $1,54 \cdot 10^{-5} - 3,86 \cdot 10^{-4}$ ). Con el nuevo método (26) se obtuvieron una  $V_{max}$  y una  $K_m$  mucho más altas que con el método de Eckerson y col. (12) y además más elevadas que en humanos por ambos métodos, por lo que se puede concluir que la arilesterasa de ratones es más activa que la de humanos.

El estudio con los distintos tampones (SBF, SBFp, SBFc, SBFb) dio lugar a diferentes resultados sobre el efecto de los iones  $Cl^-$  y  $HCO_3^-$ , y de los agentes tamponantes Tris y HEPES que serán comentados en el siguiente apartado.

## CARACTERIZACIÓN Y REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD ARILESTERASA

### 1. Inhibidores de la actividad arilesterasa

#### 1.1. Metales de transición

En el año 1960, Erdos y col. (28) ya identificaron a los metales de transición como inhibidores de la arilesterasa, pero su mecanismo de inhibición no fue descrito hasta décadas más tarde (19, 29) (Tabla 6).

TABLA 6. *Mecanismo de inhibición de la actividad arilesterasa por metales de transición*

<i>Metales</i>	<i>Mecanismo de inhibición</i>
	Unión al -SH de la cys284 según (29)
$Cu^{2+}$ y $Hg^{2+}$	Unión al grupo carbonilo del sustrato inhibiendo su unión al Ca1 (19)
$Mn^{2+}$ , $Co^{2+}$ , $Ni^{2+}$ , $Zn^{2+}$ , $Cd^{2+}$	Unión a hys del sitio catalítico (19)
$La^{3+}$	Unión al sitio de unión del $Ca^{2+}$ (19)

### 1.2. *EDTA y citrato*

Son utilizados como anticoagulantes en el plasma e inhiben la actividad arilesterasa por ser quelantes de  $\text{Ca}^{2+}$ , por lo que se recomienda el uso de suero en lugar de plasma para medir la actividad arilesterasa (29, 30).

### 1.3. *Disolventes orgánicos*

Debord y col. (20) han encontrado una inhibición de la arilesterasa por unión de disolventes orgánicos al enzima a través de interacciones hidrofóbicas por la cadena alifática y de unión de transferencia de carga a través del grupo polar funcional. Así, cuanto mayor es el número de carbonos de la cadena, mayor es su potencial de inhibición. Es decir, el etanol inhibe al enzima más que el metanol. Además demostró que el monoetil éter del etilenglicol inhibía ligeramente al enzima, pero la acetona, el tetrahidrofurano y el dimetilsulfóxido la inhibían más potentemente.

### 1.4. *Surfactantes*

En ocasiones se han estudiado surfactantes para solubilizar sustratos diferentes al acetato de fenilo para determinar la actividad arilesterasa. En un estudio llevado a cabo por Lorentz y col. (17) observaron que la mayoría de los surfactantes (por ejemplo, Triton, Tween) inhibían la actividad arilesterasa.

### 1.5. *Agentes tamponadores*

En el mismo estudio de Lorentz y col. (17) probaron distintos tampones para determinar la actividad arilesterasa, concluyendo que MOPS (ácido 3-(N-morfolino)-propilsulfónico), HEPES, Tris y trietilamina actúan como inhibidores, mientras que TES (ácido N-[tris(hidroximetil)-metil]-2-aminoetilsulfónico), BICINE (N,N-bis(2-hidroxiethyl)glicina) y borato no.

Sin embargo, en base a nuestros resultados en humanos y ratones (26, 27), el HEPES no parece demostrar un efecto tan inhibitorio,

ya que cuando usamos el tampón SBFc (tamponado con HEPES) obtenemos una pendiente muy superior a la obtenida al usar el tampón Tris/HCl. Además el Tris en ratones parece ejercer un papel activador.

### 1.6. *Alcoholes alifáticos*

Según Debord y col. (21), la inhibición de los alcoholes alifáticos es más potente cuanto mayor es el número de carbonos de la cadena alifática y a igualdad de carbonos cuanto menos polar sea la molécula. Concluyen, por tanto, que en esta inhibición deben intervenir aminoácidos poco polares de la arilesterasa y que se localizan en la zona central del enzima.

### 1.7. *Bicarbonato*

Nunca se había estudiado previamente el efecto del bicarbonato sobre la actividad arilesterasa. La concentración de ion bicarbonato se encuentra incrementada en los tampones SBFb y SBFp respecto de los demás tampones, con lo que parece actuar como un inhibidor tanto en humanos como en ratones. La razón de este efecto inhibitorio puede ser debido a la alta concentración de bicarbonato (27 mM) en contraste a la baja concentración de ión  $\text{Ca}^{2+}$  (2,5 mM) en los tampones SBFp y SBFb se favorece la formación del bicarbonato de calcio disminuyendo la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el medio que recordemos es un ión limitante para que la arilesterasa actúe (31).

### 1.8. *Albúmina*

Todos los ensayos que hemos realizado incorporando diferentes concentraciones de albúmina nos inhibieron de tal forma la arilesterasa que no obtuvimos actividad. Por tanto, podemos concluir que la albúmina es un potente inhibidor de la actividad arilesterasa.

Para explicar este efecto proponemos dos posibles hipótesis:

1. Que esta inhibición se deba a que el sustrato de la arilesterasa, el acetato de fenilo, se une a la albúmina, por lo que el enzima ya no podrá hidrolizarlo. Esta conclusión se ve reforzada por un estudio previo en el que se demostró que el acetato de fenilo en un tampón de pH = 7,6 y de fuerza iónica = 0,2 M se une a la albúmina (32). Sin embargo, la fuerza de unión no resultó ser demasiado alta, y desconocemos si sería suficientemente alta para competir con la PON1.
2. Que la inhibición se deba a la unión de la PON1 a la albúmina inhibiéndose la actividad arilesterasa. Para alcanzar esta hipótesis nos basamos en un estudio llevado a cabo por Ortigoza-Ferando y col. (33), en el que encontró dos bandas por electroforesis al purificar la PON1. Una banda que supuso era PON1 aislada que presentaba actividad arilesterasa, y otra banda en la que aparecía la PON1 unida a albúmina y no demostraba actividad arilesterasa. Por tanto, nosotros podemos asumir que puesto que actualmente se ha demostrado que existe una única PON1, las dos bandas encontradas se trataban del mismo enzima pero cuando se encuentra unido a la albúmina se inhibe su actividad arilesterasa, por interacciones albúmina-PON1.

## 2. Potenciadores de la actividad arilesterasa

### 2.1. Calcio

La PON1 es un enzima dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ . Se ha aceptado en el método de Eckerson y col. (12) que la concentración óptima es de 0,9 mM. En el estudio de Lorentz y col. (17) se llegó a la errónea conclusión de que el  $\text{Ca}^{2+}$  era potenciador de la arilesterasa hasta una concentración de 0,4 mM. Sin embargo, Nus y col., usando el SBF, concluyeron que con una concentración fisiológica de  $\text{Ca}^{2+} = 2,5$  mM se obtienen mejores resultados (26, 27).

## 2.2. *Cloruro*

En muchos de los estudios se ha utilizado NaCl para estimular la actividad arilesterasa (5, 34), seguramente por aumentar la fuerza iónica del medio. Sólo existe un estudio (13) en el que se asegura que la adición de NaCl al medio inhibe la actividad arilesterasa. Nosotros hemos concluido que el ion Cl, más que la sal NaCl actúa como un potenciador en la actividad arilesterasa, ya que se obtienen mejores resultados al emplear SBF y SBFc (26, 27). Además este efecto potenciador es aún más potente en ratones, ya que incluso llega a revertir el efecto inhibitorio del bicarbonato en el SBFb.

## 2.3. *pH*

Se ha sugerido que el mejor pH al que trabaja la arilesterasa y en general todas las esterasas, es entre 7,5 y 8 (17); sin embargo, en nuestro estudio (26, 27) se obtuvieron valores más altos de actividad a un pH fisiológico (7,34-7,4).

## 2.4. *Fosfolípidos (FL)*

Para conocer el efecto de los FL sobre la actividad arilesterasa se han realizado estudios con el enzima purificada, unida a las lipoproteínas de alta densidad (HDL) y unida a las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). Se han ensayado distintos FL (35):

2.4.1. Fosfatidilcolinas: dependiendo del ácido graso que incorporan en la posición sn-2 tienen distintos efectos:

2.4.1.1. Si llevan ácidos grasos saturados (AGS), estimulan la actividad arilesterasa proporcionalmente a la longitud de cadena del ácido graso desde (C10-C16). A partir de AGS de cadena mayor de C16 se inhibe la actividad.

2.4.1.2. Si llevan AGP. Estimulan la actividad arilesterasa de forma más potente que cuando está unida a AGS.

- 2.4.1.3. Si llevan AGS de cadena corta (es decir, restos de AGS que han sido cortados), la estimulación de la actividad arilesterasa es más potente que en los otros dos casos.
- 2.4.2. Esfingomiolina. Estimula la actividad arilesterasa pero no la paraoxonasa.
- 2.4.3. Dimiristoilfosfatidilglicerol. Es un fosfolípido con carga negativa que parece estimular sólo la arilesterasa de forma dosis-dependiente e inhibir la paraoxonasa.
- 2.4.4. Fosfatidilinositol de la soja. También es un fosfolípido de carga negativa que estimula la arilesterasa e inhibe la paraoxonasa.

### **3. Sustratos de la actividad arilesterasa**

#### *3.1. Acetato de fenilo*

Su producto es el fenol que absorbe a 270 nm. Es un sustrato artificial específico de este enzima que fue propuesto por Eckerson y col. (12). Hasta el momento es el que ha producido los mejores resultados.

#### *3.2. Acetato de p-nitrofenilo*

Su producto es el p-nitrofenol que absorbe a 410 nm. No es un sustrato muy específico, por lo que hay que añadir en el medio inhibidores de la acetilcolinesterasa que también hidrolizan este sustrato (36). Además la velocidad de hidrólisis es la mitad que cuando se utiliza el acetato de fenilo (37). Es más, la introducción de cualquier sustituyente en la posición produce una disminución muy importante de la actividad arilesterasa, ya que según parece es más importante para estabilizar el estado de transición del enzima la basicidad de Lewis del oxígeno del grupo carbonilo que el pKa (37).

### 3.3. *Acetato de tiofenilo*

Es el sustrato empleado en el estudio de Lorentz y col. (17), el cual presenta el problema de que da un producto no cromógeno, por lo que debe, posteriormente, acoplarse a una reacción con un complejo de hierro.

### 3.4. *Ésteres del $\alpha$ -naftol*

Su producto es el  $\alpha$ -naftol que absorbe a 321 nm (18). El problema de este sustrato es que no es soluble en disoluciones acuosas, por lo que para hacer ensayos debe adicionarse un disolvente orgánico o un surfactante al medio que inhibe la actividad arilesterasa.

### 3.5. *Fosfatidilcolinas con estructura de isoprostano como el 1-palmitoil-2-linoleil-sn-glicero-3-fosfocolina y el 1-palmitoil-2-araquidonoil-sn-glicero-3-fosfocolina*

Son hidrolizados a lisofosfatidilcolina (35).

### 3.6. *Fosfatidilcolinas con grupos aldehído como 1-palmitoil-2-(9-oxo)nonanoil-sn-glicero-3-fosfocolina y la 1-palmitoil-2-(5-oxo)valeroil-sn-glicero-3-fosfocolina*

También son hidrolizados a lisofosfatidilcolina pero no rompe la unión de los ácidos grasos como haría una esterasa de serina (35).

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar queremos agradecer a la Real Academia Nacional de Farmacia y a los Laboratorios Cinfa, la Concesión del Premio de Investigación 2007, que ha sabido valorar nuestro esfuerzo y nos ha permitido publicar en esta revista.

También queremos agradecer al Ministerio de Educación y Ciencia la concesión de dos Proyectos de Investigación de referen-

cias AGL2001-2398-C03-03 y AGL2005-07204-C02-01/ALI que han financiado toda la investigación. Así como a la Universidad Complutense de Madrid la concesión de la Beca Predoctoral a Meritxell Nus Chimeno.

## BIBLIOGRAFÍA

- (1) HAREL, M.; AHARONI, A.; GAIDUKOV, L.; BRUMSHTEIN, B.; KHERSONSKY, O.; MEGED, R.; DVIR, H.; RAVELLI, R. B. G.; MCCARTHY, A.; TOKER, L. *et al.* (2004): Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11: 412-419.
- (2) HAREL, M.; AHARONI, A.; GAIDUKOV, L.; BRUMSHTEIN, B.; KHERSONSKY, O.; MEGED, R.; DVIR, H.; RAVELLI, R. B. G.; MCCARTHY, A.; TOKER, L. *et al.* (2004): Corrigendum. Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11: 1253.
- (3) PROTEIN DATA BANK. <http://www.rcsb.org/pdb/navbarsearch.do?newSearch=yes&isAuthorSearch=no&radioset=All&inputQuickSearch=1v04>
- (4) RENAULT, F.; CHABRIERE, E.; ANDRIEU, J. P.; DUBLET, B.; MASSON, P. and ROCHU, D. (2006): Tandem purification of two HDL-associated partner proteins in human plasma, paraoxonase (PON1) and phosphate binding protein (HPBP) using hydroxyapatite chromatography. *J. Chromatog. B.* 836: 15-21.
- (5) AZARSIZ, E.; KAYIKCIOGLU, M.; PAYZIN, S. and YILDIRIM SOZMEN, E. (2003): PON1 Activities and oxidative markers of LDL in patients with angiographically proven coronary artery disease. *Int. J. Cardiol.* 91: 43-51.
- (6) WHEELER, J. G.; KEAVNEY, B. D.; WATKINS, H.; COLLINS, R. and DANESH, J. (2004): Four paraoxonase gene polymorphisms in 11212 cases of coronary heart disease and 12786 controls: meta-analysis of 43. *Lancet.* 363: 689.
- (7) MACKNESS, B.; DURRINGTON, P. N.; McELDUFF, P. *et al.* (2003): Low paraoxonase activity predicts coronary events in the Caerphilly prospective. *Circulation.* 107: 2775-2779.
- (8) TOMÁS, M.; SENTÍ, M.; GARCÍA-FARIA, F.; VILA, J.; TORRENTS, A.; COVAS, M. and MARRUGAT, J. (2000): Effect of simvastatin therapy on paraoxonase activity and related lipoproteins in familial hypercholesterolemic patients. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20: 2113-2119.
- (9) INOUE, M.; SUEHIRO, T.; NAKAMURA, T.; IKEDA, Y.; KUMON, Y. and HASHIMOTO, K. (2000): Serum arylesterase/diazoxonase activity and genetic polymorphisms in patients with type 2 diabetes. *Metabolism.* 49: 1400-1405.
- (10) ABBOTT, C. A.; MACKNESS, M. I.; KUMAR, S. *et al.* (1995): Serum paraoxonase activity, concentration, and phenotype distribution in diabetes mellitus and its relationship to serum lipids and lipoproteins. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 15: 1812-1818.
- (11) SUTHERLAND, W. H. F.; MANNING, P. J.; DE JONG, S. A.; ALLUM, A. R.; JONES, S. D. and WILLIAMS, S. M. (2001): Hormone-replacement therapy increases serum

- paraoxonase/arylesterase activity in diabetic postmenopausal women. *Metabolism*. 50: 319-324.
- (12) ECKERSON, H. W.; ROMSON, J.; WYTE, C. and LA DU, B. N. (1983): The human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism. *Am. J. Human Genet.* 35: 214-227.
  - (13) BELTOWSKY, J.; GRAZYNA, W. and MARCINIAK, A. (2002): Species and substrate-specific stimulation of human plasma paraoxonase 1 (PON1) activity by high chloride concentration. *Acta Biochim. Pol.* 49: 927-936.
  - (14) REINER, E.; SVEDRUZIC, D.; SIMEON-RUDOLF, V.; LIPOVAC, V.; GAVELLA, M. and MRZLJAK, V. (1999): Paraoxonase end arylesterase activities in the serum of two hyperlipoproteinaemic patients alter repeated extracorporeal lipid precipitation. *Chem-Biol. Interac.* 120: 405-411.
  - (15) LIAO, F.; LIU, W. L.; ZHOU, Q. X.; ZENG, Z. C. and ZUO, Y. P. (2001): Assay of serum arylesterase activity by fitting to the reaction curve with an integrated rate equation. *Clin. Chim. Acta.* 314: 67-76.
  - (16) BUTTE, W. and KEMPER, K. (1999): A spectrophotometric assay for pyrethroid-cleaving enzymes in human serum. *Toxicol. Lett.* 107: 49-53.
  - (17) LORENTZ, K.; WIRTZ, W. and WEIß, T. (2001): Continuous monitoring arylesterase in human serum. *Clin. Chim. Acta.* 308: 69-78.
  - (18) BUTTE, W. and KEMPER, K. (1999): A spectrophotometric assay for pyrethroid-cleaving enzymes in human serum. *Toxicol. Lett.* 107: 49-53.
  - (19) DEBORD, J.; BOLLINGER, J. C.; MERLE, L. and DANTOINE, T. (2003): Inhibition of human serum arylesterase by metal chlorides. *J. Inorg. Chem.* 94: 1-4.
  - (20) DEBORD, J.; BOLLINGER, J. C.; ABRAHAM, M. H.; MERLE, L. and DANTOINE, T. (2002): Inhibition of arylesterase by organic solvents: Structure-activity relationships. *Internet J. Chem.* 5: 4.
  - (21) DEBORD, J.; DANTOINE, T.; BOLLINGER, J. C.; ABRAHAM, M. H.; VERNEUIL, B. and MERLE, L. (1998): Inhibition of arylesterase by aliphatic alcohols. *Chem-Biol. Interact.* 113: 105-115.
  - (22) DEBORD, J.; HAREL, M.; BOLLINGER, J. C.; VERNEUIL, B.; MERLE, L. and DANTOINE, T. (2005): Flow microcalorimetric study of enzyme reactions. Application to arylesterase from human serum. *Thermochimica Acta.* 427: 85-91.
  - (23) KOKUBO, T.; KUSHITANI, H. and SAKKA, S. (1990): Solutions able to reproduce in vivosurface structure changes in bioactive glass-ceramic A-W. *J. Biomed. Mat. Res.* 24: 721-734.
  - (24) TAKADAMA, A.; HASHIMOTO, H.; MIZUNO, M.; ISHIKAWA, K. and KOKUBO, T. (2004): Newly improved simulated body fluid. *Key Engin. Mat.* 255: 115-118.
  - (25) OYANE, A.; ONUMA, K.; ITO, A.; KIM, H. M.; KOKUBO, T. and NAKAMURA, T. (2003): Formation and growth of clusters in conventional and new kinds of simulated body fluids. *J. Biomed. Mat. Res.* 64: 339-348.
  - (26) NUS, M.; SÁNCHEZ-MUNIZ, F. J. and SÁNCHEZ-MONTERO, J. M. (2006): A new method for the determination of arylesterase activity in human serum using Simulated Body Fluid. *Atherosclerosis*. 188: 155-159.
  - (27) NUS, M.; SÁNCHEZ-MUNIZ, F. J. and SÁNCHEZ-MONTERO, J. M. (2006): Determinación de la actividad arylesterasa en ratones utilizando un mimético de suero. *BioSpain, BIOTEC 2006*. Madrid (Comunicación oral).

- (28) ERDOS, E. G.; DEBAY, C. R. and WESTERMAN, M. P. (1960): Arylesterase in blood: effect of calcium and inhibitors. *Biochem. Pharmacol.* 5: 173-186.
- (29) AVIRAM, M.; ROSENBLAT, M.; BILLECKE, S.; EROGUL, J.; SORENSON, R.; BISGAIER, C. L.; NEWTON, R. S. and LA DU, B. (1999): Human serum paraoxonase (PON1) is inactivated by oxidized low density lipoprotein and preserved by antioxidants. *Free Rad. Biol. Med.* 26: 892-904.
- (30) MACKNESS, M. I. (1998): Why plasma should not be used to study paraoxonase. *Atherosclerosis.* 136: 195-196.
- (31) MACKNESS, B.; HINE, D.; LIU, Y.; MASTORIKOU, M. and MACKNESS, M. (2004): Paraoxonase-1 inhibits oxidised LDL-induced MCP-1 production by endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 318: 680-683.
- (32) TERESI, J. D. and LUCK, J. M. (1948): The combination of organic anions with serum albumin. *J. Biol. Chem.* 6: 653-661.
- (33) ORTIGOZA-FERADO, J.; RICHTER, R. J.; HORNUNG, S. K.; MOTULSKY, A. G. and FURLONG, C. E. (1984): Paraoxon hydrolysis in human serum mediated by a genetically variable arylesterase and albumin. *Am. J. Hum. Genet.* 36: 295-305.
- (34) FERRÉ, N.; CAMPS, J.; PRATS, E.; VILELLA, E.; PAUL, A.; FIGUERA, L. and JOVEN, J. (2002): Serum paraoxonase activity: a neww additional test for the improved evaluation of chronic liver damage. *Clin. Chem.* 48: 261-268.
- (35) NGUYEN, S. D. and SOK, D. E. (2006): Preferable stimulation of PON1 arylesterase activity by phosphatidylcholines with unsaturated acyl chains or oxidized acyl chains at sn-2 position. *Biochim. Biophys. Acta.* 1758: 499-508.
- (36) GAN, K. N.; ECKERSON, H. W. and LA DU, B. N. (1991): *Drug Metab. Dispos.* 19: 100.
- (37) BARGOTA, R. S.; AKHTAR, M.; BIGGADIKE, K.; GANI, D. and ALLEMANN, R. K. (2003): Structure-Activity relationship on human serum paraoxonase (PON 1) using substrate analogues and inhibitors. *Bioinorg. Med. Chem. Lett.* 13: 1623-1626.
- (38) AVIRAM, M.; ROSENBLAT, M.; BILLECKE, S.; EROGUL, J.; SORENSON, R.; BISGAIER, C. L.; NEWTON, R. S. and LA DU, B. (1999): Human serum paraoxonase (PON1) is inactivated by oxidized low density lipoprotein and preserved by antioxidants. *Free Rad. Biol. Med.* 26: 892-904.