

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

Recibido el 9 de julio de 2007

MERITXELL NUS¹, FRANCISCO J. SÁNCHEZ-MUNIZ¹,
JOSÉ M. SÁNCHEZ-MONTERO^{2*}

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

* Prof. Dr. 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: **ECV:** enfermedad cardiovascular; **LDL:** lipoproteínas de baja densidad; **HDL:** lipoproteínas de alta densidad; **PON1:** paraoxonasa; **PDB:** protein data bank; **Apo:** apolipoproteína; **PDGF:** factor de crecimiento derivado de plaquetas; **FGF:** factor de crecimiento de fibroblastos; **TNF- α :** factor de necrosis tumoral α ; **IL-1:** interleukina-1; **LDL-ox:** lipoproteínas de baja densidad oxidadas; **AGPI:** ácidos grasos poliinsaturados; **AGMI:** ácidos grasos monoinsaturados; **PL-A₂:** fosfolipasa A₂; **VLDL:** lipoproteínas de muy baja densidad; **IDL:** lipoproteína de densidad intermedia; **Lp (a):** lipoproteína (a); **LT:** leucotrienos; **VCAM-1:** moléculas de adhesión vascular; **ICAM-1:** molécula de adhesión intracelular; **MCP-1:** proteína quimioatrayente de macrófagos; **MCSF:** factor estimulante de colonias de macrófagos; **TGF- β :** factor de crecimiento transformador; **QM:** quilomicrones; **HB-EGF:** factor de crecimiento epidérmico unido a heparina; **LPL:** lipoproteína lipasa; **LCAT:** Lecitín-colesterol-acil-transferasa; **CETP:** proteína transferidora de ésteres de colesterol; **PAF-AH:** factor activador de plaquetas acetil-hidrolasa; **VHDL:** lipoproteínas de muy alta densidad; **ABCA-1:** transportador ATP-binding cassette; **AAPH:** hidrocloreuro de azo-bisamidinopropano; **PAPC:** palmitoil araquidonil fosfatidilcolina; **LPC:** lisofosfatidilcolina; **CA-ox:** araquidonato de colesterilo oxidado; **PHMB:** benzoato de p-hidroximetilmercurio; **PON1-Q192R:** polimorfismo de la PON1 en posición 192; **PON1-L55M:** polimorfismo de la PON1 en posición 55.

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 disminución 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 un 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 aún 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 I

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 development 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 reproducible 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.

Las enfermedades del corazón y del sistema circulatorio ocasionan 1,9 millones de muertes al año en la Unión Europea (1). Este dato representa aproximadamente la mitad de todas las defunciones que se producen en los países europeos; de este grupo de enfermedades, la cardiopatía isquémica es una causa fundamental de defunción. La cardiopatía isquémica conduce a muchas muertes prematuras y, dado que la asistencia sanitaria de las ECV es cara y prolongada, constituye también una gran carga económica en Europa. En España el coste debido al tratamiento de las ECV supone casi unos 7.000 millones de euros al año (1).

En España, las enfermedades cardiovasculares se mantuvieron como primera causa de muerte, representando el 33,3% del total de defunciones (una de cada tres) (2). Dentro de este grupo, la cardiopatía isquémica fue la primera causa de muerte entre los hombres (con 21.898 defunciones), mientras que las enfermedades cerebrovasculares fueron la principal causa entre las mujeres (20.049 defunciones) (2).

ATEROSCLEROSIS

Se considera que la aterosclerosis es un tipo de arteriosclerosis. El término arteriosclerosis describe el engrosamiento y rigidez de las arterias. Existe una arteriosclerosis fisiológica que obedece a cambios constitucionales debidos fundamentalmente al envejecimiento arterial, entre los que destacan el entrecruzamiento de las fibras de colágeno y la disminución de la elastina en la pared arterial.

Sin embargo, el término aterosclerosis se aplica a diversos tipos de procesos que producen una lesión proliferativa de las capas íntima y media arterial tras la formación de acúmulos fibroadiposos, que terminan por invadir la luz de las arterias y junto con procesos trombóticos, comprometen la funcionalidad circulatoria de los vasos originando un proceso de índole isquémica. La aterosclerosis es una enfermedad multifactorial que comienza a desarrollarse en la infancia y tarda muchos años en manifestarse.

La pared de los vasos consta de tres capas que desde su luz al exterior son: la íntima, compuesta de células endoteliales, la media, formada por células de músculo liso, y la adventicia por tejido conjuntivo. La etiología de la aterosclerosis no está aun bien definida, aunque existen varias hipótesis que explican su inicio. Goldstein y col. (3) desarrollaron la teoría lipídica de la aterosclerosis, según la cual, la presencia de niveles elevados de lipoproteínas de baja densidad (LDL), quilomicrones (QM) y lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) incrementan la captación de las células endoteliales, células del músculo liso y macrófagos por un incremento en la expresión de los receptores específicos de dichas lipoproteínas. Particularmente, los niveles de LDL regulan la expresión de los receptores que hacen que las LDL se introduzcan en las células y liberen su colesterol acumulándose en el interior de las células. El acúmulo de colesterol en las células produce, por algún mecanismo no bien conocido, el desarrollo de la aterosclerosis. Posteriormente Ross (4) desarrolla la teoría del daño tisular, en la que propone que son los cambios que tienen lugar en el endotelio vascular los que inician el desarrollo de la aterosclerosis. Este daño en el endotelio vascular produce una disfunción endotelial que se traduce en un incremento de la permeabilidad a las lipoproteínas y otros constituyentes del plasma, en la activación de la adhesión molecular de los leucocitos

y de la migración de los mismos a través del endotelio vascular. En 1989 se desarrolla la hipótesis unificadora de la teoría lipídica de la aterosclerosis y la respuesta al daño endotelial con los conocimientos sobre el papel de las LDL oxidadas tanto en el inicio como en la progresión del proceso aterosclerótico (comprobado en numerosos estudios *in vitro* así como en experimentación con animales) (5).

Las LDL se sintetizan en el hígado y transportan en el hombre más de dos tercios del colesterol hacia los tejidos periféricos. Se acepta universalmente que altos niveles de LDL en plasma constituyen un factor importante de riesgo de ECV (6). Sin embargo, el mecanismo por el que las LDL penetran en la pared arterial no se conoce todavía; si bien es cierto que hay algunos factores que inducen la entrada de las LDL en la capa íntima, tales como la predisposición genética, el aumento de su concentración plasmática, su menor tamaño, el aumento de la permeabilidad en los lugares susceptibles a la formación de la placa de ateroma, la presión arterial, la disminución del flujo sanguíneo en las zonas dañadas y el daño mecánico o inmunológico. Además también se han relacionado altos niveles plasmáticos de TG (TG) con el riesgo de desarrollar ECV y aterosclerosis. Así se cree que las lipoproteínas ricas en TG (TRL) participan en el desarrollo de la placa de ateroma (7).

Como posible mecanismo de entrada de estas lipoproteínas en los monocitos y en las células musculares lisas, se ha propuesto la fagocitosis a través de varios receptores como el receptor de LDL y el receptor de VLDL. Aunque aún no se conoce con claridad, se cree que en el reconocimiento de las LDL está implicada la apolipoproteína (Apo) B100 que se unirá al receptor de LDL cuya expresión está regulada por la concentración del colesterol libre en la célula. A su vez, esta unión es promovida por mediadores inflamatorios (citoquinas y factores de crecimiento) como: factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de necrosis tumoral α (TNF- α) e interleukina-1 (Il-1) que estimulan la transcripción de los receptores de LDL en la superficie celular (7).

Dentro de la capa íntima, las LDL sufren modificaciones tanto en la fracción proteica, la ApoB se fragmenta en péptidos más pequeños susceptibles de reaccionar con moléculas oxidadas (7) como en la fracción lipídica, produciéndose la peroxidación lipídica que las convierte

en LDL-oxidadas (LDL-ox) (8). Dicho proceso de oxidación de las LDL sigue un mecanismo caótico y autopropagativo (8) en el que se forman LDL-ox y LDL-ox mínimamente oxidadas (mmLDL-ox).

Además de producirse una acumulación de LDL, también se encuentran en la subíntima lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lipoproteínas de densidad intermedia (IDL), QM y lipoproteína (a) [Lp (a)] que parecen favorecer la llegada y adhesión de los monocitos a las células endoteliales, que constituye el siguiente paso del proceso aterosclerótico y contribuirá a la formación de la estría grasa (7). Sin embargo, son necesarios más estudios para determinar el papel de todas estas lipoproteínas en la formación de la placa de ateroma.

Las LDL-ox son reconocidas por los receptores scavenger promoviendo la adhesión de monocitos y neutrófilos a la pared endotelial a través de moléculas derivadas de los lípidos como son los leucotrienos (LT) y la P-selectina (7), y la formación de las células espumosas que constituyen la estría grasa. En los estadios iniciales de la aterosclerosis aparecen altos niveles de moléculas de adhesión vascular (VCAM-1) e intracelular (ICAM-1), proteína quimiotáctica de macrófagos (MCP-1) y el factor estimulante de colonias de macrófagos (MCSF) (6).

El siguiente paso como consecuencia de la migración y división de células musculares lisas y la formación de fibras de elastina y colágeno es la formación de la capa fibrosa (7). En esta fase disminuye el grosor de la capa media y se aumenta el tamaño y la inestabilidad de la lesión endotelial. Esta etapa está regulada por factores de crecimiento y quimiotácticos liberados por monocitos, células musculares lisas, células espumosas y células endoteliales, como son: PDGF, TNF- α , Il-6, Il-1 β , factor de crecimiento transformador (TGF- β) y el factor de crecimiento epidérmico unido a heparina (HB-EGF) (7). Las LDL-ox favorecen la migración de las células musculares a la íntima y el depósito de sustancias insolubles en el interior de la placa, colágeno y fibroblastos. Este proceso debería ser inhibido por las metaloproteinasas (MMP) que tienen un efecto proteolítico de la placa, sin embargo son inhibidas por las LDL-ox (7).

En las lesiones ateromatosas avanzadas se observa una gran fragilidad arterial que suele producir la ruptura de la placa, hemorra-

gias internas y trombosis (6). Se ha postulado que la calcificación de las placas de aterosclerosis puede deberse a la diferenciación de los fibroblastos en osteoblastos (7).

Por último, se produce una necrosis tisular como consecuencia de la apoptosis de los macrófagos, los fibroblastos y las células endoteliales por acción de los productos oxidados derivados del colesterol (7). Por lo tanto, esta etapa necrótica se basa en la apoptosis celular que favorece la calcificación de la placa.

HDL Y ATEROSCLEROSIS

Numerosos estudios epidemiológicos han demostrado la relación inversa entre concentración de HDL y riesgo cardiovascular (9). También se ha señalado que las HDL tienen actividad antioxidante y son capaces de inhibir la peroxidación lipídica de las LDL (9).

Las HDL son las lipoproteínas más pequeñas (diámetro = 7, 4-12 nm) y más densas ($1,063 < d < 1,21$ g/mL). No obstante, se trata de una familia muy heterogénea de lipoproteínas, habiéndose definido varias subpoblaciones de diferente composición lipídica y proteica, y por tanto, con densidad, tamaño y carga distintas (10). Estas diferencias estructurales condicionan, a su vez, que cada subpoblación de HDL tenga funciones fisiológicas diferentes.

Se sintetizan en el hígado y en el intestino (10). Su Apo principal es la Apo-AI, aunque las de origen hepático también suelen llevar ApoA-II, Apo-C y Apo-E. Las HDL nacientes son pobres en lípidos, de estructura discoidal constituidas por una bicapa fosfolipídica rodeada de Apo A1. Por captación de colesterol y fosfolípidos de las VLDL y los quilomicrones (QM) por acción de la lipoproteína lipasa (LPL), y esterificación del colesterol por acción de la lecitín colesterol acil transferasa (LCAT) se convierten en esféricas (10). Se han descrito dos subpoblaciones de HDL esféricas diferentes:

- HDL₃: ricas en ésteres de colesterol por acción de la proteína transferidora de ésteres de colesterol (CETP).
- HDL₂: ricas en fosfolípidos, triglicéridos y ésteres de colesterol.

El metabolismo y formación de las HDL se esquematiza en la Figura 1.

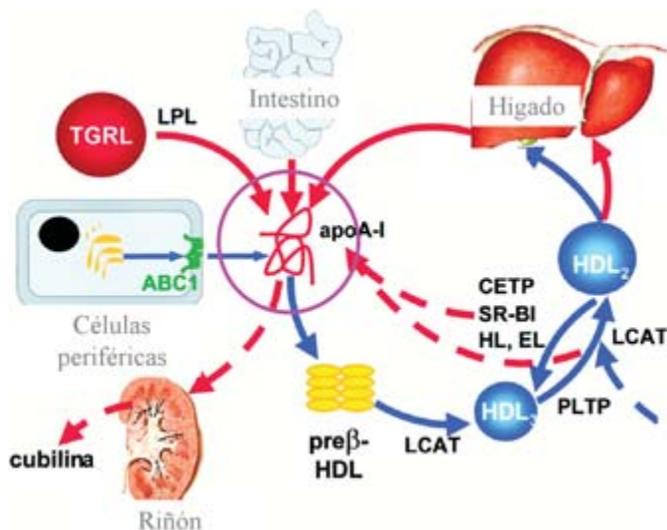


FIGURA 1. **Esquema de la síntesis y metabolismo de las HDL.**
LPL: lipoproteinlipasa; CETP: proteína transferidora de ésteres de colesterol;
LCAT: lecitina colesterolacil transferasa; SRB1: receptor scavenger B1;
ABCA1: transportador ATP binding cassette A1.

Por otro lado, otra de las funciones más importantes de las HDL es el transporte reverso del colesterol desde los macrófagos y células tisulares al hígado donde será excretado directamente o tras su conversión en ácidos biliares (10) (Figura 2). Este ciclo comienza con la transferencia de FL desde las células por el transportador ABCA1 a las Apo A1 pobres en lípidos formando las pre-β-HDL, que por un mecanismo aún desconocido comienzan a cargarse también de colesterol libre (10). Estas pre-β-HDL por acción de la LCAT (que esterifica el colesterol libre) las convierte en α-HDL esféricas y pequeñas (Figura 3). Por acción de la LCAT y la PLTP sobre estas α-HDL esféricas y pequeñas se convierten en α-HDL grandes y esféricas. Las HDL son transportadas al hígado por dos rutas:

1. Directamente por unión al receptor scavenger SR-B1.
2. Los ésteres de colesterol y los FL, por acción conjunta de la proteína transferidora de ésteres de colesterol (CETP) y la

HL, son transferidos de nuevo a las LDL y VLDL, quienes a su vez transfieren TG a las HDL formando HDL pobres en ésteres de colesterol y ricas en TG. Las LDL y las VLDL ingresarán en el hígado a través de los receptores de LDL (10) y las HDL perderán sus TG convirtiéndose de nuevo en pre β -HDL.

El colesterol de las HDL será excretado en forma de ácidos biliares, cerrando el ciclo del transporte reverso del colesterol.

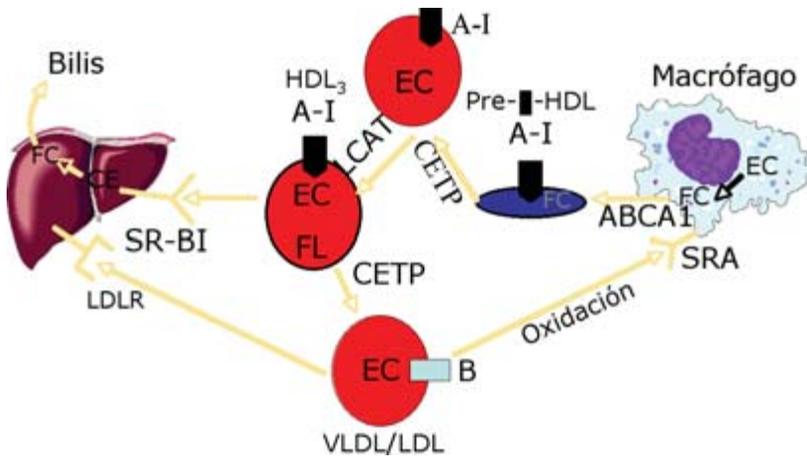


FIGURA 2. *Esquema del transporte reverso del colesterol.*
 EC: ésteres de colesterol; FL: fosfolípidos; CETP: proteína transferidora de ésteres de colesterol; LCAT: lecitín carnitiltransferasa; ABCA1: transportador ATP binding cassette A1; A1: apolipoproteína; SRA y SRB1: receptores scavenger A y B1.

Además se ha comprobado que inhiben la proliferación de células endoteliales que favorecen la adhesión de monocitos y fibroblastos en la formación de la placa de ateroma (11).

Finalmente se ha demostrado una actividad inhibitoria de las HDL sobre la oxidación de las LDL (12), sin embargo los mecanismos por los cuales se desarrolla esta actividad inhibitoria aun no están claros. Se han propuesto varias hipótesis por las cuales las HDL podrían tener un efecto antioxidante:

1. Por su capacidad para quelar metales de transición: esta propiedad es debida a que las HDL tienen adheridas en su super-

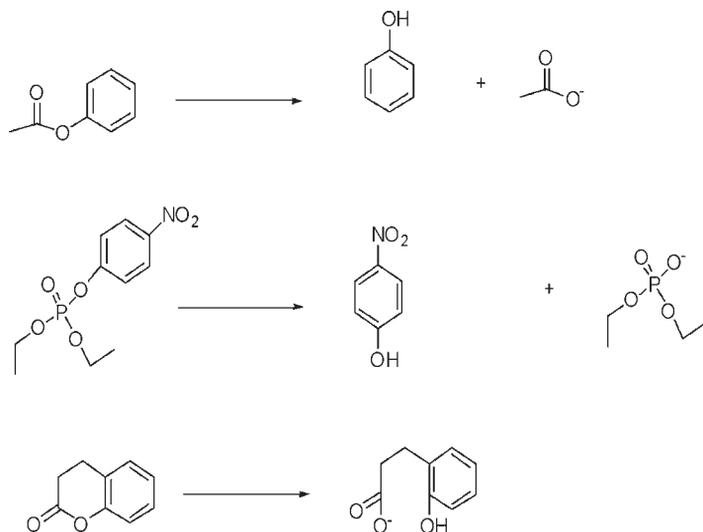


FIGURA 3. *Esquema de las reacciones catalizadas por la PON1.*

ficie ceruloplasmina y transferrina, sin embargo parece que estas proteínas tienen al mismo tiempo efectos pro y antioxidantes (13).

2. Por su capacidad para captar los hidroperóxidos de las LDL-ox y de la superficie celular, transportándolos hasta el hígado donde serán eliminados (12).
3. La acción antioxidante más importante es la debida a las enzimas que tiene unidas aunque sus mecanismos de acción, localización y funciones aún no se conocen con certeza (10):
 - 3.1. Factor activador de plaquetas acetil hidrolasa (PAF-AH) que inhibe la oxidación de las LDL (10).
 - 3.2. Paraoxonasa 1 (PON1) que inhibe la oxidación de las LDL y facilita el transporte reverso del colesterol (12). El mecanismo de acción y propiedades de este enzima van a ser comentadas en extensión a lo largo de este artículo.
 - 3.3. LCAT fosfolipasa D y proteasas: que activan el transporte reverso del colesterol (10).

PON1 Y ATEROSCLEROSIS

La enzima PON 1 obtenida por inmunopurificación se localiza en una subfracción de las HDL donde a su vez se hallan la Apo AI y la Apo J o *clusterina* (14, 15). Su presencia se ha detectado en las HDL₃ y en las lipoproteínas de muy alta densidad (VHDL) (14). Dicha Apo J interviene en la regulación y prevención de la histolisis, el transporte lipídico, la apoptosis y la protección de las membranas celulares en las que se expresa (15). Todo esto hace pensar que la Apo J es un factor protector del endotelio. De hecho, la concentración de esta Apo está aumentada en las fases agudas de la aterosclerosis. Algunos autores sugieren además que la Apo J circula unida a las HDL con el propósito de regular el transporte y la redistribución lipídica (15).

La PON 1 es una glicoproteína Ca²⁺-dependiente de 44 kDa que presenta varias actividades principalmente (15) (Figura 3):

- Paraoxonasa (EC 3.1.8.1). Hidroliza compuestos organofosforados (paraoxón, soman, sarin, etc.).
- Arilesterasa (EC 3.1.1.2). Hidroliza ésteres aromáticos como el acetato de fenilo.
- Lactonasa. Hidroliza lactonas aromáticas y alifáticas (dihydrocumarina, lactona del ácido homogentísico) además de catalizar la reacción reversa de lactonización de ácidos hidroxicarboxílicos.

La PON1 acaba de ser recientemente purificada y cristalizada por Harel y col. (16, 17) mediante evolución directa a 2,2 Å de resolución. La PON1 parece tener una estructura helicoidal de seis hojas-β, cada hoja formada por cuatro hebras. La hoja beta está estabilizada por un cierre tipo «cremallera» constituido por puentes de hidrógeno entre el grupo amida y el grupo carboxilo de un filamento adyacente y los radicales se disponen alternativamente a uno y otro lado de la cadena polipeptídica y se complementa además por un puente disulfuro entre la cisteína (cys) 42 (hebra 6D) y la cys353 (hebra 6C) (16). Contiene dos moléculas de Ca²⁺ en el túnel central de la hélice, una en la parte superior (Ca1) y otra en el centro (Ca2) con una separación entre ambos de 7,4 Å (16). Se cree que la molécula Ca2 tiene una función

meramente estructural pero cuya disociación da lugar a una desnaturalización irreversible (16). Sin embargo al Ca1 se le ha denominado el «calcio catalítico» (18). Harel y col. (16, 17) sugieren que el centro activo de la PON1 está formado por un Ca^{2+} en la parte superior, un PO_4^{3-} y una pareja de histidinas (hys) unidas por enlace de hidrógeno en posición 115 y 134 (Figura 4). Estudios posteriores de mutagénesis dirigida sustituyendo en la posición H115 histidina por triptófano han demostrado que aunque se inhibe la hidrólisis del acetato de fenilo la PON1 sigue manteniendo su actividad frente al paraoxón (19).

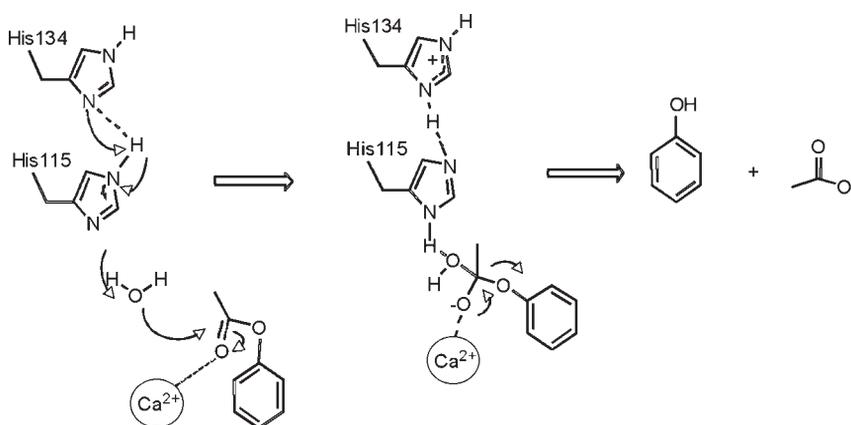


FIGURA 4. Centro activo de la PON1 propuesto por Harel y col. (16, 17) y mecanismo sobre el acetato de fenilo propuesto por Sánchez-Montero y Nus (20).

En la actualidad se desconocen sus propiedades catalíticas, sus sustratos naturales, su mecanismo de acción *in vivo* y su diana en el organismo. Sin embargo, numerosos estudios han llegado a la conclusión de que las propiedades antiaterogénicas de la PON1 se deben a:

1. Inhibición de la peroxidación de las LDL

Aviram y col. (21) han demostrado que la PON1 inhibe la oxidación lipídica tanto de las LDL como de las HDL. Se ha sugerido que para inhibir la oxidación de las LDL actúa hidrolizando fosfolípidos oxidados e hidroxiperóxidos del linoleato de colesterol que están

presentes en las LDL oxidadas (21). Además se cree que también actúa hidrolizando peróxidos presentes en las lesiones ateroscleróticas inhibiendo por tanto la progresión de la placa de ateroma (21).

Además se ha visto que el grado de oxidación de las LDL se relaciona inversamente con la actividad arilesterasa. Aviram y col. (22) han desarrollado dos hipótesis por las cuales la PON1 podría inhibir la oxidación de las LDL:

- a) debe tener una actividad peroxidasa que inhibe el inicio de la peroxidación de las LDL;
- b) debe actuar estequiométricamente como un «enzima suicida» con lípidos oxidados unidos a las LDL-Ox.

A su vez, las LDL-Ox producirían su efecto inhibitorio sobre la PON1 por tres posibles mecanismos de acción:

- a) por la unión de un ión Cu^{2+} a la PON1;
- b) por la unión directa de los radicales libres a la PON1;
- c) por la unión de peróxidos asociados a las LDL-Ox.

2. Inhibición de la producción de moléculas de adhesión

Algunos estudios han señalado que la concentración elevada de HDL inhibe la expresión de algunas citoquinas (23). El grupo de Macneess y col. (23) estudiaron la posible acción que podría ejercer la PON1 sobre este efecto, y verificaron que tanto la PON1 purificada como la unida a las HDL inhiben la síntesis de MCP1 a diferencia de las HDL sin PON1 que no ejercían este efecto. La hipótesis que enunciaron fue que la expresión MCP1 se ve estimulada por una elevada concentración de LDL-ox. Dado que la PON1 inhibe la peroxidación lipídica, la síntesis de este enzima también disminuía en su presencia.

3. Inhibición de la formación de células espumosas

En un estudio llevado a cabo por Fuhrman y col. (24) observaron que al inyectar PON1 en macrófagos de ratones se disminuía el

contenido en lípidos oxidados en su interior, lo que resultaba en una disminución en la síntesis del receptor «scavenger» CD36 y por tanto en una disminución de la captación de LDL-ox en la lesión aterosclerótica.

4. Inhibición de la biosíntesis de colesterol por los macrófagos

La acumulación de colesterol en las células endoteliales y en los macrófagos de la lesión aterosclerótica puede deberse a sobreexpresión de receptores scavenger aumentando la captación de LDL-ox, a disminución del transporte reverso del colesterol o a un aumento en la biosíntesis celular del colesterol (25). Por otro lado, se ha encontrado en las lesiones ateroscleróticas, la enzima PON1 de la cual se ha descrito una actividad similar a la de la PLasa-A₂ hidrolizando aldehídos de proteoliposomas fabricados con fosfatidilcolinas e isoprostanos de fosfatidilcolina en la posición *sn*-2 dando lugar a liso fosfatidilcolina (LPC) (25). Las LPC inhiben la biosíntesis hepática del colesterol por inhibición de la formación de lanosterol un precursor del colesterol (25).

5. Activación del transporte reverso

En un estudio llevado a cabo por Rosenblat y col. (26) concluyeron que el transporte reverso del colesterol desde los macrófagos vía el transportador ABCA1 estaba incrementado cuando las HDL estaban unidas a la PON1, sin embargo en HDL mutantes sin PON1 el transporte reverso se inhibía. Concluyeron que una vez más, la síntesis de LPC por la PON1 era la que favorecía la adhesión de las HDL al transportador ABCA1 facilitando el flujo de colesterol desde los macrófagos (26).

PON1 Y FACTORES DE RIESGO DE LA ATEROSCLEROSIS

La actividad arilesterasa se encuentra disminuida en pacientes con enfermedad coronaria diagnosticada por angiografía (27). Ade-

más se puede utilizar como factor de riesgo de un episodio cardiovascular (28).

Por otro lado, en numerosos estudios epidemiológicos la PON1 ha sido relacionada con muchos de los factores de riesgo que se consideran controlables en la prevención de la aterosclerosis. Las actividades paraoxonasa/arilesterasa se encuentran disminuidas en pacientes con hipercolesterolemia familiar (28), y tras el tratamiento con simvastatina la actividad paraoxonasa aumenta significativamente mientras que la arilesterasa sólo tiene una tendencia a aumentar.

Se ha detectado una menor actividad arilesterasa en diabéticos tipo-1 y tipo-2 respecto a controles sanos, aunque no se ha encontrado una menor concentración de PON1 (29). Se postuló que habría moléculas glicosiladas en la sangre de los diabéticos que inhibirían la actividad arilesterasa. En un estudio realizado por Sutherland y col. (30) en una población de mujeres postmenopáusicas y con diabetes tipo-2 a las que se les sometía a un tratamiento hormonal sustitutorio durante seis meses, se concluyó que la actividad arilesterasa aumentaba significativamente y este aumento estaba relacionado positivamente con las HDL.

Se ha determinado que la actividad PON1 está disminuida en cirrosis y hepatitis crónica ya que es sintetizada en hígado (31), empleándose como marcador de daño hepático.

La actividad arilesterasa se encuentra disminuida en pacientes sometidos a hemodiálisis respecto a sujetos sanos, seguramente como consecuencia del desarrollo paralelo de una enfermedad cardiovascular (32).

Se han hecho algunos estudios para ver qué efecto ejercería la dieta sobre la actividad de este enzima. Así, Sarandol y col. (33) observaron una disminución de la actividad arilesterasa y lo asociaron a un mejor status antioxidante positivo que produce un consumo moderado de vino. Wallace y col. (34) concluyeron que el aceite de oliva tiene un efecto antiaterogénico postprandial por aumentar la concentración de arilesterasa en mujeres diabéticas y de mediana edad.

Por otro lado, la actividad arilesterasa se he visto disminuida en fumadores y por la exposición a radiaciones ionizantes (15).

POLIMORFISMOS DE LA PON1 Y RIESGO CARDIOVASCULAR

El gen que codifica el enzima PON1 se localiza en el brazo largo del cromosoma 7 entre los pares de bases 94.571.639 y 94.598.495, y está formado por 26.856 pdb (15). Hasta el momento se han identificado siete polimorfismos en el gen de la PON1 (15).

1. En la región reguladora:

- 1.1. En la posición -909. Se debe a la sustitución de una guanina (G) por una citosina (C). Este polimorfismo no parece afectar a la expresión de la actividad arilesterasa de forma independiente, pues presenta un desequilibrio de enlace con el resto de los polimorfismos (35).
- 1.2. En la posición -832. Se debe a la sustitución de una adenina (A) por una G. Los individuos con el polimorfismo -832A presentan una mayor actividad arilesterasa y una mayor concentración de PON1 que los individuos -832G (35).
- 1.3. En la posición -162. También debida a la sustitución de una A por G. Se ha observado una mayor actividad arilesterasa en los individuos que presentan A en lugar de T (35). Esta diferencia de actividad es menor que para el polimorfismo de la posición -108, pero está muy poco influenciada por el desequilibrio de enlace con los nucleótidos de las posiciones 55 y 192 (35).
- 1.4. En la posición -126. Se debe a la sustitución de una C por G (35). No se ha observado ningún efecto significativo sobre la actividad arilesterasa (35).
- 1.5. En la posición -108. Debida a la sustitución de una C por una timina (T). Se ha observado una mayor actividad arilesterasa para el haplotipo C que para el T, pero parte de esta diferencia es debida en un 6% al polimorfismo 192 y en un 4% al polimorfismo 55 de la región codificadora (35). Se trata de una posición muy importante para la expresión de PON1 en humanos, seguramente porque está asociado al sitio de unión del factor

de transcripción SP1 (35). El alelo -108T se ha asociado con riesgo cardiovascular incrementado en pacientes con diabetes tipo 2 (36).

2. En la región codificadora:

- 2.1. En la posición 55. Se debe a la sustitución de una leucina (L) por una metionina (M) (15). Aunque en un principio asociaron sus diferencias de actividad al polimorfismo 192, posteriormente se ha definido una mayor actividad paraoxonasa en los portadores PON1-55L que es independiente de PON1-192 (37). La mayoría de los estudios de intervención han asociado también el polimorfismo PON1-55L con un incremento del riesgo cardiovascular (37), pero aparecen resultados contradictorios en función de factores intrínsecos tales como la raza y la edad (37).
- 2.2. En la posición 192. Se produce una sustitución de una glutamina (Q) por una arginina (R) (15). Los portadores PON1-192R presentan una mayor actividad frente al paraoxón y una menor actividad frente a soman y sarin que los portadores PON1-192Q (38). La actividad arilesterasa frente al acetato de fenilo no se ve afectada por ambos polimorfismos (38). Por otro lado, se ha asociado una mayor capacidad para prevenir la oxidación de las LDL en las HDL que contienen PON1-192R (15). En cuanto a su papel predictor de ECV, aun existen muchas controversias, ya que algunos estudios indican que el polimorfismo PON1-192R está relacionado con la ECV, pero en otros estudios no se encuentra dicha asociación (15).

Todos estos resultados han llevado a plantear un tema de debate muy importante entre los investigadores, ya que los mismos polimorfismos que se han relacionado con una mayor actividad paraoxonasa PON1-55 y PON1-192R se han relacionado también con un mayor riesgo de desarrollar una ECV, surge por tanto la pregunta ¿qué es más importante el genotipo o el fenotipo (actividad) para predecir el riesgo de ECV? Aún no se ha llegado a un consenso para resolver esta cuestión, por lo que esperamos colaborar con nuestro estudio.

ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LOS POLIMORFISMOS PON1-L55M Y PON1-Q192R SOBRE LA ACTIVIDAD ARILESTERASA EN INDIVIDUOS CON RIESGO CARDIOVASCULAR INCREMENTADO

Nuestro equipo ha determinado el genotipo en 23 voluntarios con riesgo cardiovascular incrementado para los polimorfismos PON1-L55M y PON1-Q192R (39). Los pacientes seleccionados con riguroso control debían cumplir los siguientes criterios de inclusión: edad: hombres > 45 años; mujeres postmenopáusicas (> 50 años); IMC > 25 kg/m². Además, una de las siguientes características debía ser presentada: colesterol total \geq 5,69 mmol/L, ser fumador (\geq 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. (40) y por el de Nus y col. (41).

La frecuencia genotípica en ambos sitios de restricción del enzima (55 y 192) de los voluntarios con riesgo cardiovascular incrementado cumplía el equilibrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2 < 3,84$; $p > 0,05$). Además los participantes presentaron unas frecuencias genotípicas que se encontraban entre las frecuencias descritas para sujetos sanos y sujetos hipercolesterolémicos (28) (Tabla 1).

No se encontraron diferencias significativas en función de ninguno de los dos polimorfismos para la actividad arilesterasa cuando ésta fue medida por el método de Eckerson y col. (40), coincidiendo con el resto de las fuentes bibliográficas (15). Sin embargo, se encontró una interacción PON1-L55M*PON1-Q192R casi significativa ($p < 0,1$) para la actividad arilesterasa medida por el método de Nus y col. (41). Estratificando la población en cuatro grupos en función del genotipo para PON1-L55M y PON1-Q192R: [LL, QQ]; [LL, (QR+RR)]; [(LM+MM), QQ]; [(LM+MM), (QR+RR)] y desechando los grupos con genotipo [LL, QQ] y [(MM+ML), (QR+RR)] debido al bajo número de individuos que los presentaban, se buscaron si existían diferencias significativas entre ellos. Los voluntarios con genotipo [(LM+MM), QQ] presentaban una menor actividad arilesterasa medida por el método de Nus y col. (41) ($p=0,014$) que el grupo [LL, (QR+RR)] (39) (Figura 5).

TABLA 1. Frecuencias genotípicas de sujetos con riesgo cardiovascular incrementado, hipercolesterolémicos (28) y controles sanos (28)

Genotipo	Riesgo cv incrementado	Hipercolesterolémicos (28)	Controles (28)
PON1-55			
LL	0,35	0,26	0,33
ML	0,52	0,62	0,50
MM	0,13	0,12	0,17
PON1-192			
QQ	0,52	0,62	0,50
QR	0,30	0,32	0,40
RR	0,17	0,06	0,11

Es la primera vez que se ha encontrado que los polimorfismos PON1-55L y PON1-192R están asociados a una mayor actividad arilesterasa. Se puede concluir que estas diferencias se deben al método de Nus y col. (41) empleado para medir la actividad arilesterasa, ya que el método de Eckerson y col. (40) sobreestima la actividad enzimática, y este efecto es más importante en muestras con muy baja actividad arilesterasa.

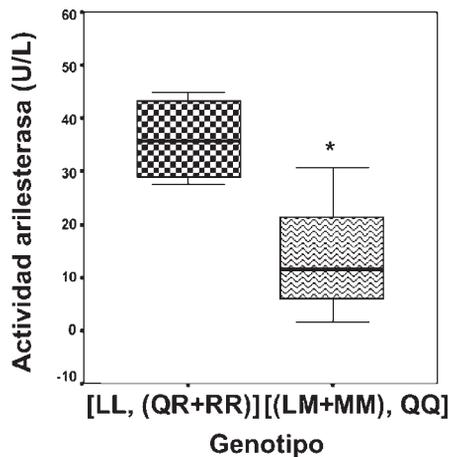


FIGURA 5. Actividad arilesterasa en sujetos con riesgo cardiovascular incrementado que presentan el genotipo [(LM+MM), QQ] y [LL, (QR+RR)]. * $p < 0,05$.

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 referencias 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 Chimenno.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) LEAL, J.; LUENGO-FERNÁNDEZ, R.; GRAY, A.; PETERSEN, S., RAYNER, M. (2006): Economic burden of cardiovascular diseases in the enlarged European Union. *Eur. Heart J.* 27: 1610-1619.
- (2) INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICA (2002): *Defunciones según causa de muerte*. www.ine.es
- (3) GOLDSTEIN, J. L. and BROWN, M. S. (1977): The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. *Ann. Rev. Biochem.* 46: 897-930.
- (4) ROSS, R. (1999): Atherosclerosis an inflammatory disease. *N. Eng. J. Med.* 340: 115.
- (5) STEINBERG, D.; PARTHASARATHY, S. and CAREW, T. E. (1989): Beyond cholesterol: Modifications of low density lipoproteins that increase its atherogenicity. *N. Eng. J. Med.* 320: 915-924.
- (6) SÁNCHEZ-MUNIZ, F. J.; VARELA, P.; BASTIDA, S. and GONZÁLEZ, J. M. (2001): Enfermedad cardiovascular, hipertensión arterial y dislipemias, en *Cuidados farmacológicos y nutricionales en el paciente en la edad avanzada* (Carvajal, A.; Varela, P. Eds.).
- (7) MESA, M. D.; AGUILERA, C. M.; RAMÍREZ-TORTOSA, C. L.; GIL, A. and RAMÍREZ-TORTOSA, M. C. (2006): Effect of olive oil on cardiovascular risk factor, LDL oxidation and atherosclerosis development, en *Olive Oil and Health* (Quiles, J. L.; Ramírez-Tortosa, M. C.; Yaqoob, P. Eds.), pp. 194-222. Cabi, Oxfordshire, UK.
- (8) SÁNCHEZ-MUNIZ, F. J. and SÁNCHEZ-MONTERO, J. M. (1999): Enzymatic methods for the study of thermally oxidized oils and fats, en *Frying of Food. Oxidation, Nutrient and Non-Nutrient antioxidants, Biologically Active Compounds and High Temperatures* (Boskou, D.; Elmadfa, I. Eds.), pp. 105-142, Technomic Publishing Co. Lancaster, USA.

- (9) ASZTALOS, B. F.; ROHEIM, P. S.; MILANI, R. L.; LEFEVRE, M.; MCNAMARA, J. R.; HORVATH, K. V. and SCHAEFER, E. J. (2000): Distribution of Apo A-I-containing HDL subpopulations in patients with coronary heart disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20: 2670-2676.
- (10) BARTER, P. J. (2002): Hugh Sinclair Lecture: The regulation and remodelling of HDL by plasma factors. *Atherosclerosis Suppl.* 3: 39-47.
- (11) NAVAB, M.; BERLINER, J. A.; SUBBANAGOUNDER, G. and HAMA, S. Y. (2001): HDL and the inflammatory response induced by LDL-derived oxidized phospholipids. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21: 481-488.
- (12) NAVAB, M.; BERLINER, J. A.; WATSON, A. D.; HAMA, S. Y.; TERRITO, M. C.; LUSIS, A. J., *et al.* (1996): The Yin and Yang of oxidation in the development of the fatty streak. A review based on the 1994 George Lyman Duff Memorial Lecture. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 16: 831-842.
- (13) MINNA, L.; HANNUKSELA, M. E.; BROUSSEAU, S. M.; MEYN, H. N.; GIOVANNI BADER, R. D.; SHAMBUREK, P. A. and BREWER, H. B. JR. (2002): *In vivo* metabolism of apolipoprotein E within the HDL subpopulations LpE, LpE:A-I, LpE:A-II and LpE:A-I:A-II. *Atherosclerosis.* 165: 205-220.
- (14) BERGMEIER, C.; SIEKMEIER, R. and GROSS, W. (2004): Distribution spectrum of paraoxonase activity in HDL fractions. *Clin. Chem.* 50: 2309-2315.
- (15) CANALES, A. and SANCHEZ-MUNIZ, F. J. (2003): La paraoxonasa, ¿algo más que un enzima? *Med. Clin. (Barc.)*. 121: 537-548.
- (16) HAREL, M.; AHARONI, A.; GAIDUKOV, L.; BRUMSHEIN, 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.
- (17) PROTEIN DATA BANK <http://www.rcsb.org/pdb/navbsearch.do?newSearch=yes&isAuthorSearch=no&radioset=All&inputQuickSearch=1v04>.
- (18) KUO, C. L. and LA DU, B. N. (1998): Calcium binding by human and rabbit serum paraoxonases. Structural stability and enzymatic activity. *Drug Metab. Disp.* 26: 653-660.
- (19) YEUNG, D. T.; LENZ, D. E. and CERASOLI, D. M. (2005): Analysis of active-site amino-acid residues of human serum paraoxonase using competitive substrates. *FEBS J.* 272: 2225-2230.
- (20) SÁNCHEZ-MONTERO, J. M. and NUS, M.: Observaciones sin publicar.
- (21) 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.
- (22) AVIRAM, M.; ROSENBLAT, M.; BISGAIER, C. L.; NEWTON, R. S.; PRIMO-PARMO, S. L. and LA DU, B. N. (1998): Paraoxonase inhibits high density lipoprotein (HDL) oxidation and preserves its functions, a possible peroxidative role for paraoxonase. *J. Clin. Invest.* 101: 1581-1590.
- (23) 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.

- (24) FUHRMAN, B.; VOLKOVA, N. and AVIRAM, M. (2002): Oxidative stress increases the expression of the CD36 scavenger receptor and the cellular uptake of oxidized LDL in macrophages from atherosclerotic mice: protective role of antioxidants and of paraoxonase. *Atherosclerosis*. 161: 307-316.
- (25) ROZENBERG, O.; SHIH, D. M. and AVIRAM, M. (2003): Human serum paraoxonase (PON1) decreases macrophage cholesterol biosynthesis: a possible role for its phospholipase-A2 activity and lysophosphatidylcholine formation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23: 461-467.
- (26) ROSENBLAT, M.; VAYA, J.; SHIH, D. M. and AVIRAM, M. (2005): Paraoxonase 1 (PON1) enhances HDL-mediated macrophage cholesterol efflux via the ABCA1 transporter in association with increased HDL binding to the cells: a possible role for lysophosphatidylcholine. *Atherosclerosis*. 179: 69-77.
- (27) MACKNESS, B.; DURRINGTON, P. N.; McELDUFF, P., *et al.* (2003): Low paraoxonase activity predicts coronary events in the Caerphilly prospective. *Circulation*. 107: 2775-2779.
- (28) 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.
- (29) 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.
- (30) 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.
- (31) FERRÉ, N.; CAMPS, J.; PRATS, E.; VILELLA, E.; PAUL, A.; FIGUERA, L. and JOVEN, J. (2002): Serum paraoxonase activity: a new additional test for the improved evaluation of chronic liver damage. *Clin. Chem.* 48: 261-268.
- (32) SUTHERLAND, W. H. F.; DE JONG, S. A. and WALKER, R. J. (2004): Hypochlorous acid and low serum paraoxonase activity in haemodialysis patients: an in vitro study. *Nephrol. Dial. Transplant.* 19: 75-82.
- (33) SARANDOL, E.; SERDAR, Z.; DIRICAN, M. and SAVAK, O. (2003): Effects of red wine consumption on serum paraoxonase/arylesterase activities and on lipoprotein oxidizability in healthy-men. *J. Nutr. Biochem.* 14: 507-512.
- (34) WALLACE, A. J.; SUTHERLAND, W. H. F.; MANN, J. I. and WILLIAMS, S. M. (2001): The effect of meals rich in thermally stressed olive and safflower oils on postprandial serum paraoxonase activity in patients with diabetes. *Eur. J. Clin. Nutr.* 55: 951-958.
- (35) LEVIEV, I. and JAMES, R. W. (2000): Promoter polymorphisms of human paraoxonase PON1 gene and serum paraoxonase activities and concentrations. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20: 516-521.
- (36) JAMES, R. W.; LEVIEV, I.; RUIZ, J.; PASSA, P.; FROGUEL, P. and GARIN, M. C. (2000): Promoter polymorphism T(-107)C of the paraoxonase PON1 gene is

- a risk factor for coronary heart disease in type 2 diabetic patients. *Diabetes*. 49: 1390-1393.
- (37) FORTUNATO, G.; RUBBA, P.; PANICO, S.; TRONO, D.; TINTO, N.; MAZZACCARA, C; DE MICHELE, M.; IANUZZI, A.; VITALE, D. F.; SALVATORE, F. and SACHETTI, L. (2003): A paraoxonase gene polymorphism, PON1 (55), as an independent risk factor for increased carotid intima-media thickness in middle-aged women. *Atherosclerosis*. 167: 141-148.
- (38) MACKNESS, B.; MACKNESS, M. I.; ARROL, S.; TURKIE, W. and DURRINGTON, P. N. (1997): Effect of the molecular polymorphisms of human paraoxonase (PON1) on the rate of hydrolysis of paraoxon. *Br. J. Pharmacol.* 122: 265-268.
- (39) NUS, M.; FRANCES, F.; SÁNCHEZ-MONTERO, J. M.; CORELLA, D. and SÁNCHEZ-MUNIZ, F. J. (2006): Arylesterase activity and HDL-cholesterol levels are dependent on the PON55M and PON192R polymorphisms. International Symposium on Atherosclerosis. Roma (Comunicación oral publicada en *Atherosclerosis Suppl* 2006; 7: 333).
- (40) 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.
- (41) 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.