

2.1. L'enzim paraoxonasa

Es coneix per paraoxonasa (PON) un grup d'enzims d'una família gènica que en els mamífers té almenys tres membres codificats pels gens *PON1*, *PON2* i *PON3* (1). Aquesta família de gens sembla haver-se format per la duplicació d'un precursor comú, ja que tots tres components presenten una homologia estructural força gran (aproximadament d'un 70% en la seqüència de nucleòtids i del 60% en la d'aminoàcids) (2). A més, els tres gens es troben localitzats en posicions adjacents en el cromosoma 7 (7q21.3) dels humans, o en el cromosoma 6 dels ratolins (1). El més conegut d'aquests productes gènics és la PON1, al qual la majoria d'autors es refereixen amb el nom de *paraoxonasa*; aquest enzim també es pot anomenar *arilesterasa*, el nom dependrà del substrat que s'utilitzi per a la seva determinació. La PON1 [EC 3.1.8.1], és una èster hidrolasa que facilita la hidròlisi d'alguns xenobiòtics com són els organofosforats, els èsters alifàtics insaturats, els èsters carboxílics aromàtics i, possiblement, els carbamats (3,4). El paper fisiològic de la PON1 encara no és ben conegut. En sèrum, es troba estretament associada a les lipoproteïnes d'alta densitat (HDL) i és probable que aquesta associació sigui, en part, responsable del paper protector que les HDL exerceixen sobre la peroxidació de les lipoproteïnes de baixa densitat (LDL) (5-11). Recentment, també s'ha comprovat que la PON1 té activitat tiolactonasa, ja que és capaç d'hidrolitzar tiolactones d'homocisteïna. Aquestes tiolactones són tioèsters produïts en el metabolisme de l'homocisteïna (12,13). Recolzant aquesta possible funció, alguns autors han mostrat que el gen *PON1* presenta certa homologia amb seqüències gèniques de les lactonases (2).

Les funcions fisiològiques dels productes gènics *PON2* i *PON3* són encara objecte d'estudis força preliminars (14). Mutacions en posicions 148 i 311 del gen *PON2* s'han associat amb alteracions en el metabolisme lipoproteic i amb un augment del risc de malaltia cardiovascular (15,16). De fet, sembla que la PON2 també és capaç de protegir les partícules de LDL de l'oxidació (17), tot i no trobar-se associat a les HDL. D'altra banda, la PON3 sí que s'associa a les partícules de HDL en sèrum de conill i humans, i també es capaç d'hidrolitzar lactones aromàtiques i lipoperòxids, tot i que posseeix una activitat paraoxonasa/arilesterasa molt feble (18-20). També s'ha observat que la PON3 té una capacitat més gran que la PON1 de protegir les LDL de l'oxidació; tanmateix, a causa que la seva expressió és força menor, la seva importància relativa, en aquest aspecte, segueix sent inferior (2,19).

En la taula 1 es resumeixen les principals característiques funcionals dels productes gènics del *PON1*, el *PON2* i el *PON3*, així com els teixits on s'ha comprovat la seva expressió.

Taula 1.

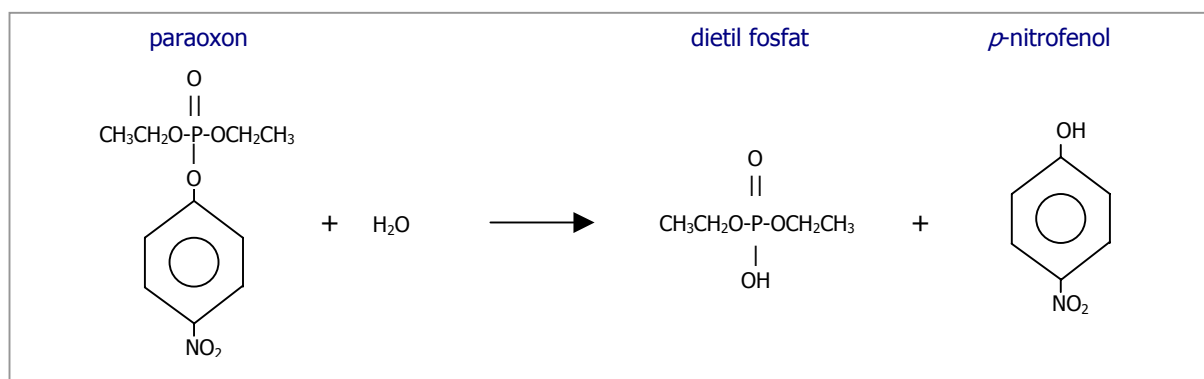
	PON1	PON2	PON3
Presenta activitat paraoxonasa/arilesterasa	Sí	No s'ha observat	Feble
Presenta activitat tiolactonasa	Sí	No s'ha comprovat	Sí
Viatja en sèrum associada a les HDL	Sí	No	Sí
Protegeix la LDL de l'oxidació	Sí	Sí	Sí
S'expressa en:	Fetge	Fetge, ronyó, cervell, etc.	Fetge, placenta, pulmó, testicles, cor, etc.

2.2. Mètodes de mesura

Mesura de l'activitat paraoxonasa

El mètode més utilitzat per determinar l'activitat PON1 és la mesura de la taxa d'hidròlisi del paraoxon monitoritzant l'augment d'absorbància a 412 nm (21,22). En aquest cas parlarem de l'activitat paraoxonasa de l'enzim PON1. La reacció (Figura 1) té lloc en un tampó de glicina (0.05M, pH=10.5) que conté 1mM de CaCl₂. La quantitat de *p*-nitrofenol generat es calcula mitjançant el coeficient d'extinció molar en aquestes condicions (18290 L mol⁻¹cm⁻¹). Podem mesurar també l'activitat paraoxonasa estimulada per sal afegint 1 M de NaCl en el mateix tampó de reacció. El mètode és una fotometria cinètica i pot ser fàcilment automatitzable.

Figura 1: Esquema de la reacció de degradació del paraoxon per l'enzim PON1.



L'ús del paraoxon com a substrat de la PON1 té dos inconvenients: la inestabilitat i la toxicitat. Aquests inconvenients obliguen a preparar els reactius en fresc i a treballar amb les solucions *stock* en una campana d'extracció de gasos, amb la protecció d'uns guants i d'una màscara per evitar un contacte o una inhalació accidental.

Mesura de l'activitat arilesterasa

S'ha investigat sobre l'ús de substrats alternatius; d'entre ells, el més utilitzat és el fenilacetat (21,22), que per acció de l'activitat arilesterasa de la PON1 es degrada i dóna lloc a la formació de fenol. Un problema d'aquest substrat és el fet que la reacció d'hidròlisi es mesura a 270 nm de longitud d'ona, que és una regió de l'espectre ultraviolat que la majoria d'analitzadors automàtics no tenen disponible i, per tant, impossibilita la utilització d'aquest substrat en la rutina del laboratori de bioquímica clínica. Tot i això, la mesura de l'activitat arilesterasa utilitzant fenilacetat com a substrat és un dels mètodes més utilitzats en treballs d'investigació.

Altres autors han publicat assaigs de la PON1 amb altres substrats com el β -naftil acetat (23), 4-nitrofenil acetat (24), o el 4-(4-fluoropentil)tiometil-5-metil-1,3-dioxol-2-ona (25), però la seva utilització no ha estat gaire estesa en els treballs publicats. De moment, tots els substrats utilitzats per mesurar l'activitat PON1 tenen el problema de no ser fisiològics. Aquest és un inconvenient que no es podrà resoldre fins que es caracteritzin completament quins són els substrats fisiològics específics de la PON1.

Mesura de la concentració

La concentració de PON1 pot ser mesurada mitjançant ELISA, tot i que fins al moment no s'han desenvolupat reactius comercials per a aquest mètode, i tots els treballs que s'han publicat sobre aquest tema han utilitzat mètodes desenvolupats al propi laboratori. El 1991 Kawai et al. (26) van desenvolupar un anticòs per poder mesurar la concentració d'arilesterasa en sèrum i, posteriorment, Blatter-Garin et al. (27) van aconseguir un anticòs monoclonal específic per a la PON1 que més tard van utilitzar per mesurar-ne la concentració (28).

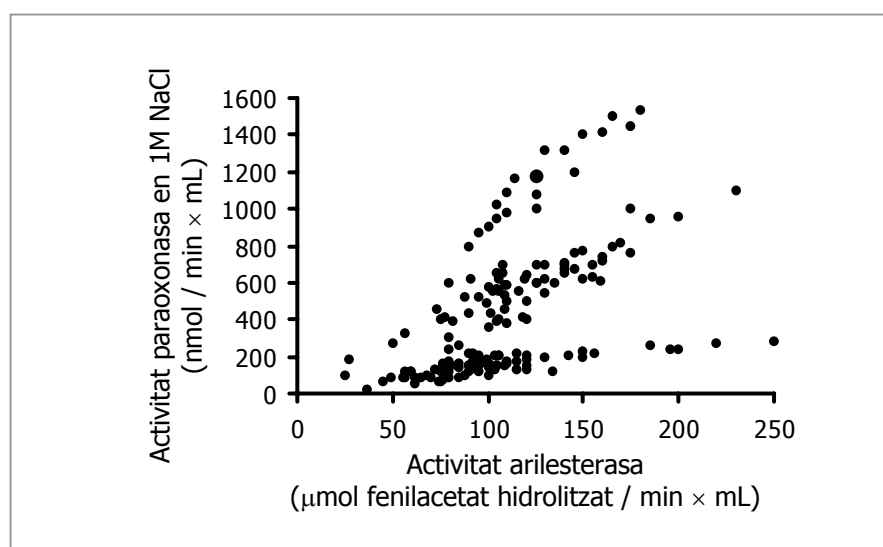
Diversos autors han determinat conjuntament l'activitat i la concentració de la PON1 i n'han calculat l'activitat específica. En termes generals, aquests treballs han mostrat una correlació

elevada entre concentració i activitat (26,28) però, alguns autors, han descrit una disminució de l'activitat específica en certes malalties com la diabetis (29).

2.3. Variants del gen *PON1* que afecten l'activitat paraoxonasa sèrica

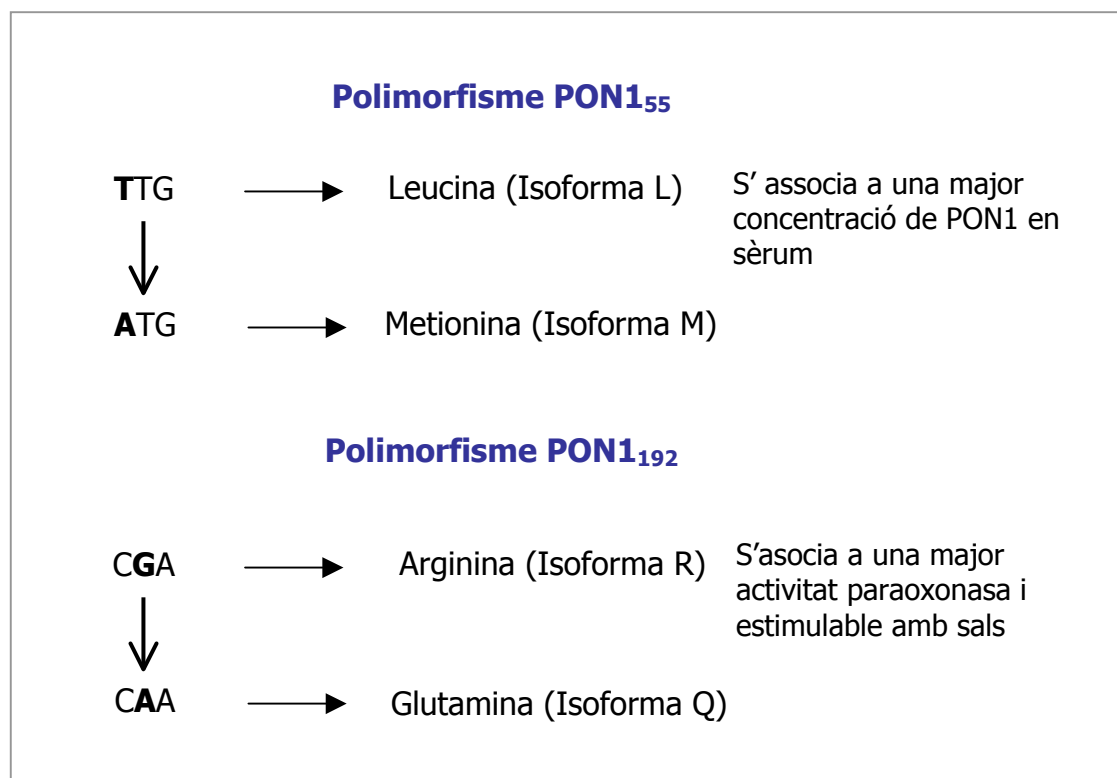
PON1 és un enzim polimòrfic. Playfer et al. (30) van investigar per primera vegada les seves variants genètiques i van concloure que la variabilitat en l'activitat PON1 era determinada per un mateix locus autosòmic amb dos possibles al·lels. El 1983, Eckerson et al. (21,31) van desenvolupar un mètode senzill per discriminar dues isoformes de la proteïna que van anomenar A i B (actualment s'anomenen Q i R). Aquest mètode consistia a determinar les activitats paraoxonasa estimulada amb sals i arilesterasa de PON1 en la mateixa mostra de sèrum i representar-les gràficament, tal com es pot observar a la figura 2. Van observar que les dues isoformes es diferenciaven en una propietat concreta: l'al·loenzim R tenia una capacitat d'hidrolitzar paraoxon més gran que l'al·loenzim Q i, a més, aquesta capacitat era estimulada per la presència d'1 M de NaCl d'una forma molt més gran que l'al·loenzim Q. Més tard, el mateix grup va seqüenciar la regió codificant de *PON1* en llibreries de cDNA humana (32) i es van identificar dos llocs polimòrfics: Leu/Met en posició 55 (polimorfisme PON1₅₅) i Arg/Gln en posició 192 (polimorfisme PON1₁₉₂), (Figura 3). El polimorfisme PON1₁₉₂ es correlacionava clarament amb els fenotips Q i R anteriorment descrits; els individus amb la variant Gln en la posició 192 pertanyien al fenotip Q, mentre que els que tenien la variant Arg en posició 192 presentaven el fenotip R.

Figura 2: Representació gràfica de les activitats paraoxonasa estimulada per sals i arilesterasa. S'observen tres subgrups de població que es corresponen als tres possibles genotips per al polimorfisme PON1₁₉₂: QQ, QR i RR. Adaptada d'Eckerson et al. Am J Hum Genet 1983;35 214-227.



El 1997, Blatter-Garin et al. (33) van estudiar la influència dels genotips PON1₅₅ i PON1₁₉₂ en l'activitat i la concentració de l'enzim en pacients diabètics, observant diferències considerables respecte al genotip PON1₅₅. Els individus que portaven una leucina en posició 55 (isoforma L) tenien concentracions de PON1 en sèrum més altes que els portadors d'una metionina (isoforma M) en aquesta posició, i aquests increments de la concentració s'associaven també a una major activitat paraoxonasa o arilesterasa. Respecte al polimorfisme PON1₁₉₂, van observar que no tenia influència sobre la concentració de PON1 en sèrum malgrat que afectava la seva activitat enzimàtica. Com ja hem indicat, l'al·loenzim R presentava una major capacitat d'hidrolitzar el paraoxon (activitat paraoxonasa), però l'efecte d'aquest polimorfisme sobre l'activitat arilesterasa era molt menys clar. Alguns autors no han observat diferències en l'activitat arilesterasa (mesurada amb fenilacetat com a substrate) en funció del genotip PON1₁₉₂ (34), i altres han trobat petits increments associats en aquest cas a l'al·loenzim Q (33,35).

Figura 3: Esquema dels canvis de nucleòtid i aminoàcid corresponents als polimorfismes PON1₅₅ i PON1₁₉₂ del gen *PON1*.



Diversos autors han determinat en els seus treballs les distribucions genotípiques i al·lèliques per als polimorfismes PON1₅₅ i PON1₁₉₂ en diverses poblacions. Els resultats d'alguns d'aquests treballs es poden observar en la taula 2.

Recentment s'han detectat cinc llocs polimòrfics a la regió promotora del gen *PON1* humà en les posicions -107, -126, -160, -824 i -907 (36,37). D'aquests polimorfismes, especialment el T(-107)C sembla estar associat a la concentració de PON1 i, en conseqüència, a la seva activitat en sèrum.

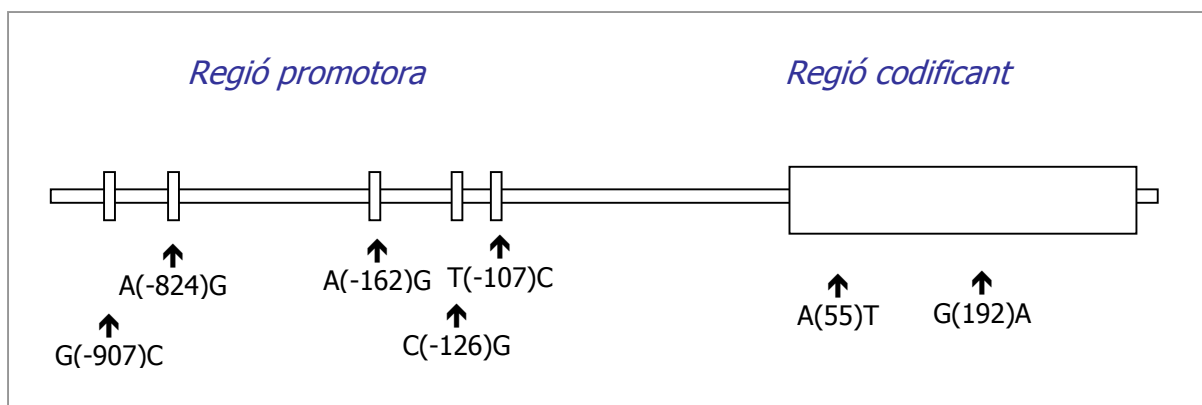
Taula 2: Freqüències genotípiques i al·lèliques per als polimorfismes PON1₁₉₂ i PON1₅₅ trobades en els treballs publicats.

Autor	Població	Genotips PON1 ₁₉₂			Freq. al·lèliques
		QQ	QR	RR	Q/R
Antikainen et al. (1996)	Població sana, Finesos (n=169)	0.520	0.440	0.070	0.737/0.263
Herrmann et al. (1996)	Individus control de Belfast, Lille, Tolosa i Strasbourg (n=701)	0.516	0.378	0.106	0.705/0.295
Schmidt et al. (1998)	Població general, Àustria (n=316)	0.544	0.392	0.063	0.741/0.259
Mackness et al. (2000)	Població control, Belfast (n=168)	0.423	0.494	0.083	0.670/0.330
" " "	Població control, Toulouse (n=186)	0.570	0.390	0.040	0.763/0.237
Leviev et al. (2000)	Població sana, Ginebra (n=374)	0.460	0.450	0.090	0.685/0.315

Autor	Població	Genotips PON1 ₅₅			Freq. al·lèliques
		LL	LM	MM	L/M
Kelso et al. (1994)	Individus control, Manchester (n=36)	0.33	0.47	0.20	0.570/0.430
Schmidt et al. (1998)	Població general, Àustria (n=316)	0.43	0.42	0.15	0.642/0.358
Leviev et al. (2000)	Població sana, Ginebra (n=374)	0.42	0.46	0.11	0.650/0.350
Malin et al. (2001)	Població general, Finlàndia (n=199)	0.39	0.45	0.16	0.618/0.382

La figura 4 mostra un esquema del gen *PON1* amb la localització dels 7 polimorfismes que s'hi han descrit fins a l'actualitat.

Figura 4: Esquema dels polimorfismes descrits en el gen *PON1*.



2.4. Paper fisiològic de la paraoxonasa

Les especificitats de la PON1 vers substrats endògens en sèrum i teixits no s'han caracteritzat completament, tot i que recentment s'han publicat dades evidents que suggereixen quin pot ser el paper fisiològic d'aquest enzim. El 1995, Watson et al. (38) van mostrar que el tractament de la LDL oxidada amb la PON1 purificada reduïa significativament la capacitat d'aquesta lipoproteïna per induir les interaccions entre monòcits i cèl·lules endotelials, i que aquest efecte estava associat amb una disminució de la quantitat de fosfolípids oxidats en la partícula de la LDL (especialment de 1-palmitol-2-arquidonol-sn-glicero-3-fosforil-colina oxidada). Ells suggerien que la funció fisiològica de la PON1 podria ser la de protegir contra la inducció de respostes inflamatòries en la paret de l'artèria, mitjançant la destrucció dels fosfolípids biològicament actius en la LDL oxidada. Posteriorment, es va descobrir que per a la destrucció dels peròxids lipídics de la LDL es necessita que el grup sulfidril de la cisteïna en posició 284 estigui lliure, i també es va trobar que la PON1 és parcialment inactivada en el procés (39,40). Un estudi posterior (41) va mostrar que la PON1 protegia també les HDL de l'oxidació a més de les LDL. La hipòtesi del paper protector de la PON1 contra la lipoperoxidació va rebre un fort impuls l'any 1998, quan Shih et al. (42) van observar que les HDL dels ratolins knockout per al gen *PON1* no tenien la capacitat de protegir a la LDL de l'oxidació *in vitro* com ho feien les HDL dels ratolins salvatges; i a més, aquests ratolins presentaven un major grau d'arteriosclerosi. Més tard, el

mateix grup (43) va demostrar també en ratolins dobles *knockout* per als gens *PON1* i *APOE* (gen que codifica per l'apolipoproteïna E), un major grau de lipoperoxidació *in vivo* i un increment en l'arteriosclerosi.

Actualment encara es debat si els polimorfismes genètics de la PON1 afecten la seva capacitat de protegir la LDL de la peroxidació. Mackness et al. (16) van mostrar que les HDL dels individus QQ tenien una capacitat de protecció més gran que les HDL d'individus QR o RR. Aviram et al. (44) van demostrar que la PON1 Q purificada era més efectiva que la PON1 R hidrolitzant hidroperòxids de linoleat de colesterol i hidròxids de linoleat de colesterol de lesions d'artèries caròtides coronàries. Però, per altra banda, Cao et al. (45) van mostrar que les PON1 de pacients diabètics QQ o RR disminuïen la peroxidació de la LDL d'una forma similar, i suggerien que el polimorfisme Gln/Arg no afectava la capacitat antioxidant de l'enzim.

Recentment s'han publicat noves i evidents informacions sobre el possible paper fisiològic de la PON1 en sèrum humà. L'any 2000, dos grups independents d'investigadors van mostrar que la PON1 té activitat tiolactonasa (12,13) i que és capaç d'hidrolitzar tiolactona d'homocisteïna, un tioèster molt reactiu que pot ser altament tòxic per a les cèl·lules.

2.5. Paraoxonasa i malaltia cardiovascular

Les malalties cardiovasculars, i en especial la malaltia coronària, són unes de les principals causes de morbi-mortalitat en els països desenvolupats, i també una important font de despeses del sistema sanitari. La causa última d'aquestes patologies rau en el procés d'engruiximent i enduriment de la paret de les artèries, l'aterosclerosi. Com a malalties complexes que són, les patologies cardiovasculars presenten una etiologia multifactorial i es coneixen diversos factors de risc que es poden associar al seu desenvolupament (Quadre 1). Tot i així, aproximadament la meitat dels casos de malaltia coronària no poden ser explicats pels factors de risc convencionals i, tenit en compte que aquesta malaltia comporta un alt percentatge de mortalitat en el seu debut, la investigació de nous factors de risc i noves estratègies profilàctiques és de gran interès.

La investigació de la PON1 s'havia centrat inicialment en l'estudi de la seva propietat per hidrolitzar alguns compostos tòxics per a l'organisme, com els pesticides i gasos nerviosos (3). L'any 1991, Mackness et al. (6) van descobrir que aquest enzim podia prevenir

l'acumulació de lipoperòxids en la LDL *in vitro* i, més tard, van associar aquest fet amb la capacitat de la HDL per protegir la LDL de l'oxidació (7). Aquests descobriments, que relacionaven l'enzim PON1 amb la malaltia cardiovascular, van significar un fort impuls en el seu estudi.

L'any 1995, van sorgir estudis que mostraven que certs polimorfismes del gen *PON1* podien estar associats amb un major risc de malaltia cardiovascular. Ruiz et al. (467) van associar per primera vegada l'al·lel R del polimorfisme PON1₁₉₂ amb la presència de malaltia cardiovascular en pacients amb diabetis. Serrato et al. (47), van mostrar que els pacients amb malaltia coronària arterial presentaven una major freqüència de l'al·lel R del polimorfisme PON1₁₉₂ que la població general. Altres grups d'investigadors van trobar resultats similars, i van formular la hipòtesi que aquesta variant al·lèlica estava associada a un major risc de malaltia cardiovascular (33,46-49). Com ja hem exposat, alguns autors havien relacionat la variant R del polimorfisme PON1₁₉₂ amb una menor capacitat de protecció de les LDL davant l'oxidació i, tenint en compte que aquesta lipoproteïna juga un paper important en el desenvolupament de l'arteriosclerosi, aquest sembla el motiu de l'associació amb un major risc de malaltia cardiovascular. A més, alguns estudis van mostrar també una associació positiva entre la variant L del polimorfisme PON1₅₅ i la malaltia cardiovascular (33). En aquest cas, el mecanisme fisiopatològic per explicar aquest increment del risc no era tan clar ja que, en un principi, l'al·lel L d'aquest polimorfisme s'havia associat a una major expressió de la proteïna PON1 i, en conseqüència, a una major activitat en sèrum. Posteriorment, diversos autors han investigat la influència d'aquest polimorfisme PON1₅₅ en la capacitat de les HDL per protegir les LDL de l'oxidació i han observat que l'isoenzim L sembla tenir una menor capacitat de protecció que l'isoenzim M (50,51). A més, un estudi recent (52), que investigava l'efecte del polimorfisme PON1₅₅ en la peroxidació lipídica, va mostrar que els individus homozigots per l'al·lel L tenien uns nivells d'excreció en orina de 8-iso-PGF_{2α} (marcador d'estrès oxidatiu) més alts que els individus portadors de l'al·lel M.

Així doncs, existeixen treballs que indiquen una associació entre els al·lells R i L i la malaltia cardiovascular; però altres estudis no han pogut confirmar aquests resultats (53,54). Un possible motiu per la discrepància entre diversos autors pot ser la diferència en la selecció dels pacients inclosos en l'estudi. De fet, alguns dels estudis que han obtingut resultats d'associació positius estaven realitzats en pacients amb diabetis. L'any 2001, Mackness et al. (55) van indicar que tampoc es pot descartar un cert biaix en les publicacions, ja que els

resultats d'associació positiva entre l'α-loenzim R i la malaltia cardiovascular eren més freqüents en el estudis amb una mostra més petita i, probablement, estudis similars amb resultats negatius no arribin a ser publicats. La gran majoria dels estudis d'associació realitzats fins al moment només determinen els genotips dels polimorfismes PON1₅₅ i PON1₁₉₂ i no mesuren ni l'activitat ni la concentració de PON1 i, alguns autors, han mostrat que certes malalties com la diabetis i la malaltia cardiovascular estan associades a una disminució de l'activitat paraoxonasa sense que s'observin diferències en les distribucions dels seus genotips. Tot això, fa que actualment encara existeixi controvèrsia en el fet de si els polimorfismes de la PON1 s'associen a un major risc de malaltia cardiovascular.

També alguns dels polimorfismes detectats en la regió promotora del gen *PON1* han estat relacionats amb un major risc de malaltia cardiovascular (34,36). Ja havíem explicat com aquests polimorfismes podien estar relacionats amb el nivell d'expressió de la proteïna PON1. En concret, el polimorfisme T(-107)C és el que ha estat associat per més treballs a l'expressió de PON1 de forma significativa, i la seva localització sembla que es correspon amb una possible seqüència consens per al factor de transcripció Sp1 (34). Els individus portadors de la variant T per aquest polimorfisme presenten nivells d'expressió de PON1 més baixos, una menor activitat en sèrum i, a més, també s'ha associat aquest al·lel en homozigosi a un major risc de patir malaltia cardiovascular (34-37).

Quadre 1.

Factors de risc convencionals de la malaltia cardiovascular

Hiperlipèmia

Els nivells crònicament elevats de certes lipoproteïnes com les LDL i VLDL s'associen a una major incidència d'aterosclerosi. Sembla possible que la hipercolesterolèmia que això comporta, causi un dany a l'endoteli de la paret vascular i que aquest dany pugui induir l'adhesió dels monòcits i la conseqüent quimiotaxi, fets que precedeixen a la formació de la primera lesió ateroscleròtica: l'estria greixosa.

També és sabut que les alteracions oxidatives de les LDL augmenten la seva capacitat d'induir l'aterosclerosi per diverses raons:

- Poden atreure monòcits a l'espai subendotelial i afavorir la seva diferenciació a macròfags.*

- Inhibeixen la mobilitat dels macròfags que queden atrapats a la lesió.*
- Són captades pels monòcits – macròfags que es converteixen en cèl·lules escumoses carregades de greixos.*
- Poden ser tòxiques per les cèl·lules endotelials.*

Tabac

Els estudis epidemiològics han indicat clarament el tabac com un factor de risc per la malaltia cardiovascular. Probablement l'efecte del tabac sigui també produït a través de lesions a la paret vascular. Els mecanismes amb els quals actua el tabac són bàsicament dependents de la nicotina i del monòxid de carboni.

La nicotina pot ser tòxica per ella mateixa o pot implicar l'alliberament de catecolamines que produeixin un dany a l'endoteli. També pot produir un augment en l'adhesió de les plaquetes igual al del monòxid de carboni.

Els fumadors presenten, a més, nivells elevats de colesterol, triglicèrids o VLDL i també nivells més baixos de colesterol HDL. Se sap que el monòxid de carboni pot augmentar el nivell de colesterol en sèrum, ja que inhibeix la seva eliminació al fetge i també el metabolisme dels quilomicrons.

Hipertensió arterial

Com el tabac, la hipertensió arterial actua sinèrgicament amb altres factors en la producció de les lesions ateromatoses, i també pot produir per ella mateixa una proliferació de les cèl·lules musculars llises

de la paret arterial. A més, l'increment de la pressió dins dels vasos afavoreix l'extravasació de proteïnes i plaquetes.

Diabetis

La patogènia de l'aterosclerosi no difereix en els diabètics respecte als que no ho són, però en els primers, els efectes són més severs i apareixen prematurament. A més del paper que la hiperglucèmia pugui tenir en l'aparició d'aterosclerosi, existeixen nombrosos trastorns que freqüentment s'associen a la diabetis i que poden jugar un paper com són els trastorns lipídics, la hipertensió, la obesitat, etc. A més, també és freqüent que els malalts diabètics presentin nivells elevats de VLDL o LDL i nivells baixos de HDL.

L'any 2002, un estudi amb ratolins transgènics per al gen de la *PON1* humà ha demostrat *in vivo* el seu paper antiaterogènic (56). Aquests ratolins presenten nivells més alts d'expressió de la proteïna PON1, nivells més grans d'activitat PON1 en sang i, alhora, les seves HDL tenen una major capacitat de protegir a les LDL de l'oxidació i són menys susceptibles al desenvolupament d'arteriosclerosi induïda per una dieta rica en greixos. Els ratolins en els quals es van observar aquests efectes produïts per la sobreexpressió de PON1 eren de dos tipus diferents: un grup d'animals eren ratolins sense cap altra modificació genètica i alimentats amb una dieta aterogènica, model utilitzat habitualment per estudiar estadis inicials de la lesió ateroescleròtica; l'altre grup de ratolins eren, a més, *knockout* per a l'apolipoproteïna E, model que permet estudiar lesions molt més avançades. En aquest segon grup, el paper protector que la PON1 exerceix sobre l'oxidació de la LDL produeix una disminució en l'expressió de citoquines proinflamàtores com la MCP-1, responsable de la captació dels monòcits a la placa durant la formació de l'estria greixosa. Així doncs, el fet que els ratolins transgènics per al gen *PON1* presentin un menor grau d'arteriosclerosi sembla estar relacionat clarament amb la seva sobreexpressió de l'enzim PON1, i amb la major capacitat de protecció de les seves HDL contra l'oxidació de la LDL que això comporta. Aquest efecte clar porta els autors d'aquest treball a suggerir que la modulació de l'expressió de *PON1* pot ser utilitzada com a possible agent terapèutic per a la prevenció i el tractament de l'arteriosclerosi.

1.6. Paraoxonasa i fetge

L'enzim PON1 es troba predominantment en el plasma i el fetge. Les anàlisis de Northern blot realitzades en teixits humans i de conill han detectat el mRNA de *PON1* exclusivament en el fetge (20), tot i que per un mètode amb més sensibilitat com la transcripció reversa i la reacció en cadena de la polimerasa (RT-PCR) s'ha detectat la presència del mRNA de *PON1* en fetge, ronyó, cor, cervell intestí i pulmons de ratolí (1). Aquests resultats han estat confirmats per immunohistoquímica en teixit de rata (57).

Sembla altament probable que el fetge sigui la principal font de PON1 (589), ja que és l'òrgan on l'expressió del gen *PON1* és més gran i on es sintetitzen una gran part de les HDL que després se secreten a la circulació. Durant l'última dècada hi ha hagut diversos intents de purificar la PON1 hepàtica per tal de poder comparar les seves propietats amb l'enzim del sèrum. Aquests intents s'han vist dificultats pel fet que la PON1 hepàtica és un enzim associat a la membrana de les vesícules derivades del reticle endoplasmàtic (59). L'any 1993 es va publicar el primer mètode per a la purificació parcial de la PON1 en teixit hepàtic de rata (60). Bàsicament, aquest mètode consistia en la preparació de microsomes hepàtics, la solubilització d'aquests amb Tritó X-100, l'adsorció amb hidroxipatita i la cromatografia en DEAE-52 cel·lulosa; s'obtenia un producte purificat 77 vegades. Més tard, Huang et al. (61) van aïllar l'arilesterasa de microsomes hepàtics de ratolí i, finalment, Rodrigo et al. (62) van purificar la PON1 hepàtica de rata el 1997. Ells van aconseguir un producte 415 vegades purificat mitjançant l'adsorció en hidroxipatita, seguida de tres passos de cromatografia que incloïen DEAE-sefarosa, cromatografia d'afinitat i Mono Q HR FPLC. La seqüència N-terminal i dues seqüències internes de 10 aminoàcids de la proteïna purificada mostraven una alta homologia amb les PON1 sèriques de conill i humanes (aproximadament un 70%) i amb la PON1 hepàtica de ratolí (aproximadament un 90%). Estudis posteriors van demostrar tant en humans com en rates, moltes característiques bioquímiques en comú entre les PON1 hepàtiques i els enzims sèrics (pH òptim, afinitat per substrats (k_m), constants cinètiques, inactivació per calor i requeriment de calci) (62-66), suggerien, així, un alt nivell d'identitat entre els dos enzims. Altres línies de recerca també han donat suport a aquesta hipòtesi. Per exemple, Leviev et al. (67) van observar que els individus portadors de l'al·lel L per al polimorfisme *PON1*₅₅ tenien una major expressió del mRNA de *PON1* en fetge i una major activitat PON1 en sèrum que els portadors de l'al·lel M. A més, Feingold et al. (68) van observar una disminució de l'expressió hepàtica del mRNA de *PON1* i de l'activitat PON1 en sèrum relacionada amb la resposta de fase aguda.

Quin és el paper de la PON1 hepàtica? Té aquest enzim alguna funció específicament intracel·lular o només és sintetitzada i emmagatzemada pels hepatòcits per ser associada a les HDL i secretada a la circulació? Fins al moment no hi ha respostes clares per a aquestes preguntes. Alguns estudis han proporcionat informacions evidents que existeixen dos *pools* de PON1 en els hepatòcits (63), i que això es pot interpretar com que una fracció està preparada per ser secretada a la circulació mentre que l'altra es manté dins del fetge i pot desenvolupar una funció intracel·lular. Si considerem que la PON1 associada a les HDL del sèrum desenvolupa un paper antioxidant, sembla lògic pensar que el paper de la PON1 intrahepàtica sigui similar. De fet, els microsomes hepàtics són el lloc majoritari del catabolisme dels xenobiòtics, i en aquestes reaccions es generen una gran quantitat de radicals lliures (69). En un interessant estudi de Rodrigo et al. (57), l'expressió de PON1 en el fetge es va trobar majoritàriament en els hepatòcits localitzats a la regió centrolobular, fet que reforça la hipòtesi de la participació de la PON1 intrahepàtica en la inactivació dels productes d'oxidació.

2.7. Paraoxonasa i malaltia hepàtica

Té la PON1 alguna funció en la fisiopatologia de les malalties hepàtiques? Una altra vegada no tenim respostes clares. Alguns estudis han suggerit que l'increment de la peroxidació lipídica dins de les cèl·lules hepàtiques pot induir la síntesi de col·lagen, inflamació, i apoptosi i necrosi dels hepatòcits (70-75); passos que es troben en la progressió cap a malalties com la cirrosi.

D'altra banda, existeixen molts pocs estudis que mesurin la PON1 en la malaltia hepàtica. En 1977, Burlina et al. (23) van observar que alguns pacients amb cirrosi hepàtica presentaven una menor activitat arilesterasa en sèrum. Aquests autors ja van indicar aleshores que serien de gran interès que nous treballs per valorar la possible utilitat clínica de la mesura de l'activitat arilesterasa en sèrum, per a l'estudi de la funció hepàtica. Més tard, el 1991, Kawai et al. (26) van desenvolupar un ELISA per determinar la concentració d'arilesterasa en sèrum i el van provar en 6 pacients afectats de cirrosi hepàtica. En aquest estudi van observar que aquests pacients presentaven una disminució significativa de la concentració d'arilesterasa, acompanyada d'una disminució en la seva activitat en relació als controls sans. Aquests autors també van proposar l'arilesterasa com un possible nou paràmetre per a l'estudi de la

cirrosi hepàtica. Tot i aquestes primeres evidències, no hi ha hagut, fins a l'actualitat, cap estudi que hagi seguit valorant aquesta hipòtesi.

Cal tenir en compte que les proves bioquímiques de funció hepàtica que s'utilitzen normalment per al diagnòstic i seguiment de les malalties hepàtiques tenen les seves limitacions (Quadre 2). Aquestes proves poden presentar valors anormals en absència de malaltia hepàtica. També ens podem trobar amb una certa freqüència amb pacients amb malalties hepàtiques específiques que presenten valors normals dels tests de funció hepàtica clàssics i, per tant, nivells normals d'aquests paràmetres no poden excloure la malaltia hepàtica. Per aixó, avui en dia, segueix sent interessant l'estudi de nous tests candidats per a l'avaluació d'aquestes malalties.

En relació amb aquest fet, en dos dels estudis presentats en aquesta tesi doctoral el nostre grup ha investigat la possibilitat que la mesura de la PON1 en sèrum pugui ser útil com a índex de funció hepàtica.

Quadre 2.

Eines pel diagnòstic i seguiment de la malaltia hepàtica

La gran varietat de funcions que desenvolupa el fetge impossibilita utilitzar un únic mètode per poder avaluar el seu estat. Existeixen malalties hepàtiques que poden afectar algunes funcions del fetge, mentre que altres funcions es mantenen inalterables i, per aquest motiu, no existeix una bateria de proves universal.

Aminotransferases

Es tracta d'enzims hepàtics que a causa de canvis en la permeabilitat de la membrana dels hepatòcits o de citòlisi, presenten un augment en el seu alliberament a la circulació. Un increment de la seva concentració en sèrum ens indica doncs, un dany hepàtic. Les aminotransferases més útils en el diagnòstic i seguiment de les malalties hepàtiques són l'aspartat aminotransferasa (AST) i l'alanina aminotransferasa (ALT).

La ALT és més específica que la AST per al dany hepàtic, ja que s'expressa de forma predominant en fetge, mentre que la AST es

troba també en altres òrgans com el cor, el múscle esquelètic, el ronyó i el cervell. També cal tenir en compte que existeixen certes malalties no hepàtiques, com per exemple l'infart de miocardi o malalties del múscle esquelètic, en què es poden presentar augments d'aquestes aminotransferases en sèrum; tanmateix, aquestes malalties són fàcilment distingibles, per la seva simptomatologia clínica, de les hepàtiques. A més, en certes hepatopaties cròniques podem trobar nivells de AST i ALT molt poc alterats o fins i tot normals.

Fosfatasa alcalina (FAL)

Es tracta també d'un enzim sèric que és alliberat a la circulació procedent de teixits com el fetge, els ossos, l'intestí o la placenta. En absència d'embaràs o problemes ossis, nivells alts d'aquest enzim solen indicar desordres en el funcionament del tracte biliar. Pacients amb malalties hepàtiques parenquimals com l'hepatitis o la cirrosi, solen presentar increments lleus o moderats d'aquest enzim en sèrum.

Els increments més importants es troben quan existeix una obstrucció biliar extrahepàtica o colèstasi. Finalment, cal tenir en compte també que en un cert nombre de persones aparentment sanes podem trobar nivells de FAL elevats.

γ-glutamilttransferasa (GGT)

Els nivells de GGT en sèrum es correlacionen amb els de FAL de forma directa i és un marcador molt sensible de dany al tracte biliar. Tanmateix, un augment de GGT no és gaire específic ja que certs desordres renals, pancreàtics, cardíacs, pulmonars, la diabetis o l'alcoholisme poden també produir-los. Per aquest motiu la seva utilitat clínica es veu força limitada i, principalment, s'utilitza la GGT per monitoritzar certes patologies hepàtiques ja diagnosticades.

Bilirubina

La bilirubina és un producte de degradació de l'hemoglobina que pot trobar-se en sèrum en dues formes diferents:

- una forma liposoluble que anomenem bilirubina lliure i que viatja cap al fetge, el qual s'encarrega de solubilitzar-la.
- una segona forma, ja conjugada pel fetge i soluble en aigua que anomenem bilirubina esterificada.

La hiperbilirubinèmia en sèrum ens pot indicar diverses anomalies. Si detectem un increment de la concentració de bilirubina lliure en sèrum podem sospitar de problemes en la seva conjugació en el fetge, però també es pot deure a problemes extrahepàtics, com una major producció per una hemòlisi excessiva (p.e. en cas d'anèmia hemolítica). A contrari, si detectem una excessiva concentració de bilirubina esterificada podem pensar en una obstrucció dels conductes biliars. La mesura de la bilirubina en sèrum és útil per valorar d'una forma quantitativa la icterícia, i podem trobar hiperbilirubinèmia fins i tot abans que la icterícia sigui visible. Igual com altres tests bioquímics, els valors de bilirubina en sèrum presenten una gran variabilitat i podem trobar individus amb un mateix diagnòstic de malaltia hepàtica que presentin nivells normals o altament elevats.

Albúmina

L'albúmina és quantitativament la proteïna més important de les que sintetitza el fetge. Una davallada en la seva concentració en sèrum ens indica una disminució de la capacitat neta de síntesi d'aquest òrgan. Tanmateix, la seva vida mitjana és força llarga (entre 14 i 20 dies) i l'intercanvi diari és aproximadament del 5%. Per aquest motiu, la mesura de l'albúmina no és un bon indicador del dany hepàtic lleu o agut, ja que una disminució important de la seva síntesi (50%) comporta concentracions sèriques només lleugerament inferiors a les normals (20%). A més, la seva concentració en sèrum està influenciada per altres factors nutricionals o hormonals.

Factors de coagulació

El fetge sintetitza diversos factors de coagulació (taula 3). En situacions on la seva capacitat de síntesi neta es veu afectada, es produeixen mancances de més d'un factor de coagulació que poden detectar-se fàcilment per un allargament del temps de protrombina (TP). Aquesta determinació consisteix en la mesura del temps que tarda en formar-se el quall en sang total, en presència de tromboplastina i Ca^{++} , i a més, necessita la major part dels factors de coagulació dependents de vitamina K. La mesura individual dels factors implicats no afegeix informació i, per tant, no s'acostuma a utilitzar.

Taula 3.
Factors de coagulació sintetitzats al fetge

Fibrinogen (Factor I)
Protrombina (Factor II)
Factor V
Factor VII
Factor IX
Factor X

El TP depèn, de la presència dels factors de coagulació implicats i, a més, de la capacitat d'absorció intestinal de la vitamina K. Per aquest motiu, aquest TP pot estar augmentat sense que això suposi dany hepàtic, com per exemple en el cas de malabsorció de greixos, insuficiència

pancreàtica, deficiències dietètiques o l'ús d'antibiòtics. A més, també podem trobar-nos amb malalties hepàtiques on es mantingui un TP normal o lleugerament augmentat. Per això, generalment aquesta determinació és més útil pel seguiment o pronòstic dels malalts hepàtics que per al seu diagnòstic.

Biòpsia hepàtica

La biòpsia hepàtica és la tècnica definitiva per definir la malaltia que s'ha sospitat per proves clíniques o bioquímiques. Així, podem aclarir la causa d'una icterícia hepatocel·lular o una hepatomegàlia observades, i també confirmar l'existència de malalties hepàtiques com la cirrosi (Figura 4), esteatosi (Figura 5), hepatitis (Figura 6), cirrosi biliar o hepatocarcinoma (Figura 7). Les aplicacions de la biòpsia hepàtica són clares, però també cal considerar que té algunes possibles contraindicacions (taula 4) i que es tracta d'una tècnica invasiva.

Taula 4.

Aplicacions de la biòpsia hepàtica

Esbrinar la causa d'hepatomegàlia, icterícia, hemorràgia gastrointestinal, funció hepàtica o nivells d'enzims hepàtics alterats

Fer un diagnòstic precís de pacients amb una possible malaltia hepàtica

Reconèixer malalties sistèmiques (i.e. Amiloidosi)

Valorar la resposta al tractament en una malaltia hepàtica crònica o aguda

Contraindicacions de la biòpsia hepàtica

Problemes de coagulació o història recent d'hemorràgia

Diagnòstic clínic d'icterícia posthepàtica

Anèmia greu

Infecció bacteriana a la zona de punció

Figura 4: Cirrosi hepàtica (Tricròmic de Masson, 100X).

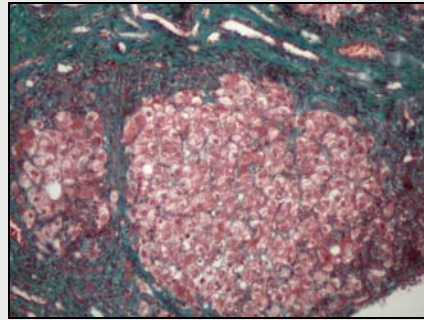


Figura 5: Esteatosi hepàtica (H&E, 200X).

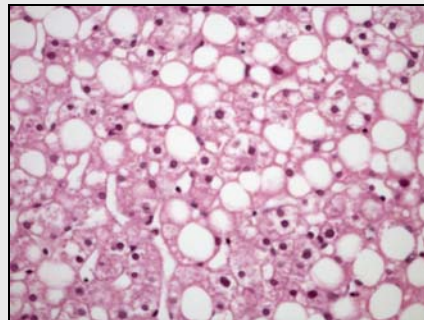


Figura 6: Hepatitis (H&E, 100X).

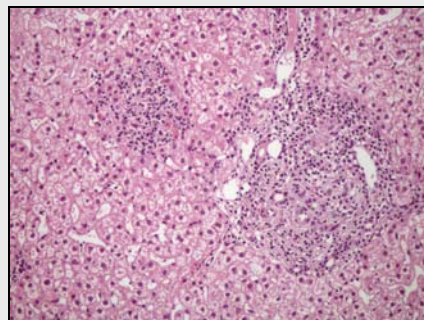


Figura 7: Hepatocarcinoma (H&E, 100X).

