

1. Justificació

A mitjan dels anys noranta, la comunitat científica va començar a estudiar la relació de l'enzim paraoxonasa/arilesterasa (PON1) amb les malalties cardiovasculars. Mentre alguns estudis establien que certes variants genètiques de l'enzim PON1 podrien utilitzar-se com a nous marcadors de risc per aquestes patologies, d'altres no trobaven aquesta associació. Els resultats dels treballs publicats no eren concloents i, per aquest motiu, el nostre grup de recerca es va interessar per l'estudi de la PON1. Fruit d'aquest interès sorgeix el treball que dóna lloc al primer estudi d'aquesta tesi doctoral. Paral·lelament al desenvolupament d'aquest treball, vam establir la hipòtesi que les alteracions funcionals i estructurals del fetge podrien influir en l'activitat PON1 mesurada en sèrum. L'argument que ens va fer arribar a aquesta hipòtesi va ser el fet que la PON1 era un enzim de síntesi quasi exclusivament hepàtica. A més, en alguns treballs publicats durant els anys setanta s'havia observat en petits grups de pacients amb hepatopatia que disminuïa l'activitat PON1 en comparació amb individus sans. Malgrat aquests resultats preliminars, hi havia una manca d'informació sobre els nivells d'activitat paraoxonasa en la malaltia hepàtica. El segon i el tercer treball d'aquesta tesi doctoral investiguen les relacions entre l'activitat de l'enzim PON1 i la malaltia hepàtica en un model animal, i en pacients amb cirrosi hepàtica o hepatitis crònica.

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.

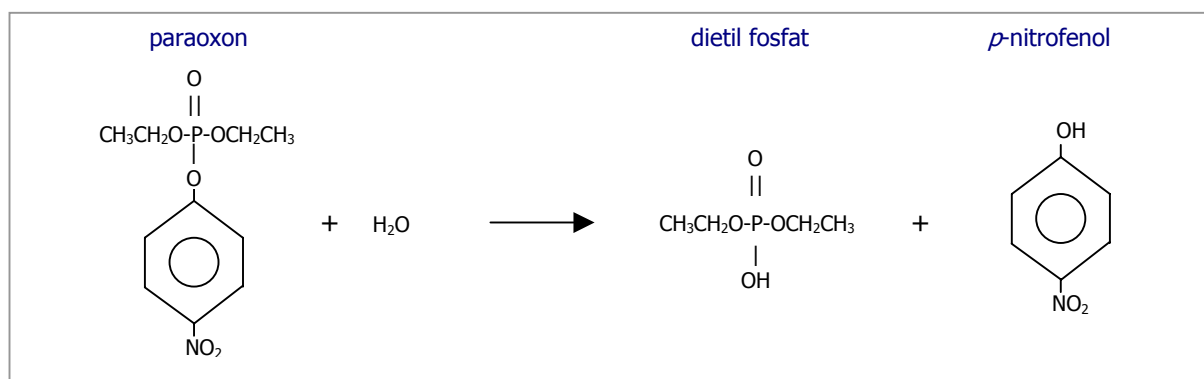
	PON1	PON2	PON3
Presenta activitat paraoxonasa/arilesterasa	Sí	No s'ha observat	Feble
Presenta activitat tiolactonasa	Sí	No s'ha comprovat	Sí
Viatja en sèrum associada a les HDL	Sí	No	Sí
Protegeix la LDL de l'oxidació	Sí	Sí	Sí
S'expressa en:	Fetge	Fetge, ronyó, cervell, etc.	Fetge, placenta, pulmó, testicles,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

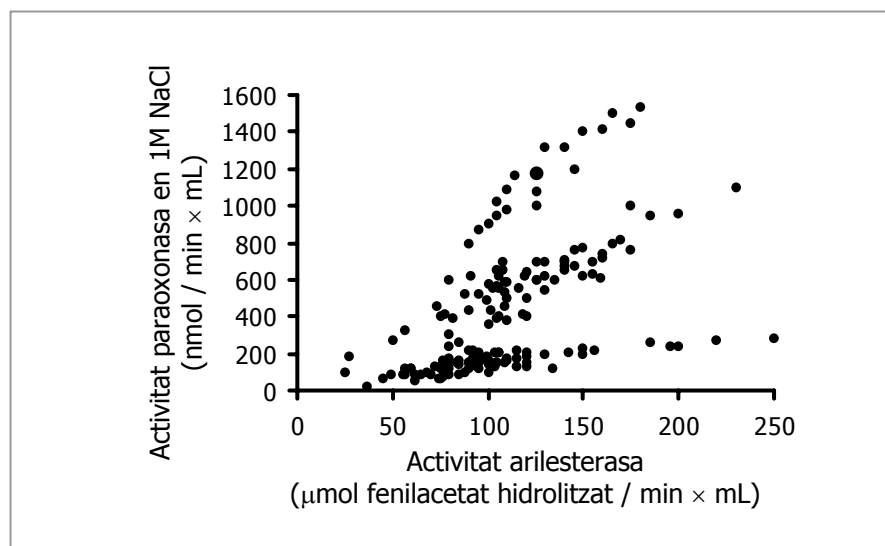
Diversos autors han determinat conjuntament l'activitat i la concentració de la PON1 i n'han calculat l'activitat específica. En termes generals, aquests treballs han mostrat una correlació

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

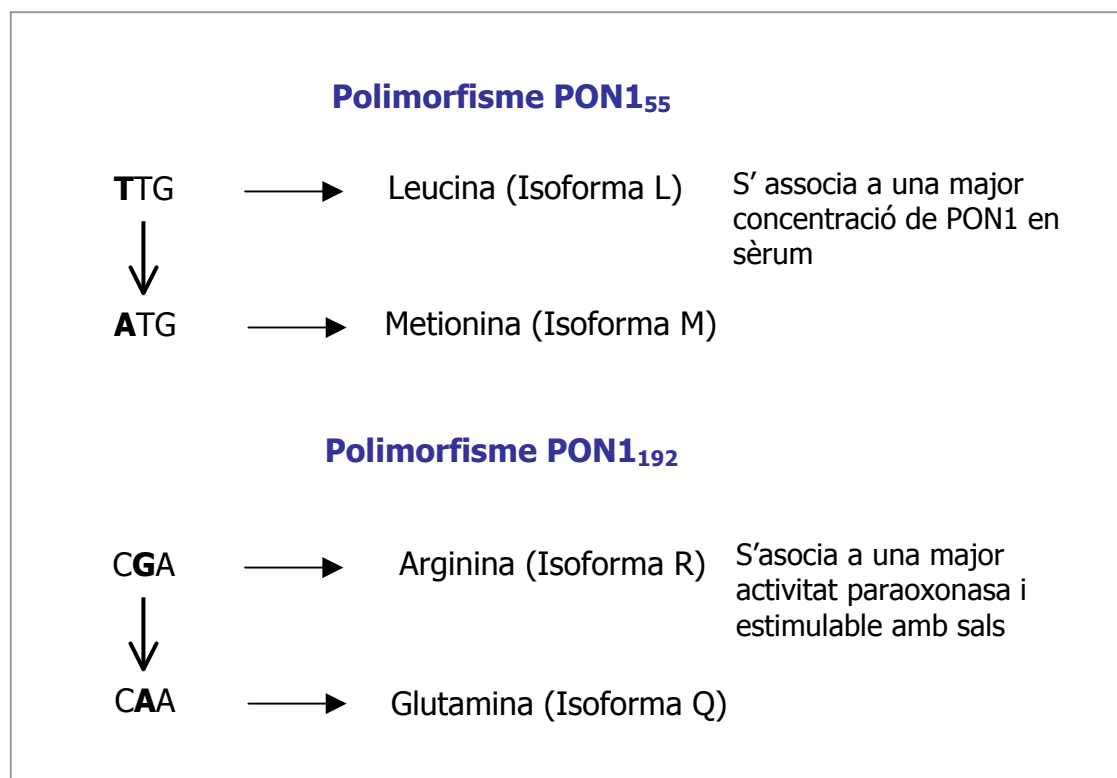
PON1 és un enzim polimòrfic. Playfer et al. (30) van investigar per primera vegada les seves variants genètiques i van concloure que la variabilitat en l'activitat PON1 era determinada per un mateix locus autosòmic amb dos possibles al·lels. El 1983, Eckerson et al. (21,31) van desenvolupar un mètode 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.

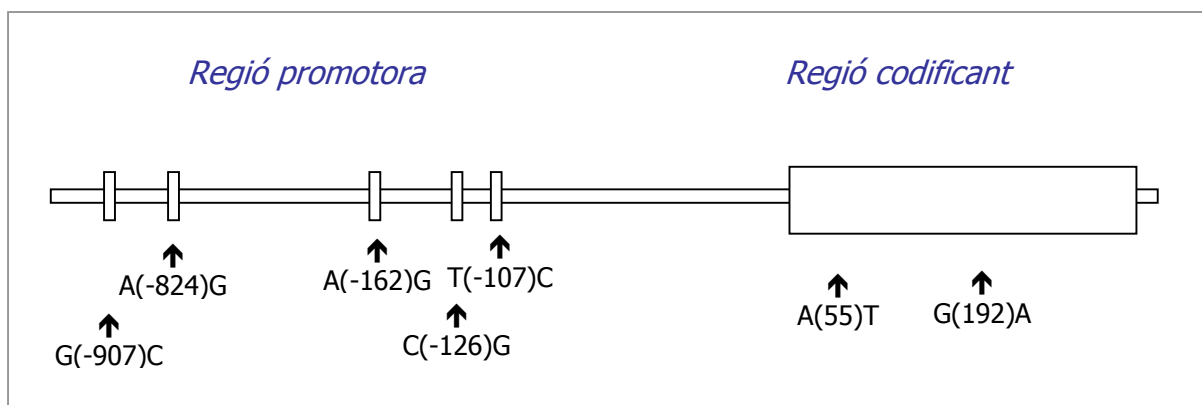
Taula 2: Freqüències genotípiques i al·lèliques per als polimorfismes PON1₁₉₂ i PON1₅₅ trobades en els treballs publicats.

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 inflammatòries 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 proinflamatòries 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 candiadats 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).

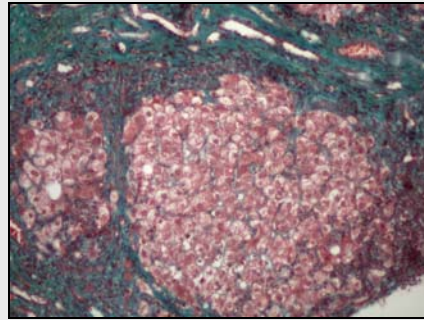


Figura 5: Esteatosi hepàtica (H&E, 200X).

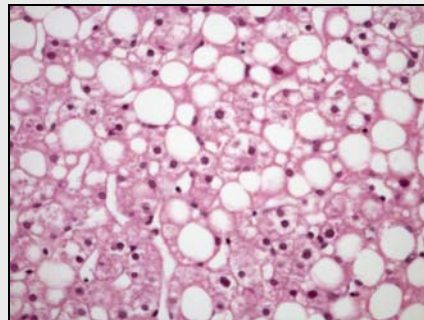


Figura 6: Hepatitis (H&E, 100X).

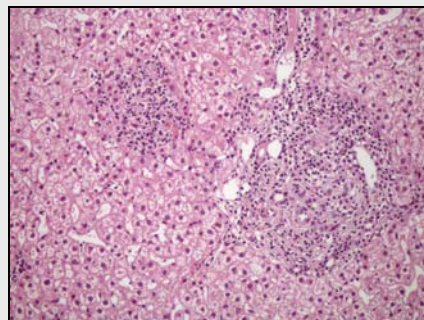
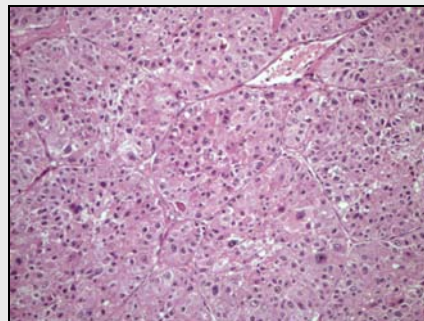


Figura 7: Hepatocarcinoma (H&E, 100X).



Una de les hipòtesis que ens vam plantejar en aquest treball va ser que els polimorfismes PON1₅₅ i PON1₁₉₂ de l'enzim PON1 podrien estar associats a un major risc de malaltia cardiovascular. Aquesta hipòtesi ja l'havien formulat altres autors, que es van basar en dues troballes: d'una banda, es coneixia que l'enzim PON1 era capaç de protegir la LDL de l'oxidació evitant *in vivo* l'acumulació de lipoperòxids en aquesta lipoproteïna i, d'una altra, se sabia que aquesta capacitat podia ser modulada per algun dels polimorfismes del gen *PON1*. Els resultats dels estudis que van explorar aquesta hipòtesi no van ser concloents. Alguns autors van trobar associacions positives entre els polimorfismes PON1₅₅ i PON1₁₉₂ i la malaltia cardiovascular (33,46-49) mentre altres no van trobar aquestes associacions (53,54). Com que els resultats dels textos publicats es contradieien i faltaven dades sobre la població mediterrània, la qual gaudeix de la incidència més baixa de malaltia cardiovascular dins de les societats occidentals, el nostre grup va voler investigar aquesta possibilitat en la nostra població. Així doncs, el primer estudi d'aquesta tesi es va plantejar l'objectiu següent:

- ✓ Valorar si els polimorfismes PON1₅₅ i PON1₁₉₂ de l'enzim PON1 o la seva expressió fenotípica estan associats a la incidència d'infart de miocardi en una població mediterrània.

La segona hipòtesi que ens vam plantejar va ser el fet que les alteracions funcionals i estructurals del fetge podrien influir en l'activitat PON1 mesurada en sèrum, ja que aquest enzim presentava una expressió quasi exclusivament hepàtica. A més, considerant que en certes patologies hepàtiques s'incrementa la peroxidació lipídica, no volíem rebutjar la hipòtesi que l'enzim PON1 pogués tenir alguna funció en la fisiopatologia d'aquestes malalties. El segon i tercer treballs d'aquesta tesi investiguen aquestes hipòtesis en un model animal utilitzat per estudiar la cirrosi hepàtica i també en pacients amb hepatopatia crònica. Els objectius d'aquests dos treballs van ser els següents:

Estudi 2:

- ✓ Investigar la relació entre l'activitat PON1 en microsomes hepàtics, la peroxidació lipídica i el progrés de la malaltia en rates amb cirrosi hepàtica induïda per CCl₄.

Estudi 3:

- ✓ Investigar la relació entre l'activitat PON1 en sèrum i el grau de lesió hepàtica en pacients amb malaltia hepàtica crònica.
- ✓ Investigar la influència de la variabilitat genètica de PON1 en la seva activitat, en el sèrum d'aquests pacients.
- ✓ Investigar l'eficàcia de la mesura de l'activitat PON1 en sèrum, sola o en combinació amb els tests bioquímics habituals, en la valoració de la malaltia hepàtica crònica.

4.1. Dissenys experimentals

Estudi 1

L'estudi es va realitzar en 215 pacients homes que havien patit un infart de miocardi. Per escollir els participants es van utilitzar els criteris de selecció de l'Organització Mundial de la Salut. Els pacients es van reclutar al Servei de Medicina Interna de l'Hospital Universitari Sant Joan de Reus i a la Unitat de Medicina Interna de l'Hospital Joan XXIII de Tarragona. Les mostres de sang van ser recollides entre 3 i 4 mesos després de l'últim episodi agut.

Tots els procediments van estar d'acord amb els requeriments ètics de l'Hospital Universitari Sant Joan de Reus i l'Hospital Joan XXIII de Tarragona.

Com a grup control es van utilitzar 215 homes sans, procedents de revisions mèdiques rutinàries de diverses companyies de la mateixa àrea geogràfica i sense cap evidència clínica de malaltia cardiovascular. Aquests controls es van aparellar per edat (± 5 anys) i índex de massa corporal (± 1.5) amb els pacients.

Es va fer una revisió física a tots els participants, abans de començar l'estudi, per valorar el seu estat de salut general. En aquesta revisió es va valorar l'existència de diabetis, hipertensió, tabaquisme i també es va mesurar el pes i l'alçada de cadascú per calcular l'índex de massa corporal.

Es va realitzar una extracció sanguínia de cadascun dels participants després d'un dejuni de 8 hores i es van processar les mostres per obtenir-ne sèrum i ADN.

El sèrum es va guardar a -70°C immediatament després d'obtenir-se i, més tard, s'hi van determinar:

- ✓ Les activitats paraoxonasa i arilesterasa.
- ✓ Les concentracions de colesterol total, triglicèrids i colesterol HDL mitjançant mètodes enzimàtics (ITC Diagnòstics, Barcelona, Espanya).
- ✓ Les concentracions d'apolipoproteïna (apo) A-I i apolipoproteïna (apo) B per immunoturbidimetria (Biokit, Barcelona, Espanya).

L'ADN genòmic es va obtenir a partir dels leucòcits i es van analitzar els polimorfismes PON1₁₅₅ i PON1₁₉₂ del gen *PON1* mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) i posterior restricció enzimàtica.

Estudi 2

Estudi *in vivo*

L'estudi es va dur a terme en 120 rates Wistar, mascles i adultes (Panlab, Barcelona, Espanya). Els animals es van establir una setmana abans de començar l'experiment sota condicions estàndard de llum i temperatura (cicle de llum/fosc de 12 hores i 22 °C).

La meitat d'aquests animals (n=60) es van sotmetre a un protocol d'inducció de cirrosi hepàtica mitjançant l'administració intraperitoneal de CCl₄ i l'altra meitat van constituir el grup control. La inducció de cirrosi hepàtica va consistir en dues injeccions intraperitoneals de CCl₄ setmanals amb un interval de 4 dies i a una dosi de 0.5 mL de CCl₄/kg de pes dissolt 1:1 en oli vegetal (76). Els animals control van rebre només oli vegetal en la mateixa dosi que les rates tractades.

Al començament de l'estudi els animals es van dividir en quatre grups segons el tractament i la dieta rebuda. Els grups resultants van ser els següents:

- **Grup A:** Rates control (n=30). Alimentades *ad libitum* amb una dieta estàndard que contenia un 60% de carbohidrats, un 25% de proteïnes, un 3% de greix i un 12% de sals i fibres (Purina Chow A03, Panlab, Barcelona, Espanya).
- **Grup B:** Rates control (n=30). Alimentades amb una dieta estàndard com el grup A i un suplement de zinc (227 mg/L de ZnSO₄) dissolt a l'aigua de beguda.
- **Grup C:** Rates tractades amb CCl₄ (n=30). Alimentades amb una dieta estàndard com el grup A.
- **Grup D:** Rates tractades amb CCl₄ (n=30). Alimentades amb una dieta estàndard més un suplement de zinc al igual que el grup B.

Subgrups de 10 animals de cadascun d'aquests grups es van sacrificar per dessagnació sota anestèsia a les setmanes 1, 5 i 7 de tractament. La figura 9 mostra un esquema del processament de les mostres biològiques. Es va extreure sang de la vena cava inferior, es va centrifugar a 1000 g durant 10 min i es va congelar el sèrum alíquotat a -70°C per a determinar-hi posteriorment l'activitat alanina aminotransferasa (ALT).

El fetge es va extreure, pesar i fraccionar en petites porcions (aproximadament d'uns 200 mm^3) que es van processar de la forma següent:

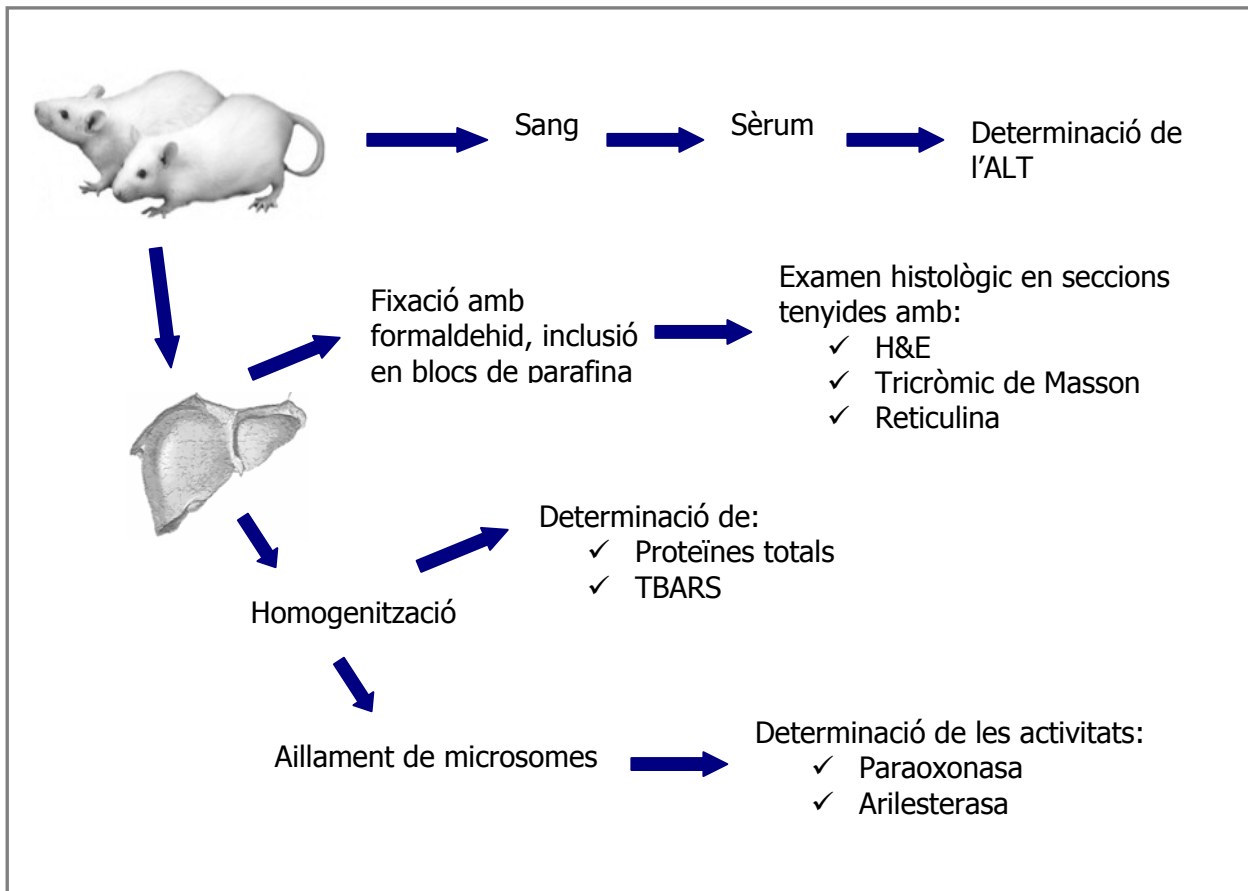
- ✓ Unes porcions es van fixar immediatament amb formaldehid 4%, es van embeure en parafina i es van incloure en blocs. Posteriorment es va realitzar un examen histològic amb seccions tenyides amb hematoxilina-eosina (H&E), tricròmic de Masson i reticulina.
- ✓ Una part es va homogenitzar al 10% (p/v) amb tampó Tris-HCl 50 mM, KCl 150 mM (pH=7.4) amb un homogeneitzador Potter-Elvehem i un èmbol de teflò. En aquest homogenat es va determinar la concentració de proteïnes mitjançant la tècnica colorimètrica del vermell de Pirogalol (ITC Diagnostics, Barcelona, Espanya). També es va mesurar en l'homogenat hepàtic la producció de lipoperòxids (bàsicament malonildialdehid (MDA)) mitjançant la tècnica de les substàncies reactives a l'àcid tiobarbitúric (TBARS). Part de l'homogenat es van utilitzar per obtenir la fracció microsomal que es va guardar a -80°C per determinar l'activitat paraoxonasa i arilesterasa.

Estudi *in vitro*

Per tal d'investigar la possibilitat d'un efecte directe del CCl_4 i el MDA en la inhibició de l'activitat PON1 microsomal es va dissenyar el següent experiment:

Microsomes hepàtics obtinguts a partir del fetge d'una rata control es van incubar durant 30 min a 37°C en presència de CCl_4 (9, 27 i 81 mM) o de MDA (15, 45 i 135 μM). Posteriorment es va determinar l'activitat PON1. El medi d'incubació contenia 5 mM Tris, 0.1 mM ATP, 0.1 mM NADPH i un sistema regenerador de NADPH que consistia en 1 mM de glucosa-6P, 2 U de glucosa-6P-deshidrogenasa i 120 mM de KCl. Tots els experiments es van fer per triplicat.

Figura 9: Esquema del processament de les mostres biològiques del protocol *in vivo* de l'estudi 2.



Estudi 3

Aquest estudi es va realitzar amb una mostra de 175 pacients amb patologia hepàtica crònica recollits del dispensari clínic de l'Hospital Universitari Sant Joan de Reus. L'estudi va incloure 68 pacients amb cirrosi hepàtica (42 homes i 26 dones; edat: 60 ± 10 anys) i 107 pacients amb hepatitis crònica (69 homes i 38 dones; edat: 46 ± 14 anys). L'hepatitis crònica va ser diagnosticada per biòpsia hepàtica i en un 73% dels casos era secundària a la infecció del virus de l'hepatitis C. La cirrosi hepàtica es va diagnosticar en funció de les evidències clíniques, que incloïen l'esplenomegàlia i la dilatació de les venes portals avaluades per ecografia, i la presència de varius esofàgiques detectada per fibrogastrosccòpia.

El grup de control va consistir en 368 voluntaris sans que participaven en un estudi epidemiològic que es duia a terme en la nostra regió i que es correspon amb l'acrònim d'HOMFOL. Els participants (182 homes i 186 dones; edat: 42 ± 15 anys) eren ostensiblement sans i sense evidències clíniques o analítiques de diabetis, neoplàsia, malaltia renal, dany hepàtic o malaltia cardiovascular.

Es va realitzar una extracció sanguínia de cadascun dels participants després d'un dejuni de 8 hores i es van processar les mostres per obtenir-ne sèrum i ADN.

El sèrum es va guardar immediatament després d'obtenir-se a -70°C i més tard s'hi va determinar:

- ✓ L'activitat paraoxonasa
- ✓ Les activitats alanina aminotransferasa (ALT), γ -glutamil transferasa (GGT) i fosfatasa alcalina (FAL) mitjançant mètodes enzimàtics (ITC Diagnostics, Barcelona, Espanya).
- ✓ Les concentracions de proteïnes totals, albúmina i bilirrubina mitjançant mètodes enzimàtics (ITC Diagnostics, barcelona, Espanya).

L'ADN genòmic es va obtenir a partir dels leucòcits i es van analitzar els polimorfismes PON1₅₅ i PON1₁₉₂ del gen *PON1* mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) i posterior restricció enzimàtica en tots els participants.

4.2. Mètodes

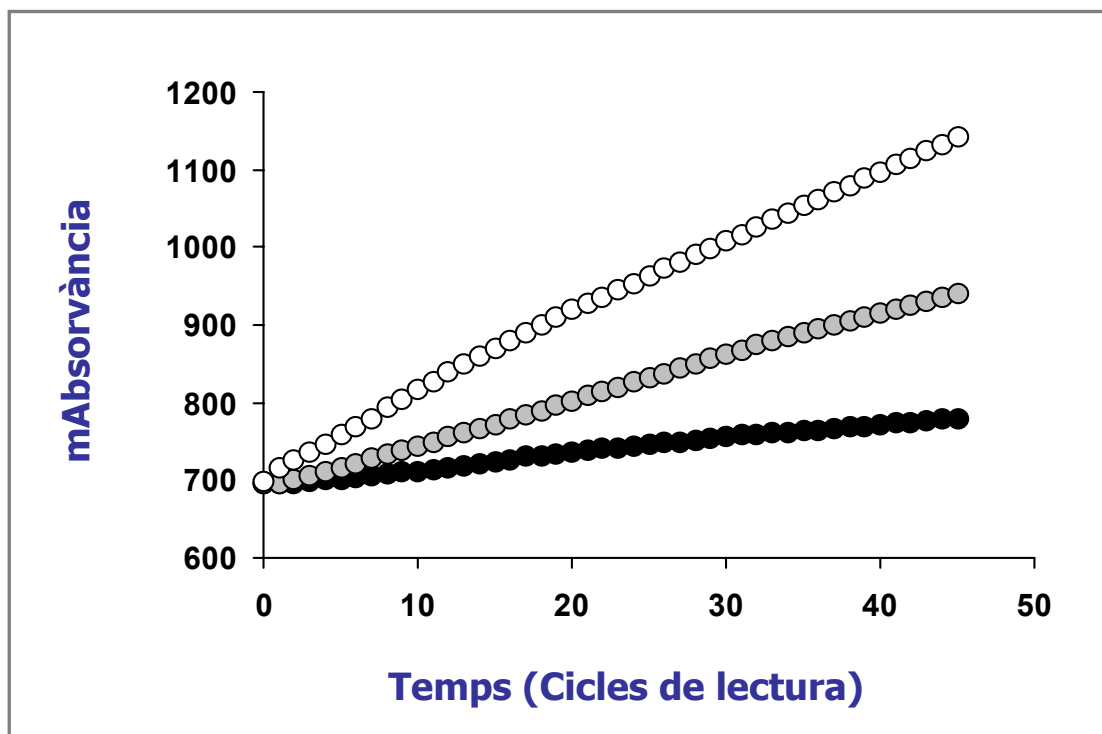
Determinació de l'activitat paraoxonasa

Aquesta determinació es va fer mitjançant l'adaptació automàtica d'un assaig descrit prèviament (31). L'activitat PON1 es va mesurar sense presència de clorur sòdic addicional (activitat basal) i en presència d'1 M de NaCl en el tampó d'assaig (activitat estimulada amb sal). El tampó de reacció contenia 1 mM de paraoxon >96% de puresa (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), i 1mM de CaCl₂ en 0.05 M de tampó glicina (pH=10.5). El coeficient d'extinció molar del paraoxon a 410 nm és de 16900. Els assaigs es van realitzar en un analitzador automàtic Shimadzu 7200 (Instrumentation Laboratories, Milà, Itàlia) on 8 μL de

mostra es van barrejar amb 250 μL de tampó i es va mesurar la hidròlisi del paraoxon mitjançant la lectura de l'increment de l'absorbància a 410 nm i 37°C. L'absorbància del blanc no va ser mai més gran de 0.700. L'activitat paraoxonasa es va expressar en U/mL. Els coeficients de variació interassaig i intraassaig van ser de $< 8\%$ i $< 6\%$ respectivament.

La figura 10 mostra la cinètica de la reacció en tres mostres amb diferent activitat PON1 basal.

Figura 10: Cinètica de reacció de la mesura de l'activitat paraoxonasa basal en tres mostres corresponents als genotips QQ (punts negres), QR (punts grisos) i RR (punts blancs) per al polimorfisme PON1₁₉₂.



Determinació de l'activitat arilesterasa

La determinació de l'activitat arilesterasa es va realitzar mesurant la hidròlisi de fenilacetat en un espectrofotòmetre UVIKON 922 Kontron (Kontron Instruments, Zurich, Suïssa), monitoritzant l'increment d'absorbància a 270 nm i 25°C (30). En resum: 5 μL de mostra es van dissoldre en 3 mL de tampó de reacció (dilució 1:601) que contenia 1 mM de fenilacetat, 9 mM de Tris/HCl pH=8 i 0.9 mM de CaCl_2 . Es va mesurar l'absorbància cada 6 s i es va calcular l'increment entre els 30 s i els 90 s. Es va restar l'absorbància del blanc en cada

mostra. El coeficient d'extinció molar del fenilacetat a 270 nm era de 1310. L'activitat arilesterasa es va expressar en KU/mL.

Determinació dels polimorfismes PON1₅₅ i PON1₁₉₂ del gen *PON1*

L'ADN genòmic es va obtenir a partir dels leucòcits després de l'hemòlisi de sang total (Puregene DNA Isolation Kit, Gentra, Mineapolis, MN) i es van analitzar els polimorfismes PON1₅₅ i PON1₁₉₂ del gen *PON1* mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) i la posterior restricció enzimàtica. Els oligonucleòtids encebadors utilitzats es mostren a la taula 5.

Taula 5: Oligonucleòtids encebadors utilitzats per amplificar les regions dels polimorfismes PON1₅₅ i PON1₁₉₂.

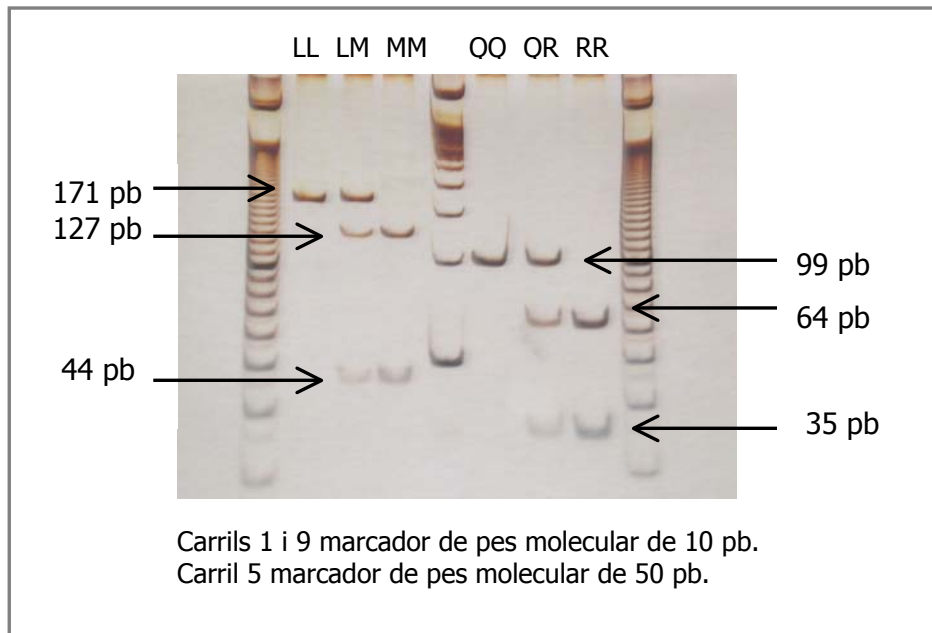
	Polimorfisme PON1 ₅₅	Polimorfisme PON1 ₁₉₂
Oligonucleòtid <i>sense:</i>	5'-gAAgAgTgATGTATAgCCCCAg-3'	5'-TATTgTTgCTgTggggACCTgAg-3'
Oligonucleòtid <i>antisense:</i>	5'-TTTAATCCAgAgCTAATgAAAgCC-3'	5'-CACgCTAAACCCAAATACATCTC-3'

El programa d'amplificació utilitzat va ser el següent:

94° C	90 s
<hr/>	
35 cicles de:	
94° C	30 s
61° C	30 s
72° C	30 s
<hr/>	
72° C	6 min
15° C	∞

Els productes de PCR obtinguts de 171 pb per al polimorfisme PON1₅₅ i 99 pb per al polimorfisme PON1₁₉₂, es van digerir amb els enzims de restricció *NlaIII* i *AlwI* respectivament, es van separar en gels de poliacrilamida del 12% i els patrons de bandes es van visualitzar després de tenyir-se amb nitrats de plata. A la figura 11 podem observar els resultats dels patrons de bandes característics per als diferents genotips d'aquests polimorfismes. La lectura dels gels i la interpretació dels genotips la van fer dues persones per separat que, a més, desconeixien el grup al qual pertanyien les mostres.

Figura 11: Gel de poliacrilamida al 12% tenyit amb nitrat de plata amb el patró de bandes característic de cadascun dels genotips possibles per als polimorfismes PON1₅₅ i PON1₁₉₂.



Aïllament de microsomes hepàtics

Es va obtenir la fracció microsomal a partir de 10 mL d'homogenat hepàtic per ultracentrifugació en una ultracentrifuga Kontron (Kontron Instruments, Zurich, Suïssa) equipada amb un rotor TFT 45.6. El procediment utilitzat es resumeix en el quadre 3.

Quadre 3.

Procediment d'aïllament de microsomes hepàtics:

- Centrifugar l'homogenat a 11000 g 15 min a 4°C.
- Recuperar el sobrenedant i centrifugar-lo a 105000 g durant una hora.
- Resuspendre el precipitat amb tampó KCl 0.154 M, Tris-HCl 50 mM (pH 7.4) i tornar-lo a centrifugar a 105000 g durant 15 min a 4°C.
- Descartar el sobrenedant i resuspendre el precipitat amb un mínim volum de NaCl 0.9%.

Determinació de la peroxidació lipídica

La peroxidació lipídica es va valorar en homogenats hepàtics mitjançant la determinació de substàncies reactives a l'àcid tiobarbitúric (TBARS) per espectrofotometria directa (69), tal

com s'indica en el quadre 4. És conegut que aquesta tècnica presenta una molt bona correlació amb la determinació realitzada per HPLC en rates tractades amb CCl_4 (77).

Quadre 4.

Procediment determinació de TBARS:

- Barrejar 0.3 mL d'homogenat hepàtic al 10% (p/v) amb 4 mL de H_2SO_4 12 N i 0.5 mL d'àcid fosfotúngstic 10% i agitar amb el vòrtex. Incubar 5 min a temperatura ambient.
- Centrifugar a 3000 rpm durant 10 min i descartar el sobrenedant.
- Resuspendre el precipitat amb 2 mL de H_2SO_4 12 N. Afegir-hi 0.3 mL d'àcid fosfotúngstic i homogeneïtzar amb el vòrtex.
- Centrifugar a 3000 rpm durant 10 min i descartar el sobrenedant.
- Resuspendre el precipitat amb 4 mL aigua i afegir-hi 1 mL de reactiu TBA (àcid tiobarbitúric 67% barrejat 1:1 amb àcid acètic glacial). Agitar-ho amb el vòrtex.
- Incubar en un bany d'aigua a 100°C durant una hora.
- Deixar refredar i centrifugar a 3000 rpm durant 10 min a 4°C.
- Recollir el sobrenedant i llegir-ne l'absorbància a 532 nm.

Per extrapolar la concentració de TBARS de la mostra problema es va fer una recta patró amb una solució de 1,1,3,3-tetraetoxipropà a 5 nmol/mL. Les concentracions es van obtenir amb el següent càlcul :

$$[] \text{ nmol / mL mostra} = 5 \times (\text{Abs. Mostra/Abs. Estàndard}) \times 1/0.3$$

Es va tenir en compte el pas d'homogeneïtzació per expressar la concentració de lipoperòxids per grams de teixit fresc i calcular la concentració de proteïnes totals en la mostra inicial per tal d'expressar la concentració per grams de proteïna.

Exàmen histològic de les mostres hepàtiques

Els fetges dels animals inclosos en l'estudi 2 van ser analitzats histològicament. Després de fixar-los amb formaldehid al 4% i d'incloure'ls en blocs de parafina, es van fer seccions de 4 μm que es van tenyir amb les tècniques d'hematoxilina-eosina (Quadre 5), tricròmic de Masson (Quadre 6) i reticulina (Quadre 7).

Les seccions tenyides amb H & E ens van permetre observar una visió histològica del conjunt de l'estructura del teixit o de l'arquitectura de la lesió.

El tenyiment amb tricròmic de Masson es va utilitzar per observar les fibres de col·lagen (bàsicament de tipus I) que es tenyeixen específicament.

Es va realitzar un tenyiment específic per visualitzar la trama de reticulina. Aquesta estructura presenta un col·lapse en la cirrosi hepàtica que permet observar els nòduls de regeneració.

Quadre 5.

Tenyiment hematoxilina-eosina:

- Desparafinar i hidratar.
- Tenyir 6 min amb hematoxilina de Harris.
- Rentar amb aigua corrent uns 5 min.
- Rentar amb aigua destil·lada.
- Tenyir 20 s amb eosina.
- Rentar amb aigua destil·lada.
- Deshidratar i muntar.

Quadre 6.

Tenyiment tricròmic de Masson:

- Desparafinar i hidratar.
- Fixar amb Bouin al microones a la mínima potència durant 5 min.
- Deixar refredar.
- Rentar amb aigua corrent fins que perdi el clor groc.
- Tenyir amb hematoxilina fèrrica de Weigert durant 10 min.
- Rentar amb aigua corrent i després amb aigua destil·lada.
- Tenyir amb tricròmic de Masson durant 13 min.
- Rentar amb aigua acètica al 0.5 % submergeint els portaobjectes 2 o 3 vegades (màxim 20 s).
- Rentar amb aigua corrent i després amb aigua destil·lada.
- Tenyir 7 s amb verd llum.
- Rentar amb aigua corrent.
- Deshidratar i muntar.

Quadre 7.

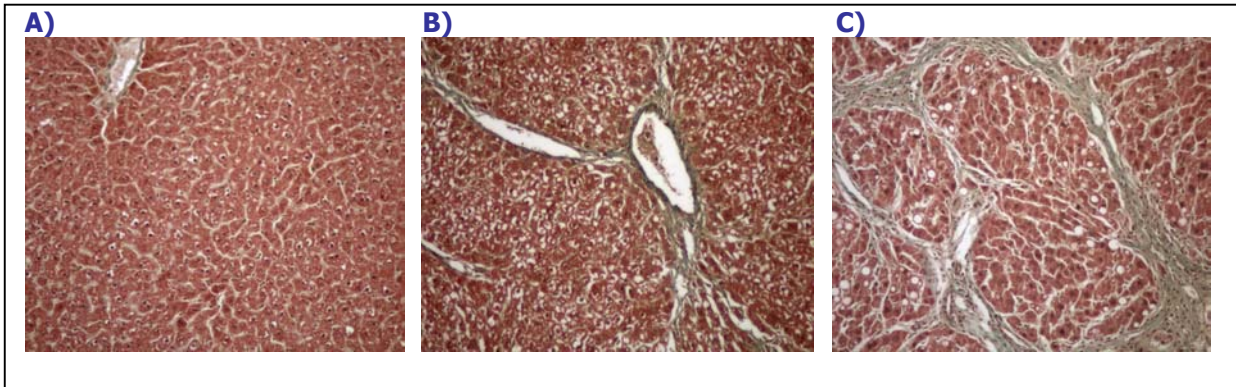
Tenyiment de reticulina:

- Desparafinar i hidratar.
- Fixar amb permanganat potàssic al 0.25% durant 5 min.
- Rentar amb aigua destil·lada uns 5 min.
- Incubar amb àcid oxàlic al 5% durant 3 min.
- Rentar amb aigua corrent i després amb aigua destil·lada.
- Tenyir 10 min amb plata amoniaca preparada en fresc. Breument: es barregen 0.5 mL d'amoniac pur amb 1 mL d'aigua destil·lada i després afegim gota a gota una solució de nitrat de plata al 10% fins que la solució agafi un aspecte tèrbol. Aleshores enrasar a 30 mL amb aigua destil·lada.
- Rentar amb aigua destil·lada.
- Fixar en formol a l'1% durant 5 min.
- Rentar amb aigua destil·lada.
- Tenyir amb clorur d'or a l'1% durant 5 min.
- Rentar amb aigua destil·lada.
- Incubar 2 min amb hiposulfit de sodi al 5%.
- Rentar amb aigua corrent.
- Tenyir amb eosina durant 24 s.
- Deshidratar i muntar.

Un patòleg, que desconeixia el grup de procedència de les mostres, va fer l'examen histològic de les seccions tenyides. Es van diferenciar tres categories:

- ✓ **Fetge normal** (Figura 12,a).
- ✓ **Fibrosi hepàtica:** Fetge amb un increment de l'acumulació hepàtica de col·lagen i formació més o menys important de septes fibrosos, però sense arribar a formar nòduls de regeneració (Figura 12,b).
- ✓ **Cirrosi hepàtica:** Fetge amb fibrosi i formació de septes fibrosos que delimiten nòduls de regeneració i, per tant, distorsionen àmpliament l'arquitectura i funcionalitat hepàtica (Figura 12,c).

Figura 12: Seccions de fetge tenyides amb tricròmic de Masson (100X), que es corresponen amb els diagnòstics de fetge normal (a), fibrosi hepàtica (b) i cirrosi hepàtica (c).



4.3. Anàlisi estadística

Totes les dades van ser analitzades amb el paquet estadístic SPSS/PC+ 10.0 i el programa Epi Info (CDC).

Es va aplicar el test de la Z de *Kolmogorov-Smirnov* per determinar si les variables presentaven una distribució normal. Les diferències entre grups es van analitzar amb la t de *Student* (test paramètric) o la U de *Mann-Whitney* (test no-paramètric). En alguns casos es va fer una transformació logarítmica de les variables que no presentaven una distribució normal.

Per comprovar el compliment de l'equilibri de *Hardy-Weinberg* i per analitzar les distribucions al·lèliques i genotípiques de pacients i controls es va utilitzar el test de la χ^2 .

Per valorar el grau d'associació de diverses variables amb la malaltia cardiovascular es va calcular l'Odds Ratio (OR).

El grau d'associació entre dues variables es va valorar amb el coeficient de correlació de *Pearson*.

Es va fer una anàlisi múltiple de la variança (MANOVA) per observar l'efecte de diverses variables en l'activitat PON1.

L'eficàcia diagnòstica de l'activitat PON1 i altres variables bioquímiques es va avaluar mitjançant l'anàlisi de corbes Receiver-Operating Characteristics (ROC) (78,79).

Es va fer una regressió logística múltiple per estimar la capacitat d'un grup de variables en predir la presència/absència de malaltia hepàtica.

Els resultats es van expressar com a mitjanes i desviacions estàndard. El grau de significació mínima es va establir en $p < 0.05$ en cadascun dels tests.

6.1. Discussió general

En el primer estudi d'aquesta tesi, ens vam plantejar valorar si els polimorfismes PON1₅₅ i PON1₁₉₂ de l'enzim PON1 o la seva expressió fenotípica estaven associats a la incidència d'infart de miocardi. Els resultats obtinguts amb relació als polimorfismes no van mostrar aquesta associació, ja que les distribucions genotípiques i al·lèliques del grup de pacients supervivents d'un infart de miocardi i del grup de controls sans no van ser diferents. No obstant això, es va observar una disminució significativa de l'activitat paraoxonasa de l'enzim PON1 en el grup de pacients i l'anàlisi estadística que valora la potència d'associació d'aquesta variable amb la presència d'infart de miocardi va mostrar un odds ratio (OR) de 2.85 per a l'activitat paraoxonasa basal i de 2.45 per a l'activitat paraoxonasa estimulada. Així doncs, sembla que existeixi certa associació entre l'activitat paraoxonasa de PON1 i l'infart de miocardi. De fet, alguns autors ja havien apuntat que la relació entre la malaltia cardiovascular i l'enzim PON1 podria deure's a diferències en la expressió fenotípica més que a diferències en les distribucions genotípiques entre casos i controls (80). És clar que aquesta expressió està determinada en part per les variants genètiques, però també s'han de considerar altres factors que puguin afectar-la, un dels quals podria ser la dieta. Shih et al. (81) van demostrar que la dieta aterogènica rica en greixos feia disminuir l'expressió de *PON1* al fetge de forma paral·lela al desenvolupament de les lesions ateroscleròtiques en ratolins susceptibles. Altres autors han observat que els fosfolípids oxidats disminueixen l'expressió de *PON1* en cèl·lules HepG2 *in vitro* (82) i, també, que l'activitat postprandial de l'enzim PON1 es veu reduïda després d'una ingesta rica en greixos cuinats (83). Amb relació amb la dieta, recentment Jarvik et al. (84) van trobar que la ingesta de vitamina C i E es correlacionava de forma positiva amb l'activitat paraoxonasa de PON1.

Malgrat tot, en el nostre estudi els factors de risc ja coneguts van presentar una associació amb la incidència d'infart de miocardi molt més gran que l'activitat PON1, com per exemple la hipertensió (OR=5.12), l'hàbit de fumar (OR=3.99) o el colesterol HDL (OR=3.89). La suma d'aquests tres factors convencionals més el colesterol total (OR=2.24) va ser capaç d'explicar el 56% del risc d'infart de miocardi. A més, l'anàlisi multivariant d'aquests factors va deixar sense significació estadística l'activitat PON1 i va mostrar que la seva associació no era independent d'altres factors.

Una possible explicació per a la discrepància de resultats que es troba en les publicacions respecte a l'associació dels polimorfismes PON1₅₅ i PON1₁₉₂ de l'enzim PON1 i la malaltia cardiovascular pot ser la selecció de pacients diferent de cada estudi. Gran part dels estudis que han obtingut resultats d'associació positius estaven realitzats amb pacients diabètics i podria ser que l'efecte diferencial de les variants genètiques del gen *PON1* només fos evident en situacions amb un estrès oxidatiu elevat o amb altres factors de risc addicionals.

Els resultats obtinguts en el segon i tercer estudis d'aquesta tesi demostren que altres patologies, a més de la malaltia cardiovascular, també estan associades a una disminució de l'activitat de l'enzim PON1. Concretament, hem mostrat, tant en un model animal com en pacients, que en malalties hepàtiques com la cirrosi o l'hepatitis crònica es redueix l'activitat de la PON1.

En l'estudi realitzat en rates amb cirrosi induïda per CCl₄ hem observat una disminució de l'activitat PON1 en microsomes hepàtics paral·lela a l'increment de la peroxidació lipídica i al desenvolupament de la malaltia. A més, el conegut efecte protector que el zinc exerceix en aquest model experimental va anar acompanyat d'una normalització en l'activitat PON1 microsomal. Els motius d'aquesta reducció en l'activitat de la PON1 podrien anar lligats en part a la toxicitat hepàtica, ja que reproduïxen els canvis en la concentració microsomal de proteïnes totals. Tot i així, hi ha indicis que es produeix una inhibició més específica de la PON1, perquè la disminució de l'activitat d'aquest enzim és més gran que la de les proteïnes totals i també hem observat una reducció de la ràtio paraoxonasa/arilesterasa. A més, la inhibició de l'activitat no sembla causada per un efecte directe dels productes de la peroxidació lipídica sobre la PON1, ja que un experiment *in vitro* on s'incubaven microsomes hepàtics amb concentracions creixents de CCl₄ o MDA (principal producte de la lipoperoxidació en aquest model) no va mostrar cap efecte d'aquests compostos sobre l'activitat. El paper fisiopatològic que pot tenir l'enzim PON1 en el desenvolupament del dany hepàtic no pot deduir-se de les investigacions presents. Tanmateix, considerant que la PON1 és capaç d'hidrolitzar hidroperòxids i fosfolípids oxidats presents a la LDL, i que en aquest model el dany hepàtic es produeix precisament per un increment en la producció de radicals lliures, suggerim que aquest enzim pot jugar algun paper en el desenvolupament de la malaltia.

Els resultats de l'estudi realitzat en pacients amb cirrosi hepàtica o hepatitis crònica concorden amb els del model animal, ja que en ambdues malalties disminueix l'activitat PON1 mesurada en sèrum respecte a individus sans. Aquesta reducció està també associada a la severitat del dany hepàtic (52% de disminució respecte als controls en pacients amb hepatitis crònica i 67% en cirrosi hepàtica) i correlacionada amb proves de funció hepàtica com l'albumina o la bilirubina. Un cop descartada com a causa de la davallada en l'activitat PON1 en sèrum d'aquests malalts una diferent distribució genotípica o al·lèlica dels polimorfismes PON1₅₅ i PON1₁₉₂, aquest fenomen pot deure's a un efecte directe de la disfunció hepàtica sobre l'expressió de PON1 al fetge que comporti una menor concentració de l'enzim en sèrum, o també pot estar relacionada amb les alteracions lipoproteiques que s'associen a aquestes malalties. Així, se sap que en les hepatopaties cròniques es poden produir alteracions en l'estructura i la concentració de les HDL associades a una disminució de l'activitat lecitina:colesterol aciltransferasa (LCAT) (85).

Sigui quina sigui la seva causa, la disminució d'activitat PON1 en el sèrum dels pacients amb hepatitis crònica o cirrosi hepàtica és tan evident que fins i tot sembla ser un paràmetre útil pel seu diagnòstic. Generalment, s'utilitzen bateries de proves per millorar l'eficàcia del diagnòstic perquè no n'hi ha cap de prou efectiva per si mateixa. Aquestes malalties presenten un desenvolupament lent, progressiu, i moltes vegades els valors dels tests de funció hepàtica resten dins dels rangs normals fins que la malaltia està força avançada. És per això, que en certes ocasions es fa necessària una biòpsia hepàtica per poder examinar la histologia del teixit. L'addició de la mesura de l'activitat PON1 basal a una bateria de proves que incloïa l'albumina, la bilirubina, l'ALT, la GGT, i la FAL va augmentar la sensibilitat diagnòstica en la nostra mostra estudiada del 75% al 94% sense que l'especificitat es veiés afectada (96% en ambdós casos). Futurs estudis hauran d'esbrinar quins mecanismes hi ha darrere aquesta disminució de l'activitat PON1 i quines implicacions té aquest fet en la fisiopatologia de les malalties hepàtiques cròniques.

6.2. Conclusions

Estudi 1

- ✓ Els polimorfismes PON1₅₅ i PON1₁₉₂ del gen *PON1* no es van trobar associats a la presència d'infart de miocardi en la nostra població. Aquestes dades suggereixen que la seva determinació no és útil per predir el risc d'aquesta malaltia.
- ✓ Tot i que es va trobar una disminució de l'activitat de l'enzim PON1 en el sèrum de pacients afectats d'infart de miocardi, aquesta mesura no va ser un factor de risc independent d'altres factors estudiats.

Estudi 2

- ✓ La inducció de dany hepàtic en rates tractades amb CCl₄ produeix una disminució de l'activitat paraoxonasa i arilesterasa de l'enzim PON1 en microsomes hepàtics. Aquesta disminució ja es presenta en estadis inicials de la inducció del dany hepàtic.
- ✓ L'administració oral d'un suplement de zinc a rates tractades amb CCl₄ frena la disminució de l'activitat PON1 en microsomes hepàtics, al mateix temps que retarda el desenvolupament de l'hepatopatia.
- ✓ L'activitat PON1 en microsomes hepàtics es correlaciona inversament amb la producció de lipoperòxids al fetge, fet que suggereix que aquest enzim pot jugar un paper en el sistema antioxidant dels microsomes hepàtics.

Estudi 3

- ✓ En la malaltia hepàtica crònica es produeix una disminució de l'activitat PON1 en sèrum i, a més, aquesta disminució es correlaciona amb la severitat de la malaltia i amb alguns marcadors de funció hepàtica.
- ✓ La determinació de l'activitat PON1 en sèrum, en pacients amb hepatopatia crònica, va presentar la millor exactitud diagnòstica individual dins dels tests estudiats i, quan

es va afegir a una bateria de tests habituals, va augmentar la seva sensibilitat. Per aquest motiu, suggerim que aquesta prova pot ser útil com a marcador de funció hepàtica.

6.3. Perspectives

El nostre grup pretén seguir investigant en un futur pròxim la utilitat de la determinació de l'activitat paraoxonasa en sèrum en el diagnòstic i seguiment de la malaltia hepàtica crònica, i es planteja els següents objectius:

- ✓ Investigar la relació entre els canvis de l'activitat PON1 en sèrum, i els canvis en la concentració de l'enzim en individus control i pacients amb malaltia hepàtica crònica.
- ✓ Estudiar la relació entre l'activitat PON1 en sèrum i l'expressió hepàtica del gen *PON1*.
- ✓ Investigar els canvis temporals de l'activitat PON1 en sèrum de pacients amb hepatitis crònica per virus C tractats amb teràpia antiretroviral, relacionar-los amb la seva resposta al tractament i estudiar la utilitat d'aquesta prova, sola, i en combinació amb altres proves biològiques en el seguiment d'aquests pacients.
- ✓ Investigar l'ús de nous substrats menys tòxics que el paraoxon que permetin adaptar-se a la major part d'analitzadors automàtics utilitzats per poder aplicar la determinació de l'activitat PON1 en la rutina del laboratori d'anàlisis clíniques.

1. Primo-Parmo SL, Sorenson RC, Teiber J, La Du BN. The human paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family. *Genomics* 1996; 33: 498-507.
2. Draganov DI, Stetson PL, Watson CE, Billecke SS, La Du BA. Rabbit serum paraoxonase 3 (PON3) is a high density lipoprotein-associated lactonase and protects low density lipoprotein against oxidation. *J Biol Chem* 2000; 275 (43): 33435-33442.
3. La Du BN. Human serum paraoxonase/arylesterase. In: Kalow, ed. *Pharmacogenetics of drug metabolism*. New York: Pergamon Press, 1992: 51-91.
4. Davies HG, Richter RJ, Keifer M, Broomfield CA, Sowalla J, Furlong CE. The effect of the human paraoxonase polymorphism is reversed with diazoxon, soman and sarin. *Nat Genet* 1996; 14: 334-336.
5. Banka CL. High density lipoprotein and lipoprotein oxidation. *Curr Opin Lipidol* 1996; 7: 139-142.
6. Mackness MI, Arrol S, Durrington PN. Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. *FEBS Lett* 1991; 286: 152-154.
7. Mackness MI, Arrol S, Durrington PN. Protection of low-density lipoprotein against oxidative modification by high-density lipoprotein associated paraoxonase. *Atherosclerosis* 1993; 104: 129-135.
8. Mackness MI, Abbott C, Arrol S, Durrington PN. The role of high-density lipoprotein and lipid-soluble antioxidant vitamins in inhibiting low-density lipoprotein oxidation. *Biochem J* 1993; 294: 829-834.
9. Mackness MI, Durrington PN. HDL, its enzymes and its potential to influence lipid peroxidation. *Atherosclerosis* 1995; 115: 243-253.
10. Navab M, Berliner JA, Watson AD, Hama SY, Territo MC, Lusis AJ, Shih DM, Van Lenten BJ, Frank JS, Demer LL, Edwards PA, Fogelman AM. The Yin and Yang of oxidation in the development of fatty streak. A review based of the 1994 George Lyman Duff Memorial Lecture. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 1996; 16: 831-842.

Referències bibliogràfiques

11. Hayek T, Oiknine J, Dankner G, Brook JG, Aviram M. HDL apolipoprotein A-I attenuates oxidative modification of low density lipoprotein: studies in transgenic mice. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1995; 33: 721-725.
12. Billecke S, Draganov D, Counsell R, Stetson P, Watson C, Hsu C, La Du BN. Human serum paraoxonase (PON1) isozymes Q and R hydrolyze lactones and cyclic carbonate esters. *Drug Metab Dispos* 2000; 28: 1335-1342.
13. Jakubowski H. Homocysteine thiolactone: metabolic origin and protein homocysteinylolation in humans. *J Nutr* 2000; 130: 377S-381S.
14. Sanghera DK, Aston CE, Saha N, Kamboh MI. DNA polymorphisms in two paraoxonase genes (PON1 and PON2) are associated with risk of coronary Herat disease. *Am J Hum Genet* 1998; 62: 36-44.
15. Boright AP, Connelly PW, Brunt JH, Scherer SW, Tsui LC, Hegele RA. Genetic variation in paraoxonase-1 and paraoxonase-2 is associated with variation in plasma lipoproteins in Alberta Hutterites. *Atherosclerosis* 1998; 139: 131-136.
16. Mackness B, Durrington PN, Mackness MI. Polymorphisms of paraoxonase genes and low-density lipoprotein lipid peroxidation. *Lancet* 1999; 353: 468-469.
17. Ng CJ, Waldeigh DJ, Gangopadhyay A, Hama S, Grijalva VR, Navab M, Fogelman AM, Reddy S. Paraoxonase-2 is a ubiquitously expressed protein with antioxidant properties and is capable of preventing cell-mediated oxidative modification of low density lipoprotein. *J Biol Chem* 2001; 276 (48): 44444-44449.
18. Draganov DI, Stetson PL, Watson CE, Billecke SS, La Du BN. Rabbit serum paraoxonase 3 (PON3) is a high density lipoprotein-associated lactonase and protects low density lipoprotein against oxidation. *J Biol Chem* 2000; 275: 33435-33442.
19. Reddy ST, Wadleigh DJ, Grijalva V, Ng C, Hama S, Gangopadhyay A, Shih DM, Lusis AJ, Navab M, Fogelman AM. Human paraoxonase-3 is an HDL-associated enzyme with biological activity similar to paraoxonase-1 protein but is not regulated by oxidized lipids. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 542-547.
20. Hassett C, Richter R, Humbert R, Chapline C, Crabb JW, Omiecinski CJ, Furlong CE. Characterization of cDNA clones encoding rabbit and human serum paraoxonase: the mature protein retains its signal sequence. *Biochemistry* 1991; 30: 10141-10149.

21. Eckerson HW, Romson J, Wyte C, La Du BN. The human serum paraoxonase polymorphism: identification of phenotypes by their response to salts. *Am J Hum Genet* 1983; 35: 214-227.
22. Hasselwander O, Mc Master D, Fogarty DG, Maxwell AP, Nicholls DP, Young IS. Serum paraoxonase and platelet-activating factor acetylhydrolase in chronic renal failure. *Clin Chem* 1998; 44: 179-181.
23. Burlina A, Michielin E, Galzigna L. Characteristics and behaviour of arylesterase in human serum and liver. *Eur J Clin Invest* 1977; 7: 17-20.
24. Haagen L, Brock A. A new automated method for phenotyping arylesterase (EC 3.1.1.2) based upon inhibition of enzymatic hydrolysis of 4-nitrophenyl acetate by phenyl acetate. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1992; 30: 391-395.
25. Kawai H, Sakamoto F, Inoue Y. Improved specific assay for serum arylesterase using a water soluble substrate. *Clin Chim Acta* 1990; 188: 177-182.
26. Kawai H, Yomoda S, Inoue Y. ELISA using monoclonal antibody to human serum arylesterase. *Clin Chim Acta* 1991; 202: 219-226.
27. Blatter Garin MC, James RW, Messmer S, Barja F, Pometta D. Identification of a distinct human high-density lipoprotein subspecies defined by a lipoprotein-associated protein, K-45. Identity of K-45 with paraoxonase.. *Eur J Biochem* 1993; 211: 871-879.
28. Blatter Garin MC, Abbott C, Messmer S, Mackness M, Durrington P, Pometta D, James RW. Quantification of human serum paraoxonase by enzyme-linked immunoassay: population differences in protein concentrations. *Biochem J.* 1994; 304: 549-554.
29. Abbott C, Mackness M, Kumar S, Boulton AJ, Durrington P. Serum paraoxonase activity, concentration, and phenotype distribution in diabetes mellitus and its relationship to serum lipids and lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vascr Biol* 1995; 15: 1812-1818.
30. Playfer JR, Eze LC, Bullen MF, Evans DA. Genetic polymorphism and interethnic variability of plasma paraoxonase activity. *J Med Genet* 1976; 13: 337-342.
31. Eckerson HW, Wyte CM, La Du BN. The human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism. *Am J Hum Genet* 1983; 35: 1126-1138.

Referències bibliogràfiques

32. Adkins S, Gan KN, Mody M, La Du BN. Molecular basis for the polymorphic forms of human serum paraoxonase/arylesterase: glutamine or arginine at position 191, for the respective A or B allozymes. *Am J Hum Genet* 1993; 52: 598-608.
33. Blatter Garin MC, James RW, Dussoix P, Blanché H, Passa P, Froguel P, Ruiz J. Paraoxonase polymorphism Met-Leu54 is associated with modified serum concentrations of the enzyme. *J Clin Invest* 1997; 99: 62-66.
34. Leviev I, James RW. Promoter polymorphisms of human paraoxonase *PON1* gene and serum paraoxonase activities and concentrations. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 516-521.
35. Brophy VH, Jampsa RL, Clendenning JB, Mckinstry LA, Jarvik GP, Furlong CE. Effects of 5' regulatory-region polymorphisms on paraoxonase-gene (*PON1*) expression. *Am J Hum Genet* 2001; 68: 1428-1436.
36. James RW, Leviev I, Ruiz J, Passa P, Froguel P, Blatter Garin MC. Promoter polymorphism T(-107)C of the paraoxonase *PON1* gene is a risk factor for coronary heart disease in type 2 diabetic patients. *Diabetes* 2000; 49: 1390-1393.
37. Brophy VH, Hastings MD, Cendenning JB, Ritcher RJ, Jarvik GP, Furlong CE. *Pharmacogenetics* 2001; 11: 77-84.
38. Watson AD, Berliner JA, Hama SY, La Du BN, Faull KF, Fogelman AM, Navab M. Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase. Inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest* 1995; 96: 2882-2891.
39. Aviram M, Rosenblat M, Billecke S, Eroglu J, Sorenson R, Bisgaier CL, Newton RS, La Du B. Human serum paraoxonase (PON1) is inactivated by oxidized low density lipoprotein and preserved by antioxidants. *Free Rad Biol Med* 1999; 26: 892-904.
40. Kaplan M, Aviram M. Oxidized low density lipoprotein: atherogenic and proinflammatory characteristics during macrophage foam cell formation. An inhibitory role for nutritional antioxidants and serum paraoxonase. *Clin Chem Lab Med* 1999; 37: 777-787.
41. Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL, Newton RS, Primo-Parmo SL, La Du BN. Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase. *J Clin Invest* 1998; 101: 1581-1590.

42. Shih DM, Gu L, Xia YR, Navab M, Li WF, Hama S, Castellani LW, Furlong CE, Costa LG, Fogelman AM, Lusis AJ. Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. *Nature* 1998; 364: 284-287.
43. Shih DM, Xia YR, Wang XP, Miller E, Castellani LW, Subbanagounder G, Cheroutre H, Faull KF, Berliner JA, Witztum JL, Lusis AJ. Combined serum paraoxonase knockout/apolipoprotein E knockout mice exhibit increased lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *J Biol Chem* 2000; 275: 17527-17535.
44. Aviram M, Hardak E, Vaya J, Mahmood S, Milo S, Hoffman A, Billicke S, Draganov D, Rosenblat M. Human serum paraoxonases (PON1) Q and R selectively decrease lipid peroxides in human coronary and carotid atherosclerotic lesions. PON1 esterase and peroxidase-like activities. *Circulation* 2000; 101: 2510-2517.
45. Cao H, Girard-Globa A, Berthezene F, Moulin P. Paraoxonase protection of LDL against peroxidation is independent of its esterase activity towards paraoxon and is unaffected by the Q-R genetic polymorphism. *J Lipid Res* 1999; 40: 133-139.
46. Ruiz J, Blanché H, James RW, Blatter Garin MC, Vaisse C, Charpentier G, Cohen N, Morabia A, Passa P, Froguel P. Gln-Arg 192 polymorphism of paraoxonase and coronary heart disease in type 2 diabetes. *Lancet* 1995; 346: 869-872.
47. Serrato M, Marian AJ. A variant of human paraoxonase/arylesterase (HUMPONA) gene is a risk factor for coronary artery disease. *J Clin Invest* 1995; 96: 3005-3008.
48. Mackness B, Mackness MI, Durrington PN, Arrol S, Evans AE, McMaster D, Ferrières J, Ruidavets JB, Williams NR, Howard AN. Paraoxonase activity in two healthy populations with differing rates of coronary heart disease. *Eur J Clin Invest* 2000; 30: 4-10.
49. Sanghera DK, Saha N, Aston CE, Kamboh MI. Genetic polymorphism of paraoxonase and the risk of coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 1067-1073.
50. Mackness B, Mackness MI, Arrol S, Turkie W, Durrington PN. Effect of the human serum paraoxonase 55 and 192 genetic polymorphisms on the protection by high density lipoprotein against low density lipoprotein oxidative modification. *FEBS Letters* 1998; 423: 57-60.

51. Schmidt H, Schmidt R, Niederkorn K, gradert A, Schumacher M, Watzinger N, Hartung HP, Kostner GM. Paraoxonase PON1 polymorphism Leu-Met54 is associated with carotid atherosclerosis. *Stroke* 1998; 29: 2043-2048.
52. Malin R, Laine S, Rantalaiho V, Wirta O, Pasternack A, Jokela H, Alho H, Koivula T, Lehtimäki T. Lipid peroxidation is increased in paraoxonase L55 homozygotes compared with M-allele carriers. *Free Rad Res* 2001; 34: 477-484.
53. Herrmann SM, Blanc H, Poirier O, Arveiler D, Luc G, Evans A, Marques-Vidal P, Bard JM, Cambien F. The Gln/Arg polymorphism of human paraoxonase (PON 192) is not related to myocardial infarction in the ECTIM study. *Atherosclerosis* 1996; 126: 299-303.
54. Antikainen M, Murtomäki S, Syväne M, Pahlman R, Tahvanainen E, Jauhiainen M. The Gln-Arg 191 polymorphism of the human paraoxonase gene (HUMPONA) is not associated with the risk of coronary artery disease in Finns. *J Clin Invest* 1996; 98: 883-885.
55. Mackness B, Davies GK, Turlie W, Lee E, Roberts DH, Hill E, Roberts C, Durrington PN, Mackness MI. paraoxonase status in coronary heart disease. Are activity and concentration more important than genotype?. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 1451-1457.
56. Tward A, Xia YR, Wang XP, Shi YS, Park C, Castellani LW, Lusis AJ, Shih DM. Decreased atherosclerotic lesion formation in human serum paraoxonase transgenic mice. *Circulation* 2002; 106: 484-490.
57. Rodrigo L, Hernández AF, López-Caballero JJ, Gil F, Pla A. Immunohistochemical evidence for the expression and induction of paraoxonase in the liver, kidney, lung and brain tissue. Implications for its physiological role. *Chem Biol Interact* 2001; 31: 123-137.
58. Pellin MC, Moretto A, Lotti M, Vilanova E. Distribution and some biochemical properties of rat paraoxonase activity. *Neurotoxicol Teratol* 1990; 12: 611-614.
59. Gil F, Pla A, Gonzalvo MC, Hernández AF, Villanueva E. Rat liver paraoxonase: subcellular distribution and characterization. *Chem Biol Interact* 1993; 87: 149-154.
60. Gil F, Pla A, Gonzalvo MC, Hernández AF, Villanueva E. Partial purification of paraoxonase from rat liver. *Chem Biol Interact* 1993; 87: 69-75.

61. Huang YS, Woods L, Sultatos LG. Solubilization and purification of A-esterase from mouse hepatic microsomes. *Biochem Pharmacol* 1994; 48: 1273-1280.
62. Rodrigo L, Gil F, Hernández AF, Marina A, Vázquez J, Pla A. Purification and characterization of paraoxon hydrolase from rat liver. *Biochem J* 1997; 321: 595-601.
63. Hernández AF, Gonzalvo MC, Gil F, Villanueva E, Pla A. Divergent effects of classical inducers on rat plasma and microsomal fraction paraoxonase and arylesterase. *Environ Toxicol Pharmacol* 1997; 3: 83-86.
64. Gonzalvo MC, Gil F, Hernández AF, Villanueva E, Pla A. Inhibition of paraoxonase activity in human liver microsomes by exposure to EDTA, metals and mercurials. *Chem Biol Interact* 1997; 105: 169-179-
65. Gonzalvo MC, Gil F, Hernández AF, Rodrigo L, Villanueva E, Pla A. Human liver paraoxonase (PON1): subcellular distribution and characterization. *J Biochem Mol Toxicol* 1998; 12: 61-69
66. Rodrigo L, Gil F, Hernández AF, Pla A. Identification of two rat liver proteins with paraoxonase activity: biochemical evidence for the identity of paraoxonase and arylesterase. *Chem Biol Interact* 1999; 119: 263-275.
67. Leviev I, Negro F, James RW. Two alleles of the human paraoxonase gene produce different amounts of mRNA. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 2935-2939.
68. Feingold KR, Memon RA, Moser AH, Grunfeld C. Paraoxonase activity in the serum and hepatic mRNA levels decrease during the acute phase response. *Atherosclerosis* 1998; 139: 307-315.
69. Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic peroxidation products: malondialdehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol* 1990; 186: 407-421.
70. Chojkier M, Houglum K, Solís-Herruzo J, Brenner DA. Stimulation of collagen gene expression by ascorbic acid in cultured human fibroblasts: a role for lipid peroxidation? *J Biol Chem* 1989; 264: 16957-16962.
71. Cabré M, Ferré N, Folch J, Paternáin JL, Hernández M, Del Castillo D, Joven J, Camps J. Inhibition of hepatic cell nuclear DNA fragmentation by zinc in carbon tetrachloride-treated rats. *J Hepatol* 1999; 31: 228-234.

72. Ferré N, Girona J, Cabré M, Joven J, La Ville A, Masana L, Paternáin JL, Camps J. Hepatic production of apolar aldehydes in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *Mol Cell Biochem* 1999; 198: 57-60.
73. Cabré M, Camps J, Paternáin JL, Ferré N, Joven J. Time-course of changes in hepatic lipid peroxidation and glutathione metabolism in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2000; 27: 694-699.
74. Cabré M, Camps J, Ferré N, Paternáin JL, Joven J. The antioxidant and hepatoprotective effects of zinc are related to hepatic cytochrome P450 depression and metallothionein induction in rats with experimental cirrhosis. *Int J Vit Nutr Res* 2001; 71: 229-236.
75. Ferré N, Camps J, Paul A, Cabré M, Calleja L, Osada J, Joven J. Effects of high-fat, low-cholesterol diets on hepatic lipid peroxidation and antioxidants in apolipoprotein E-deficient mice. *Mol Cell Biochem* 2001; 218: 165-169.
76. Gasso M, Rubio M, Varela G et al. Effects of s-adenosylmethionine on lipid peroxidation and liver fibrogenesis in carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *J Hepatol* 1996; 25: 200-205.
77. Cabre M, Joven J, Camps J. Specific activity of the thiobarbituric acid determination in CCl₄-induced hepatic injury in rats. *Med Sci Res* 1993; 21: 55-57.
78. Zweig MH, Campbell G. Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clin Chem* 1993; 39: 561-577.
79. Bruns DE, Huth EJ, Magic E, Young DS. Toward a checklist for reporting studies of diagnostic accuracy of medical tests. *Clin Chem* 2000; 46: 893-895.
80. Pairitz Jarvi K G, Rozek LS, Brophy VH, Hatsukami TS, Ritcher RJ, Schellenberg GD, Furlong CE. Paraoxonase (PON1) phenotype is a better predictor of vascular disease than in *PON1*₁₉₂ or *PON1*₅₅ genotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 2441-2447.
81. Shih DM, Gu L, Hama S, Xia Y-R, Navab M, Fogelman AM, Lusis AJ. Genetic-dietary regulation of serum paraoxonase expression and its role in atherogenesis in a mouse model. *J Clin Invest* 1996; 97: 1630-1639.

82. Navab M, Hama HY, Van Lanten BJ, Fonarow GC, Cardinez CJ, Castellani LW, Brennan ML, Lusic LJ, Fogelman AM. Mildly oxidized LDL induces an increased apolipoprotein J/paraoxonase ratio. *J Clin Invest* 1997; 99: 2005-2019.
83. Sutherland WHF, Walker RJ, de Jon SA, van Rij AM, Phillips V, Walker HL. Reduced postprandial serum paraoxonase activity after a meal rich in used cooking fat. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 1340-1347.
84. Jarvik GP, Trevanian Tsai N, Mcinstry LA, Wani R, Brophy VH, Ritcher RJ, Schellenberg GD, Heagerty PJ, Hatsukami TS, Furlong CE. Vitamin C and E intake is associated with increased paraoxonase activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 1329-1333.
85. Sabesin SM, Hawkins HL, Kuiken L, Ragland JB. Abnormal plasma lipoproteins and lecitin-cholesterol acyltransferase deficiency in alcoholic liver disease. *Gastroenterology* 1997; 72: 510-518.

ADN	Àcid desoxiribonucleic.
ALT	Alanina aminotransferasa.
Apo A-I	Apolipoproteïna A-I.
Apo B	Apolipoproteïna B.
Apo E	Apolipoproteïna E.
APOE	Gen que codifica per l'apolipoproteïna E.
Arg	Arginina.
AST	Aspartat aminotransferasa.
ATP	Adenosin trifosfat.
DEAE	Dietil aminoetil.
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay.</i>
FAL	Fosfatasa alcalina.
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography.</i>
GGT	γ -glutamiltrespeptidasa.
Gln	Glutamina.
H&E	Tenyiment Hematoxilina-Eosina.
HDL	<i>High Density Lipoprotein.</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography..</i>
HR FPLC	<i>High resolution Fast Protein Liquid Chromatography.</i>
K_m	Constant de Michaelis.
LCAT	Lecitina:colesterol aciltransferasa.
LDL	<i>Low Density Lipoprotein.</i>
Leu	Leucina.
MANOVA	Anàlisi múltiple de la variança.
MCP-1	<i>Monocyte Chemotactic Protein-1.</i>

Abreviatures

MDA	Malonildialdehid.
Met	Metionina.
min	Minuts.
mRNA	Àcid ribonuclèic missatger.
NADPH	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (reduced).</i>
OR	Odds Ratio.
pb	Parells de bases.
PCR	<i>Polimerase Chain reaction.</i>
PON1	Enzim paraoxonasa/arilesterasa [EC 3.1.8.1]. Producte del gen <i>PON1</i> .
<i>PON1</i>	Gen que codifica per a l'enzim PON1.
PON1₁₉₂	Polimorfisme en la posició 192 de gen <i>PON1</i> .
PON1₅₅	Polimorfisme en la posició 55 de gen <i>PON1</i> .
<i>PON2</i>	Gen que codifica per a l'enzim PON2.
PON2	Producte del gen <i>PON2</i> .
<i>PON3</i>	Gen que codifica per a l'enzim PON3.
PON3	Producte del gen <i>PON3</i> .
ROC	<i>Receiver-Operating Characteristics.</i>
RT-PCR	<i>Reverse Transcription-Polimerase Chain Reaction.</i>
s	Segons.
TBARS	<i>Tiobarbituric Acid Reactive Substances.</i>
TP	Temps de Protrombina.
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometà.
VLDL	<i>Very Low Density Lipoprotein.</i>

A totes les persones a
les quals aquest treball
els fa tanta il·lusió com
a mi.

Agraïments:

Vull agrair a moltíssimes persones l'ajut que d'una forma o altra m'han ofert mentre ha durat aquesta aventura. Sense moltes d'elles, aquest treball no hauria arribat mai al seu fi; així que Moltíssimes gràcies !!!!

Al Dr. Jordi Camps, per haver-me guiat durant tot aquest temps, per haver-me ofert sempre el seu suport i amistat, pel bon humor i la comprensió que en moltes ocasions ha fet més fàcil els mals moments i, per la seva capacitat de treball inesgotable de la qual espero retenir-ne ni que sigui una petita part.

Al Dr. Jorge Joven, per creure en nosaltres i ser exigent. El seu estímul ens fa esforçar per treure el màxim de nosaltres mateixos.

A la Dra. Elisabet Vilella, per dirigir amb mà ferma el CRB, per convertir un grup de persones en un equip i per posar tot el seu esforç en fer-lo tirar endavant.

A la Dra. Maria Cabré, per oferir-me sempre el seu ajut i per haver realitzat el tractament experimental de tots els animals inclosos al segon estudi d'aquesta tesi doctoral.

Al Dr. Toni Paul, per haver realitzat part de les determinacions incloses en el primer estudi d'aquesta tesi doctoral. I també per convertir-se, mentre va ser amb nosaltres, en una altra "Nena del CRB".

A tot aquell que s'identifiqui com a "Nena del CRB", per fer fàcil la convivència, per donar tot el suport professional i anímic, per ser uns magnífics companys i amics, aguantar-me en els mals moments i alegrar-se amb els bons. I pels bons moments viscuts com a "Comissió de Festes". Moltes gràcies a tots /es !!!!

Al tot el personal dels Laboratoris Clínics de l'Hospital Universitari Sant Joan perquè quan els he demanat la col·laboració me l'han ofert desinteressadament.

A totes les persones que treballen al laboratori d'Anatomia Patològica de l'Hospital Universitari Sant Joan, per respondre sempre les meves preguntes, permetre'm treballar al seu laboratori com un company més i ensenyar-me tot el que els hi he demanat, a alguns fins i tot per ser quasi "Nenes CRB". Al Dr. Kiko Riu, per suportar el meu incordi i ajudar-me en aquest i altres treballs. I a la Dra. Toñi Navarro, per ajudar-me a triar les fotografies d'aquesta tesi.

Al Dr. Eduard Prats, per col·laborar amb nosaltres sempre que li hem demanat i ajudar-nos en la recollida dels participants inclosos al tercer estudi.

A tots els participants que col·laboren desinteressadament en aquest i altres treballs d'investigació.

A les infermeres de l'Àrea de Curta Estada de l'Hospital Universitari Sant Joan, per col·laborar en la recollida de participants i realitzar les extraccions de sang.

A la Fundació Privada REDDIS, la Generalitat de Catalunya i el Grup SAGESSA, per les beques de les quals he estat beneficiària i que m'han permès dedicar-me a la investigació tot aquest temps.

Al Fondo de Investigaciones Sanitarias, per subvencionar part dels estudis d'aquesta tesi.

A la meva família, als meus pares Jordi i Cori, i al meu germà Jordi. Als qui tant coses haig d'agrair i tant poques vegades ho faig. Espero poder-vos tornar almenys una part de tot el que m'heu ofert.

Al meu "soci", el Miquel, per totes les petites coses que m'han fet feliç des de sempre.

Serum Paraoxonase Activity: A New Additional Test for the Improved Evaluation of Chronic Liver Damage

NATÀLIA FERRÉ,¹ JORDI CAMPS,^{1*} EDUARD PRATS,² ELISABET VILELLA,¹ ANTONI PAUL,¹
LÍDIA FIGUERA,¹ and JORGE JOVEN¹

Background: Paraoxonase 1 (PON1) is an ester hydrolase present in serum and in the liver. The aims of the present study were to investigate the following: (a) the relationship between serum PON1 activity alterations and the degree of liver damage in patients with chronic liver disease; (b) the influence of genetic variability on serum PON1 activity; and (c) the efficacy of serum PON1 activity measurement, alone and in combination with standard liver function tests, in the assessment of liver damage.

Methods: We studied 68 patients with liver cirrhosis, 107 patients with chronic hepatitis, and 368 apparently healthy volunteers. Baseline and salt-stimulated PON1 activities were measured by the hydrolysis of paraoxon. PON1 genotyping at positions 55 and 192 was analyzed by PCR and restriction isotyping.

Results: Baseline and stimulated PON1 activities were decreased ($P < 0.001$) in chronic hepatitis and in liver cirrhosis. PON1 activity was significantly correlated with serum total proteins, albumin, and bilirubin in patients but not in controls. There were no significant differences with respect to allele and genotype frequencies between patients and controls. The combination of baseline serum PON1 with five standard biochemical tests had a higher classification accuracy (94% of patients; 96% of controls) than the five standard tests alone (75% of patients; 96% of controls). ROC plots demonstrated a high diagnostic accuracy for baseline serum PON1 [area under the curve, 0.89 (95% confidence inter-

val, 0.86–0.93) in chronic hepatitis and 0.96 (95% confidence interval, 0.94–0.99) in cirrhosis]. Baseline PON1 provided the highest ROC area for cirrhosis vs controls. **Conclusions:** The significant decrease of PON1 activity in chronic liver diseases is related to the degree of hepatic dysfunction and not to allelic or genotypic differences. Addition of serum PON1 activity measurement to the current battery of tests may improve the evaluation of chronic liver diseases.

© 2002 American Association for Clinical Chemistry

Paraoxonase [(PON)³; arylalkylphosphatase (EC 3.1.8.1)] is an ester hydrolase that catalyzes the hydrolysis of some xenobiotics, such as organophosphorates, unsaturated aliphatic esters, aromatic carboxylic esters, and possibly, carbamates (1). The paraoxonase gene family contains at least three members, *PON1*, *PON2*, and *PON3*, which are located on chromosome 7q21.3–22.1 (2, 3). The products of *PON2* and *PON3* gene expression are the subject of ongoing research (3, 4). The enzyme PON1 is known to be tightly bound with HDL in serum, and several studies suggest that it is this association that contributes to the protection conferred by HDL against LDL oxidation (5–11).

The liver plays a key role in the synthesis of serum PON1. To date, the gene expression has been observed only in the liver (12, 13), and in vitro biochemical studies indicate properties shared by hepatic and serum PON1 [optimum pH, affinity for substrate (K_m), heat inactivation, and calcium requirement] (14). These data support the concept of a common identity for both enzymes. Of considerable clinical interest is whether the measurement

¹ Centre de Recerca Biomèdica and ² Servei de Medicina Interna, Institut de Recerca en Ciències de la Salut (IRCIS), Hospital Universitari de Sant Joan, C/. Sant Joan s/n, 43201-Reus, Catalunya, Spain.

*Author for correspondence. Fax 34-977-312569; e-mail jcamp@grupsgs.com.

A portion of this work has been communicated previously as Ferré N, Camps J, Paul A, Prats E, Joven J. Serum paraoxonase activity and chronic liver disease [Abstract]. *J Hepatol* 2001;34(Suppl 1):S226.

Received August 1, 2001; accepted November 15, 2001.

³ Nonstandard abbreviations: PON, paraoxonase; ALT, alanine aminotransferase; GGT, γ -glutamyltransferase; ALP, alkaline phosphatase; AUC, area(s) under the curve(s); CI, confidence interval; and LCAT, lecithin:cholesterol acyl transferase.

of serum PON1 activity would be useful as an index of liver function status. Indeed, preliminary studies observed a significant decrease of serum arylesterase activity in patients with liver cirrhosis (15–17), and furthermore, arylesterase and PON1 activities have been shown to be functions of a single enzyme (18).

Any investigation of the variation in serum PON1 activity secondary to impairment of liver function needs to take into account the influence of genetic variability on this enzyme. Serum PON1 has two genetically determined polymorphic sites, one at position 192, which is a Gln→Arg substitution, and one at position 55, which is a Met→Leu substitution (4). The Gln→Arg polymorphism leads to two alloenzymes that clearly differ in paraoxon-hydrolyzing ability: the Arg alloenzyme has a relatively higher activity and shows a greater degree of stimulation by 1 mol/L NaCl than does the Gln alloenzyme (18). The Met→Leu substitution is associated with changes in the concentrations of the circulating enzyme, the Leu alloenzyme being associated with higher PON1 concentrations (13, 19).

The key objectives of the present study were to investigate the following: (a) the relationship between serum PON1 activity and the degree of liver damage in patients with chronic liver disease; (b) the influence of genetic variability on serum PON1 activity in these types of patients; and (c) the efficacy of serum PON1 activity measurement, alone and in combination with the standard liver function tests, in the assessment of liver damage.

Patients and Methods

STUDY PARTICIPANTS

A prospective cohort of 175 patients with chronic liver disease was consecutively recruited from among those attending the outpatient clinics of the Hospital Universitari de Sant Joan between October 1999 and December 2000. The study included 68 patients with liver cirrhosis (42 men, 26 women; age, 60 ± 10 years) and 107 patients with chronic hepatitis (69 men, 38 women; age, 46 ± 14 years). Chronic hepatitis was diagnosed by liver biopsy. Cirrhosis was diagnosed on the basis of clinical evidence, including echography to evaluate splenomegaly or portal vein dilation and fibrogastroscopy to detect the presence

of gastroesophageal varices. Hepatitis was mostly secondary to hepatitis C virus infection (73% of the cases).

The control group consisted of 368 healthy volunteers participating in an epidemiologic study currently being conducted in our region of Catalunya (Spain). A detailed description of this study sample will be published elsewhere [Homocysteine-folate (HOMFOL) study; Murphy MM, Vilella E, Santiago C, Figuera L, Sánchez M, et al., manuscript in preparation]. The controls (182 men, 186 women; age, 42 ± 15 years) were ostensibly healthy with no clinical or analytical evidence of diabetes, neoplasia, renal disease, hepatic damage, or cardiovascular disease. All procedures were in accordance with the ethical standards of the Hospital Universitari de Sant Joan, and the anonymity of data was guaranteed.

BIOCHEMICAL MEASUREMENTS

Serum PON1 activity was determined with an automated adaptation of an assay described previously (20, 21). Operators were not aware of the diagnoses of patients and controls. Briefly, PON1 assays were performed without additional NaCl (baseline activity) and with 1 mol/L NaCl included in the assay buffer (salt-stimulated activity). We measured the rate of hydrolysis of paraoxon by monitoring the increase of absorbance at 410 nm and 37 °C. The assay reagent contained 1 mmol/L paraoxon of >96% purity (Sigma Chemical Co.) and 1 mmol/L CaCl₂ in 0.05 mol/L glycine buffer (pH 10.5). The two assays were performed in an ILab 900[®] automated analyzer (Instrumentation Laboratories) in which sample (8 μL) was incubated with reagent (250 μL) and the absorbance was determined after 17 and 51 s, respectively. The blank absorbance was never >0.700. Although this blank may be relatively high, the background was automatically subtracted by the analyzer in the course of the analyses. Because of its toxicity, paraoxon stock solutions were handled in an extraction cabinet, with the operator wearing protective gloves and mask. Paraoxonase activity was expressed as U/mL. The interassay CV was <8%. The intraassay CV was <6%. The traditional measures of liver dysfunction, such as serum alanine aminotransferase (ALT), γ-glutamyltransferase (GGT), and alkaline phosphatase (ALP) activities, as well as total protein, albumin,

Table 1. Results of the standard liver function tests (values are expressed as the mean ± SD).

Marker	Control group (n = 368)	Chronic hepatitis (n = 107)	Cirrhosis (n = 68)
Total proteins, g/L	73 ± 5	73 ± 6	70 ± 10 ^a
Albumin, g/L	42 ± 2	40 ± 5 ^b	35 ± 8 ^b
ALT, μkat/L	0.36 ± 0.15	1.68 ± 1.71 ^b	0.78 ± 0.91 ^b
GGT, μkat/L	0.30 ± 0.28	1.23 ± 1.76 ^b	1.21 ± 1.40 ^b
ALP, μkat/L	2.76 ± 0.80	3.50 ± 2.15 ^b	4.21 ± 2.01 ^b
Bilirubin, μmol/L	9.5 ± 3.4	16.5 ± 19.3 ^b	34.8 ± 37.7 ^b

^a *P* < 0.01 with respect to the control group.

^b *P* < 0.001 with respect to the control group.

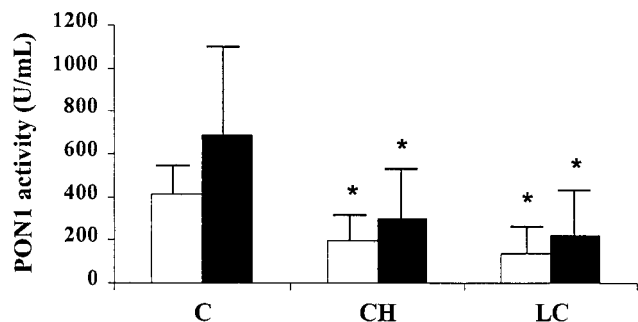


Fig. 1. Baseline (open columns) and stimulated (filled columns) serum PON1 activity in controls (C), patients with chronic hepatitis (CH), and patients with liver cirrhosis (LC).

*, $P < 0.001$ with respect to the control group.

and total bilirubin concentrations, were analyzed with standard techniques (ITC Diagnostics).

PON GENOTYPING

Genomic DNA was obtained from leukocytes (Puregene DNA Isolation reagent set; Gentra), and the PON1₅₅ and PON1₁₉₂ polymorphisms of the *PON1* gene were analyzed by PCR amplification and restriction isotyping. The primers used were 5'-GAAGAGTGATGTATAGCCCCAG-3' and 5'-TTTAATCCAGAGCTAATGAAAGCC-3' for the PON1₅₅ polymorphism and 5'-TATTGTTGCTGTGGGGACCTGAG-3' and 5'-CACGCTAAACCCAAATACATCTC-3' for the PON1₁₉₂. The PCR conditions were as previously described (22). PCR products of 171 bp for the PON1₅₅ and 99 bp for the PON1₁₉₂ polymorphisms were cleaved with the restriction enzymes *Nla*III and *Alu*I (New England BioLabs), respectively, separated by electrophoresis in 12% polyacrylamide gels, and the banding patterns were developed by silver staining. Characteristic bands were obtained at the following molecular weights: (a) M_r 171 for the PON1₅₅ LL polymorphism; M_r 127 and 44 for the MM polymorphism, and M_r 171, 127, and 44 for the LM polymorphism; and (b)

M_r 99 for the PON1₁₉₂ QQ polymorphism, M_r 68 and 31 for the RR polymorphism, and M_r 99, 68, and 31 for the QR polymorphism.

STATISTICAL ANALYSIS

Differences between means were assessed with the Student *t* test. The Pearson correlation coefficient was used to evaluate the degree of association between two variables. When variables presented with skewed distributions, these statistical analyses were applied to log-transformed data. Multiple ANOVA was used to assess the effect of the different variables on the serum PON1 activity. Diagnostic accuracy for serum PON1 and other biochemical tests was calculated with ROC analysis (23, 24). Multiple logistic regression was used to estimate the ability of groups of variables to predict the presence or absence of liver disease. χ^2 analysis was used to determine whether the genotype distribution was in Hardy-Weinberg equilibrium and to compare distributions of alleles and genotypes in the different groups of patients and controls. Statistical analyses performed were with the SPSS 10.0 statistical package and the Epi-Info program (CDC).

Results

RELATIONSHIP BETWEEN SERUM PON1 ACTIVITY AND LIVER DISEASE

The results of the standard liver function tests (Table 1) provide evidence of the spectrum of disease. Patients with chronic hepatitis had a moderate increase in serum ALT, as well as other analytes. For ALP activity and albumin and bilirubin concentrations, liver function values in cirrhotic patients were more altered than in patients with hepatitis.

Baseline and salt-stimulated serum PON1 activities are shown in Fig. 1. Baseline activity was 412 ± 153 U/mL in the control group. This was significantly decreased ($P < 0.001$) in patients with chronic hepatitis (196 ± 109 U/mL; mean decrease, 52%) and in patients with liver

Table 2. Correlation coefficients between serum PON1 activity and the standard liver function tests.^a

	Baseline PON1 activity		
	Control group (n = 368)	Chronic hepatitis (n = 107)	Cirrhosis (n = 68)
Proteins	0.08 [-0.02 to 0.18]	0.20 ^b [-0.01 to 0.38]	0.43 ^c [0.21 to 0.61]
Albumin	0.01 [-0.10 to 0.10]	0.53 ^c [0.38 to 0.66]	0.59 ^c [0.40 to 0.72]
Bilirubin	-0.03 [-0.13 to 0.07]	-0.32 ^c [-0.47 to -0.12]	-0.32 ^d [-0.52 to -0.09]
	Stimulated PON1 activity		
Proteins	0.07 [-0.04 to 0.17]	0.12 [-0.08 to 0.30]	0.27 ^b [0.03 to 0.48]
Albumin	0.01 [-0.10 to 0.10]	0.38 ^c [0.20 to 0.53]	0.40 ^d [0.18 to 0.59]
Bilirubin	-0.01 [-0.16 to 0.05]	-0.20 ^b [-0.37 to 0.01]	-0.17 [-0.39 to 0.08]

^a Values in brackets represent 95% CIs. There were no statistically significant relationships between PON1 activity and ALT, GGT, or ALP in any of the groups studied. Statistical analyses were applied on log-transformed values of bilirubin, baseline PON1, and stimulated PON1.

^b $P < 0.05$.

^c $P < 0.001$.

^d $P < 0.01$.

Table 3. Distribution, in patients and controls, of PON1 genotypes defined by polymorphisms at positions 55 and 192 of the mature enzyme protein.^a

Genotype	Control group (n = 368)	Chronic hepatitis (n = 107)	Cirrhosis (n = 68)
PON1 ₁₉₂ genotype frequency			
QQ	0.46	0.48	0.50
QR	0.46	0.39	0.41
RR	0.08	0.13	0.09
PON1 ₁₉₂ allele frequency (Q/R)	0.69/0.31	0.68/0.32	0.70/0.30
PON1 ₅₅ genotype frequency			
LL	0.40	0.36	0.44
LM	0.47	0.48	0.44
MM	0.13	0.16	0.12
PON1 ₅₅ allele frequency (L/M)	0.63/0.37	0.60/0.40	0.66/0.34

^a No significant differences of genotype or allele distributions were observed between patients and controls.

cirrhosis (137 ± 89 U/mL; mean decrease, 67%). Stimulated PON1 activity was 688 ± 412 U/mL in the control group. This was also significantly decreased ($P < 0.001$) in chronic hepatitis (302 ± 242 U/mL; mean decrease, 56%) and liver cirrhosis (219 ± 223 U/mL; mean decrease, 68%).

The correlation coefficients of the regression lines between serum PON1 activity and the other biochemical analytes are depicted in Table 2. There were significant relationships between serum PON1 activity and total proteins, albumin, and bilirubin concentrations in patients with chronic liver disease, but not in the control group. These relationships were similar when the study participants were segregated with respect to PON1 genotypes;

the correlation coefficients were slightly higher and reflected a lower variance of serum PON1 activity (data not shown).

RELATIONSHIP BETWEEN SERUM PON1 ACTIVITY AND GENOTYPES

The genotype frequencies at both restriction enzyme sites were in Hardy–Weinberg equilibrium. The distributions of the two polymorphisms in the control group and in the patient group with liver disease are shown in Table 3. There were no significant differences in genotype or allele frequencies between cases and controls for either the PON1₁₉₂ or PON1₅₅ polymorphisms. Baseline and stimulated serum PON1 activities as a function of the different polymorphisms are shown in Fig. 2. The mean decreases of serum PON1 activity in the patient groups relative to the control group were similar (~55–65%) and independent of the genotype.

Multiple ANOVA showed that baseline and stimulated serum PON1 activities were significantly influenced ($P < 0.001$) by both the diagnostic group and the polymorphisms PON1₅₅ and PON1₁₉₂, but not by age or gender.

PON1 MEASUREMENT AS A TEST OF LIVER FUNCTION

The results of the ROC analysis for baseline and stimulated PON1 activities, as well as for the standard biochemical tests of liver function, are shown in Table 4 and in Figs. 3 and 4. In patients with chronic hepatitis, the area under the curve (AUC) for baseline PON1 activity was similar to that of ALT, and both were significantly ($P < 0.05$) higher than those of the other tests. In the patients with liver cirrhosis, the AUC for basal PON1 was signif-

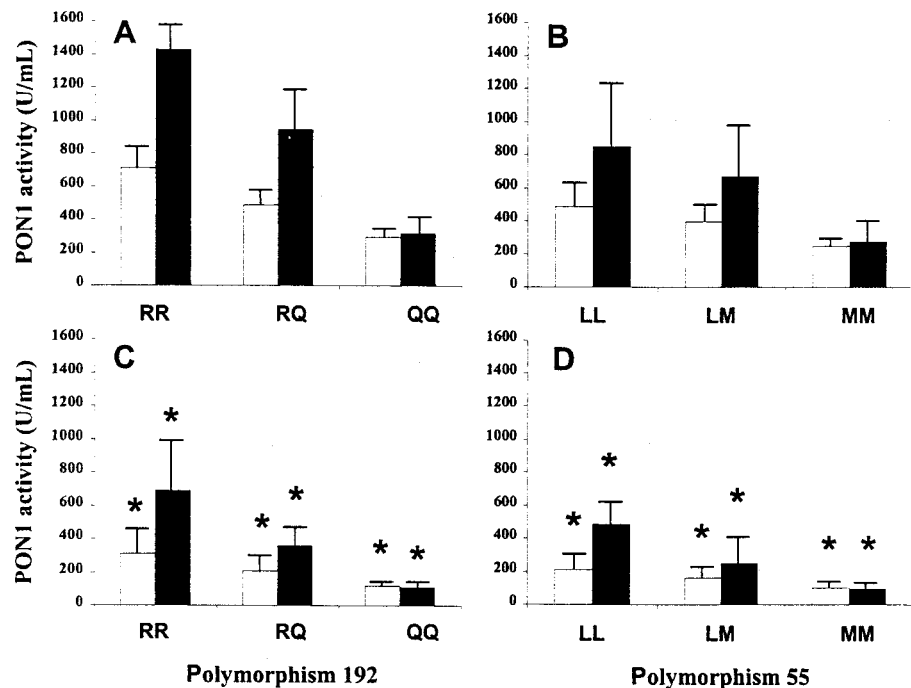


Fig. 2. Baseline (open columns) and stimulated (filled columns) serum PON1 activity in relation to the polymorphisms at positions 192 and 55 in controls (A and B) and in patients with liver disease (hepatitis and cirrhosis grouped together; C and D).

*, $P < 0.001$ with respect to the control group.

Table 4. AUC of ROC plots for serum PON1 activity and the standard liver function tests.

	AUC (95% CI)	
	Chronic hepatitis	Cirrhosis
Baseline PON1	0.89 (0.86–0.93)	0.96 (0.94–0.99)
Stimulated PON1	0.79 (0.74–0.84)	0.88 (0.85–0.91)
ALT	0.90 (0.86–0.95)	0.69 (0.61–0.77)
GGT	0.80 (0.76–0.85)	0.87 (0.83–0.92)
ALP	0.65 (0.59–0.71)	0.78 (0.71–0.85)
Bilirubin	0.69 (0.63–0.76)	0.85 (0.79–0.92)
Albumin	0.60 (0.53–0.67)	0.78 (0.70–0.86)
Total proteins	0.53 (0.46–0.59)	0.53 (0.43–0.62)

icantly higher than that of all the other tests. When ROC analyses were performed with data from patients with the same genotype, the AUC were similar to or better than with the combined groups (baseline PON1, 0.98–0.99; stimulated PON1, 0.96–0.99).

The usefulness of adding basal serum PON1 measurement to the standard panel of liver function tests was analyzed by multiple logistic regression analysis. We compared the ability of two different models to correctly differentiate between patients and controls. The coefficients of the equations of both models are shown in Table 5. The equation for model 1 (standard liver function tests) was: $x = 0.1433(\text{albumin}) - 4.1427(\text{ALT}) - 1.1656(\text{GGT}) - 0.2674(\text{ALP}) - 0.1048(\text{bilirubin}) - 0.2772$. To predict the status of any one individual with respect to

chronic liver disease, the biochemical terms in the equation should be substituted with their corresponding measured values. If the result (x) calculated from the equation is <0 , this classifies the individual as a patient. Similarly, the equation for model 2 (basal PON1 + standard liver function tests) was: $x = 0.0185(\text{albumin}) - 4.5597(\text{ALT}) - 1.0951(\text{GGT}) - 0.0305(\text{ALP}) - 0.0735(\text{bilirubin}) + 0.0172(\text{PON1}) - 0.8575$. Diagnostic sensitivity of model 2 was superior to that of model 1 without any impairment of specificity. Thus, the traditional tests correctly classified 75% [95% confidence interval (CI), 68–81%] of the patients (i.e., sensitivity) and 96% (95% CI, 93–98%) of the controls (i.e., specificity). The addition of serum PON1 activity measurement to the group of standard tests increased the sensitivity of patient classification to 94% (95% CI, 89–97%), whereas the specificity remained unchanged at 96% (95% CI, 93–98%).

Discussion

Recently, serum PON1 has been studied extensively in relation to cardiovascular diseases (25–29), whereas in contrast, there is a paucity of data on the hepatic enzyme. PON1 activity has been observed in rat (30–34) and human (14, 35) hepatic microsomes. Some of this enzyme is secreted into the circulation, bound to HDL (36), whereas another portion is stored in the liver (14). The physiologic role played by PON1 in the liver is unknown, although preliminary observations suggest that this en-

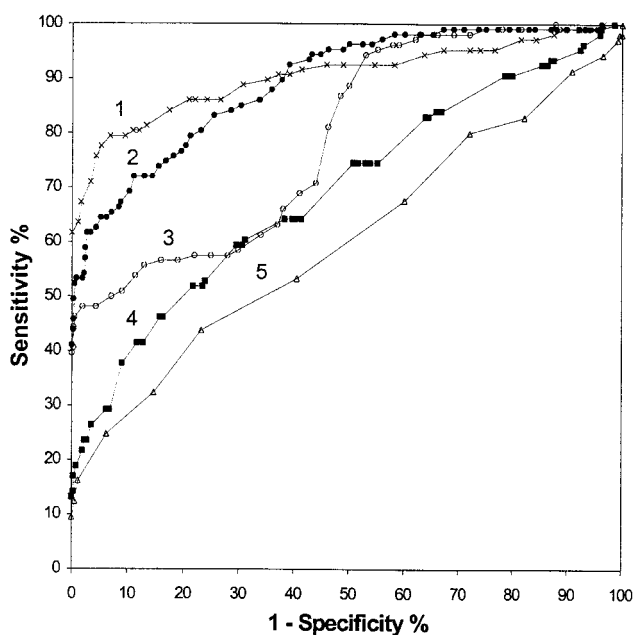


Fig. 3. ROC plots for serum PON1 activity compared with standard biochemical tests in controls ($n = 368$) vs patients with chronic hepatitis ($n = 107$).

1, ALT; 2, baseline PON1; 3, stimulated PON1; 4, bilirubin; 5, albumin. Baseline PON1 activity cutoff was 208 U/mL for 60% sensitivity and 220 U/mL for 95% specificity.

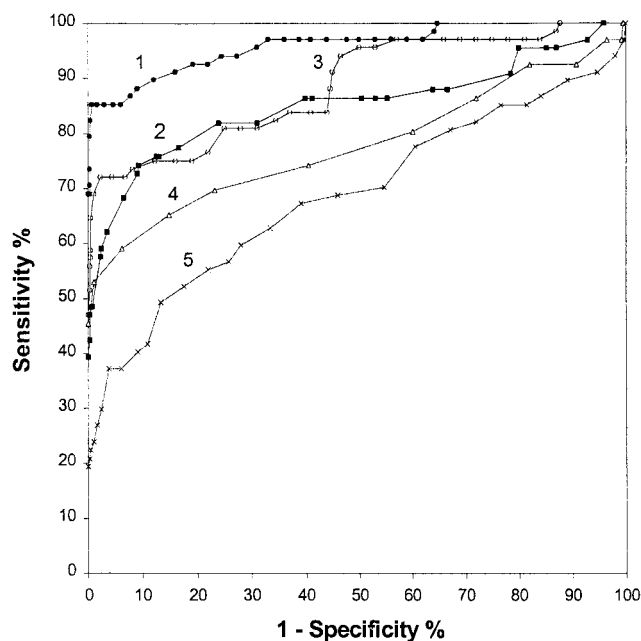


Fig. 4. ROC plots for serum PON1 activity compared with standard biochemical tests in controls ($n = 368$) vs patients with liver cirrhosis ($n = 68$).

1, baseline PON1; 2, stimulated PON1; 3, bilirubin; 4, albumin; 5, ALT. Baseline PON1 activity cutoff was 139 U/mL for 60% sensitivity and 220 U/mL for 95% specificity.

zyme provides hepatic protection against oxidative stress (37).

In the present study, the decrease in PON1 activity in the serum of patients with chronic liver diseases was related to the degree of liver damage. PON1 activity was lower in patients with cirrhosis than in those with hepatitis and was correlated with serum albumin and bilirubin concentrations. Two mechanisms may explain this relationship. In one mechanism, a decrease in PON1 enzymatic activity or gene expression could be the consequence of the hepatic dysfunction. Supporting this hypothesis is the observation of an inhibition of microsomal PON1 activity in rats with chronically administered CCl_4 (37). In the other mechanism, although hepatic PON1 concentrations may be normal, serum PON1 activity could be decreased as a consequence of an altered synthesis and/or secretion of HDL secondary, for example, to impaired lecithin:cholesterol acyl transferase (LCAT) activity. Alterations in HDL structure and concentration associated with decreases in hepatic LCAT activity are frequent in chronic liver diseases (38), and a recent study described a decrease of serum PON1 activity in mice with LCAT deficiency resulting from *LCAT* gene targeted disruption (39).

The main determinant of decreased serum PON1 activity in our study appears to be the severity of liver damage. However, because PON1 activity is also influenced by genetic polymorphisms, an alternative hypothesis would be that of differences in allele or genotype frequency distribution in the patients and the controls. It could be hypothesized, for example, that the associations could be between liver diseases and the Gln allele of the position 192 polymorphism or the Met allele of the position 55 polymorphism. This hypothesis can be dis-

carded because our results indicated that genotype and allele frequencies were similar to those previously published for Caucasian populations in Europe and the US (19, 25–27, 40–42). Also, the distributions were not statistically different between patients with chronic hepatitis and liver cirrhosis or between those with liver cirrhosis and controls. Furthermore, the mean decreases of serum PON1 activity in the patients vs the controls were similar irrespective of the genotype (Fig. 2).

The addition of serum PON1 activity measurement to the ensemble of standard liver function tests may be very useful when testing for liver dysfunction. Chronic liver diseases are slow, progressive diseases characterized by advancing hepatocellular necrosis, inflammation, and fibrosis. The progression is subtle and is not associated with dramatic changes in plasma liver function variables, which often remain within laboratory reference values until gross disease becomes evident. Currently, it is widely accepted that the sensitivities of standard biochemical tests for liver function are low and insufficient for a reliable determination of the presence or absence of liver disease (43). Consequently, a “battery” of tests needs to be performed to increase the sensitivity and specificity of the evaluation. However, in many cases, especially when the status of the disease is not severe, these batteries of tests still fail to classify a high percentage of patients. Indeed, more reliable confirmation of suspected impairment is often achieved with only liver biopsy and histologic examination of the tissue. In the present investigation, the combination of five standard tests incorrectly classified 25% of the patients and misclassified 4% of the controls. On the other hand, the addition of baseline serum PON1 activity measurement to these tests increased the sensitivity without a decrease in the specificity (i.e., only 6% of the patients and 4% of the controls were misclassified). These results demonstrate that serum PON1 activity measurement may add a significant contribution to liver function tests. However, our findings need to be confirmed in other populations to preclude the slight possible bias of the present study, which could result from us having estimated sensitivity and specificity using the same volunteers that we used for describing the model parameters and for validating the model. ROC analysis also supports our proposition that the measurement of baseline serum PON1 activity is a good candidate test for inclusion among those used to evaluate liver damage: its diagnostic accuracy is equivalent to that of ALT in patients with chronic hepatitis and far superior to that of the other tests in patients with cirrhosis.

The measurement of serum PON1 activity is a simple, reliable, fast, inexpensive, readily automated method that is compatible with random access analysis in barcoded primary tubes and can be performed in most automated analyzers used for standard biochemical liver function tests. A drawback of the assay is the toxicity of paraoxon. However, with due care and attention, this should not be a major hazard. Further studies need to be conducted to

Table 5. Coefficients of the two logistic regression analyses.

Variable	Coefficient	SE	P
Model 1: standard biochemical tests			
Albumin	0.1433	0.0396	<0.001
ALT	-4.1427	0.6226	<0.001
GGT	-1.1656	0.3233	<0.001
ALP	-0.2674	0.1719	NS ^a
Bilirubin	-0.1048	0.0306	<0.001
Constant	-0.2772	1.7502	NS
Model 2: basal PON1 and standard biochemical tests			
Albumin	0.0185	0.0501	NS
ALT	-4.5597	0.7883	<0.001
GGT	-1.0951	0.4601	NS
ALP	-0.0305	0.2212	<0.001
Bilirubin	-0.0735	0.0411	NS
PON1	0.0172	0.0024	<0.001
Constant	-0.8575	2.1806	NS

^a NS, not significant.

clarify the mechanisms leading to the decreased serum PON1 activity in liver diseases and the potential pathophysiological implications. However, a practical result of the present study is the demonstration that the relatively simple PON1 activity measurement could significantly improve the current efficiency of a laboratory's evaluation of patients with suspected chronic liver disease.

This work was supported, in part, by a grant from Fondo de Investigaciones Sanitarias (OO/252). N. F. was the recipient of a fellowship from the Generalitat de Catalunya (FP/FIAP 99). We thank Drs. Carles Masip, Domènec Pascual, and Vicente Torrente for help in the clinical evaluation of the patients and Dr. Joan Fernández and Alberto Ameijide for advice in the statistical analysis. Editorial assistance was from Dr. Peter R. Turner of t-SciMed, Reus.

References

1. La Du BN. Human serum paraoxonase/arylesterase. In: Kalow W, ed. Pharmacogenetics of drug metabolism. New York: Pergamon Press, 1992:51–91.
2. La Du BN. Structural and functional diversity of paraoxonases. *Nat Med* 1996;2:1186–7.
3. Primo-Parmo SL, Sorenson RC, Telber J, La Du BN. The human serum paraoxonase/arylesterase gene (*PON1*) is one member of a multigene family. *Genomics* 1996;33:498–507.
4. Mackness B, Durrington PN, Mackness M. Polymorphisms of paraoxonase genes and low-density lipoprotein lipid peroxidation. *Lancet* 1999;353:468–9.
5. Banka CL. High density lipoprotein and lipoprotein oxidation. *Curr Opin Lipidol* 1996;7:139–42.
6. Mackness MI, Arrol S, Durrington PN. Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. *FEBS Lett* 1991;286:152–4.
7. Mackness MI, Arrol S, Durrington PN. Protection of low-density lipoprotein against oxidative modification by high-density lipoprotein associated paraoxonase. *Atherosclerosis* 1993;104:129–35.
8. Mackness MI, Abbott C, Arrol S, Durrington PN. The role of high-density lipoprotein and lipid-soluble antioxidant vitamins in inhibiting low-density lipoprotein oxidation. *Biochem J* 1993;294:829–34.
9. Mackness MI, Durrington PN. HDL, its enzymes and its potential to influence lipid peroxidation. *Atherosclerosis* 1995;115:243–53.
10. Navab M, Berliner JA, Watson AD, Hama SY, Territo MC, et al. The Yin and Yang of oxidation in the development of fatty streak. A review based on the 1994 George Lyman Duff Memorial Lecture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:831–42.
11. Hayek T, Oiknine J, Dankner G, Brook JG, Aviram M. HDL apolipoprotein A-I attenuates oxidative modification of low density lipoprotein: studies in transgenic mice. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1995;33:721–5.
12. Kelso GJ, Stuart WD, Richter RJ, Furlong CE, Jordan-Starck TC, Harmony JA. Apolipoprotein J is associated with paraoxonase in human plasma. *Biochemistry* 1994;33:832–9.
13. Leviev I, Negro F, James RW. Two alleles of the human paraoxonase gene produce different amounts of mRNA. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:2935–9.
14. Gonzalvo MC, Gil F, Hernández AF, Rodrigo L, Villanueva E, Pla A. Human liver paraoxonase (PON1): subcellular distribution and characterization. *J Biochem Mol Toxicol* 1998;12:61–9.
15. Burlina A, Galzigna L. Serum arylesterase isoenzymes in chronic hepatitis. *Clin Biochem* 1974;17:202–5.
16. Burlina A, Michielin E, Galzigna L. Characteristics and behaviour of arylesterase in human serum and liver. *Eur J Clin Invest* 1977;7:17–20.
17. Kawai H, Sakamoto F, Inoue Y. Improved specific assay for serum arylesterase using a water-soluble substrate. *Clin Chim Acta* 1990;188:177–82.
18. Sorenson RC, Primo-Parmo SL, Kuo CL, Adkins S, Lockridge O, La Du BN. Reconsideration of the catalytic center and mechanism of mammalian paraoxonase/arylesterase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:7187–91.
19. Blatter-Garin MC, James RW, Dussoix P, Blanché H, Passa P, Froguel P. Paraoxonase polymorphism Met-Leu54 is associated with modified serum concentrations of the enzyme. *J Clin Invest* 1997;99:62–6.
20. Eckerson HW, Wyte CM, La Du BN. The human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism. *Am J Hum Genet* 1983;35:1126–38.
21. Hasselwander O, McNaster D, Fogarty DG, Peter Maxwell A, Paul Nicholls D, Young IS. Serum paraoxonase and platelet-activating factor acetylhydrolase in chronic renal failure. *Clin Chem* 1998;44:179–81.
22. Humbert R, Adler DA, Distechi CM, Hassett C, Omiecinski CJ, Furlong CE. The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism. *Nat Genet* 1993;3:73–6.
23. Zweig MH, Campbell G. Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clin Chem* 1993;39:561–77.
24. Bruns DE, Huth EJ, Magid E, Young DS. Toward a checklist for reporting studies of diagnostic accuracy of medical tests. *Clin Chem* 2000;46:893–5.
25. Ruiz J, Blanché H, James RW, Blatter Garin MC, Vaisse C, et al. Gln-Arg192 polymorphism of paraoxonase and coronary heart disease in type 2 diabetes. *Lancet* 1995;346:869–72.
26. Serrato M, Marian AJ. A variant of human paraoxonase/arylesterase (*HUMPONA*) gene is a risk factor for coronary artery disease. *J Clin Invest* 1995;96:3005–8.
27. Borigt AP, Connelly PW, Howard Brunt J, Scherer SW, Tsui LC, Hegele RA. Genetic variation in paraoxonase-1 and paraoxonase-2 is associated with variation in plasma lipoproteins in Alberta Hutterites. *Atherosclerosis* 1998;139:131–6.
28. Cao H, Girard-Globa A, Berthezene F, Moulin P. Paraoxonase protection of LDL against peroxidation is independent of its esterase activity towards paraoxon and is unaffected by the Q→R genetic polymorphism. *J Lipid Res* 1999;40:133–9.
29. Aviram M, Hardak E, Vaya J, Mahmood S, Milo S, Hoffman A, et al. Human serum paraoxonases (PON1) Gln and Arg selectively decrease lipid peroxides in human coronary and carotid atherosclerotic lesions. *Circulation* 2000;101:2510–7.
30. Gil F, Pla A, Gonzalvo MC, Hernández AF, Villanueva E. Partial purification of paraoxonase from rat liver. *Chem Biol Interact* 1993;87:69–75.
31. Gil F, Pla A, Gonzalvo MC, Hernández AF, Villanueva E. Rat liver paraoxonase: subcellular distribution and characterization. *Chem Biol Interact* 1993;87:149–54.
32. Gil F, Gonzalvo MC, Hernández AF, Villanueva E, Pla A. Differences in the kinetic properties, effect of calcium and sensitivity to inhibitors of paraoxon hydrolase activity in rat plasma and microsomal fraction from rat liver. *Biochem Pharmacol* 1994;48:1559–68.
33. Hernández AF, Gonzalvo MC, Gil F, Villanueva E, Pla A. Divergent effects of classical inducers on rat plasma and microsomal

- fraction paraoxonase and arylesterase. *Environ Toxicol Pharmacol* 1997;3:83–6.
34. Rodrigo L, Gil F, Hernández AF, Marina A, Vázquez J, Pla A. Purification and characterization of paraoxon hydrolase from rat liver. *Biochem J* 1997;321:595–601.
 35. Gonzalvo MC, Gil F, Hernández AF, Villanueva E, Pla A. Inhibition of paraoxonase activity in human liver microsomes by exposure to EDTA, metals and mercurials. *Chem Biol Interact* 1997;105:169–79.
 36. Navab M, Hama-Levy S, Van Lenten BJ, Fonarow GC, Cardinez CJ, et al. Mildly oxidized LDL induces an increased apolipoprotein J/paraoxonase ratio. *J Clin Invest* 1997;99:2005–19.
 37. Ferré N, Camps J, Cabré M, Paul, A, Joven J. Hepatic paraoxonase activity alterations and free radical production in rats with experimental cirrhosis. *Metabolism* 2001;9:997–1000.
 38. Sabesin SM, Hawkins HL, Kuiken L, Ragland JB. Abnormal plasma lipoproteins and lecithin-cholesterol acyltransferase deficiency in alcoholic liver disease. *Gastroenterology* 1977;72:510–8.
 39. Forte TM, Oda MN, Knoff L, Frei B, Suh J, Harmony JA, et al. Targeted disruption of the murine lecithin:cholesterol acyltransferase gene is associated with reductions in plasma paraoxonase and platelet-activating factor acetylhydrolase activities but not in apolipoprotein J concentration. *J Lipid Res* 1999;40:1276–83.
 40. Herrmann SM, Blanc H, Poirier O, Arveiler D, Luc G, Evans A, et al. The Gln/Arg polymorphism of human paraoxonase (PON 192) is not related to myocardial infarction in the ECTIM study. *Atherosclerosis* 1996;126:299–303.
 41. Antikainen M, Murtomäki S, Syväne M, Pahlman R, Tahvanainen E, Jauhiainen M. The Gln-Arg 191 polymorphism of the human paraoxonase gene (HUMPONA) is not associated with the risk of coronary artery disease in Finns. *J Clin Invest* 1996;98:883–5.
 42. Mackness B, Mackness MI, Arrol S, Turkie W, Durrington PN. Effect of the human serum paraoxonase 55 and 192 genetic polymorphisms on the protection by high density lipoprotein against low density lipoprotein oxidative modification. *FEBS Lett* 1998;423:57–60.
 43. Preisig R, Tygstrup N, Price C. Assessment of liver function. In: Millward-Sadler GH, Wright R, Arthur MJP, eds. *Wright's liver and biliary disease*, 3rd ed. London: WB Saunders, 1992:461–75.

Jordi Camps Andreu, biòleg adjunt dels Laboratoris Clínics i investigador del Centre de Recerca Biomèdica de l'Hospital Universitari de Sant Joan de Reus:

CERTIFICA QUE:

La Tesi Doctoral titulada "**Utilitat de l'enzim paraoxonasa/arilesterasa (PON1) en la investigació de la malaltia cardiovascular i l'hepatopatia**", presentada per Natàlia Ferré i Pallàs, ha estat realitzada sota la meva direcció, i compleix els requeriments necessaris per a optar al títol de Doctora en Biologia.

Per a que així consti i tingui els efectes oportuns, signo la present.

Reus, 19 de desembre de 2002

Dr. Jordi Camps Andreu

1. Justificació.....	1
2. Introducció	5
2.1. L'enzim paraoxonasa.....	7
2.2. Mètodes de mesura	
Mesura de l'activitat paraoxonasa.....	8
Mesura de l'activitat arilesterasa.....	9
Mesura de la concentració	9
2.3. Variants del gen <i>PON1</i> que afecten l'activitat paraoxonasa sèrica.....	10
2.4. Paper fisiològic de la paraoxonasa.....	13
2.5. Paraoxonasa i malaltia cardiovascular	14
2.6. Paraoxonasa i fetge	18
2.7. Paraoxonasa i malaltia hepàtica	19
3. Hipòtesi i objectius.....	23
4. Participants, materials i mètodes.....	27
4.1. Dissenys experimentals	
Estudi 1	29
Estudi 2.....	30
Estudi 3.....	32
4.2. Mètodes	
Determinació de l'activitat paraoxonasa.....	33
Determinació de l'activitat arilesterasa	34
Determinació dels polimorfismes PON1 ₅₅ i PON1 ₁₉₂ del gen <i>PON1</i>	35
Aïllament de microsomes hepàtics	36
Determinació de la peroxidació lipídica	36
Examen histològic de les mostres hepàtiques.....	37
4.3. Anàlisi estadística	40

5. Resultats 43

5.1. Estudi 145

Paraoxonase Gln-Arg (192) and Leu-met (55) gene polymorphisms and enzyme activity in a population with a low rate of coronary heart disease. Clinical Biochemistry 2002; 35: 197-203.

5.2. Estudi 255

Hepatic paraoxonase activity alterations and free radical production in rats with experimental cirrhosis. Metabolism 2001; 50: 997-1000.

5.3. Estudi 361

Serum paraoxonase activity: a new additional test for thr improved evaluation of chronic liver damage. Clinical Chemistry 2002; 48: 261-268.

6. Discussió general, conclusions i perspectives..... 71

6.1. Discussió general.....73

6.2. Conclusions.....76

6.3. Perspectives.....77

7. Referències bibliogràfiques 79

Paraoxonase Gln-Arg(192) and Leu-Met(55) gene polymorphisms and enzyme activity in a population with a low rate of coronary heart disease

Nàtalia Ferré^a, Mònica Tous^a, Antoni Paul^a, Alberto Zamora^b, Juan J. Vendrell^b, Alfredo Bardají^b, Jordi Camps^a, Cristobal Richart^b, Jorge Joven^{a,*}

^aCentre de Recerca Biomèdica, Hospital Universitari de Sant Joan, Reus, Spain

^bServicio de Medicina Interna, Hospital Universitari Joan XXIII. Institut d'Estudis Avançats. Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, Spain

Received 15 November 2001; received in revised form 12 March 2002; accepted 13 March 2002

Abstract

Objectives: To assess whether paraoxonase (PON1) polymorphisms at positions 55 and 192 and/or their phenotypic expressions influence the risk of myocardial infarction (MI) in Spanish population.

Design and methods: Two hundred and fifteen male survivors of a MI and their age-matched controls were included in the study. Lipids, apolipoproteins (apo) A-I and B, PON1 activity on paraoxon and phenylacetate and PON1 polymorphisms were determined.

Results: Genotype distribution was similar in patients and controls. Enzyme activities were lower in patients, but multiple logistic regression analysis did not show any independent association with a higher risk of MI.

Conclusion: None of the PON1 polymorphisms or their corresponding measured activities are independent risk factors for MI in our population. © 2002 The Canadian Society of Clinical Chemists. All rights reserved.

Keywords: Lipids; Mediterranean diet; Myocardial infarction; Oxidation; Paraoxonase

1. Introduction

Oxidative stress in low-density lipoproteins (LDL) is considered to be a major contributor to the atherogenic process, the principal cause of mortality in developed countries [1]. High-density lipoproteins (HDL) are thought to protect LDL from oxidation [2,3] due to the presence of antioxidant enzymes that hydrolyze biologically active lipids in oxidized LDL (oxLDL), among which PON1 seems to be of major importance [4–7]. PON1 is a calcium-dependent esterase, closely associated to HDL in serum, which is known to catalyze the hydrolysis of organophosphates. Its physiologic role, however, has not been totally clarified.

PON1 has two aminoacid polymorphisms. The one at position 192 [glutamine (Q allele)/arginine (R allele)] mod-

ulates the hydrolytic activity of PON1 toward some exogenous substrates—such as paraoxon. The activity of the isoenzymes with glutamine at position 192 is lower while the activity of the isoenzymes with arginine at position 192 is increased by high concentrations of salt. However, this polymorphism does not affect the activity toward other substrates, like phenylacetate [8]. The other polymorphism, located at position 55, [leucine (L allele)/methionine (M allele)], does not affect the intrinsic activity of the enzyme so clearly, although it has been shown to modulate its concentration in plasma [9,10].

Some studies have associated the presence of the R allele or the homozygosity of the L allele with a greater susceptibility to coronary heart disease (CHD) [11–17] but this is still controversial [18–28]. More recently, the PON1 activity phenotype has been shown to be a better predictor of CHD than the PON1 (192) or PON1 (55) genotypes [29]. Our aim was to assess the relationship between PON1 activity and both of these gene polymorphisms in the Spanish population, which has one of the lowest incidences of MI in Western societies [30].

* Corresponding author. Tel.: +34-977-310300; fax: +34-977-312569.

E-mail address: jjoven@grupsgs.com (J. Joven).

2. Methods

2.1. Subjects

The procedures complied with the ethical standards of the Hospital Universitari de Sant Joan and the Hospital Universitari Joan XXIII. As in a previous study [31], we located the medical records of patients registered as having had a MI and invited the surviving male patients who had a history such as that defined by the criteria of the World Health Organization to participate [32]. We made a baseline examination and assessment of the cardiovascular status of the first 215 patients who agreed to take part in the study and who had given informed consent. Samples were obtained 3 to 4 months after the last acute episode. The patients were matched for age (± 5 yr) and body-mass index (± 1.5) with 215 male controls from the same geographical area with no clinical evidence of coronary disease (they were all recruited at their place of work during a routine medical examination).

2.2. Laboratory measurements

DNA was obtained from leukocytes using standard procedures. To determine the polymorphisms at positions 55 and 192, DNA was amplified and analyzed by restriction isotyping as previously described [33].

Only serum drawn after overnight fasting was used for biochemical measurements. After separation the samples were frozen immediately at -70°C until they were analyzed. PON1 activities were measured using the discriminative paraoxon and the nondiscriminative phenylacetate substrates, as previously described [34,35]. Briefly, the baseline and the 1 M NaCl-stimulated rate of hydrolysis of paraoxon (paraoxonase activity) were measured by monitoring the increase in absorbance at 412 nm in an automated assay performed in an ILab 900 automatic analyzer (Instrumentation Laboratories, Milan, Italy). The rate of hydrolysis of phenylacetate (arylesterase activity) was measured by monitoring the absorbance at 270 nm in a spectrophotometer (UVIKON 922, Kontron Instruments, Zurich, Switzerland).

Serum levels for total cholesterol and triglyceride were measured by enzymatic methods (ITC Diagnostics, Barcelona, Spain). HDL cholesterol was measured with a homogeneous assay [36]. Apoprotein (apo) A-I and apo B levels were measured by immunoturbidimetry (BioKit, Barcelona, Spain).

2.3. Statistical analysis

The normality of the sample distribution of each continuous variable was tested with the Kolmogorov-Smirnov test. Since some measurements (paraoxonase and arylesterase activities and triglyceride and apo B concentrations) did not present with normal distributions, their values were

Table 1

Main characteristics of the populations studied. Continuous variables are expressed as mean \pm SD

	Controls (n = 215)	Myocardial infarction (n = 215)
Age in years	62.1 \pm 16.4	60.6 \pm 11.8
Body-mass index, kg/m ²	26.2 \pm 3.5	27.1 \pm 4.2
Diabetes, n (%)	9 (4.2)	35 (16.3) ^b
Hypertension, n (%)	8 (3.7)	52 (24.2) ^b
Current or former smoker, n (%)	72 (33.4)	151 (70.2) ^b
Cholesterol, mmol/L	5.27 \pm 1.21	5.71 \pm 1.10 ^b
HDL-cholesterol, mmol/L	1.23 \pm 0.42	1.11 \pm 0.35 ^b
Triglyceride, mmol/L	1.52 \pm 0.91	1.97 \pm 1.12 ^b
Apo A1, g/L	1.38 \pm 0.25	1.22 \pm 0.43 ^a
Apo B, g/L	1.10 \pm 0.33	1.25 \pm 0.32 ^a
Paraoxonase activity (U/L), Baseline	265 \pm 54	214 \pm 85 ^a
Stimulated	442 \pm 146	375 \pm 112 ^a
Arylesterase activity (KU/L)	92 \pm 21	89 \pm 24

^a $p < 0.05$,

^b $p < 0.005$ with respect to controls.

log-transformed before the statistical analysis. One-way analysis of variance or the nonparametric Mann-Whitney U test was used. Allele frequencies were estimated by the gene-counting method and Hardy-Weinberg's equilibrium was tested by the chi-square test. The strength of the association of the selected variables with the occurrence of myocardial infarction was estimated by calculating the odds ratios with Epi-Info (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta). Logistic regression was used to assess the ability to predict case status and to ascertain the independence of the cardiovascular risk factors. Statistical assessment was carried out using SPSS/PC + 10.0 (SPSS, Chicago, IL, USA). A significant difference was defined as a two-tailed $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Study population and cardiovascular risk factors

Patients with MI were relatively young and the serum concentrations of HDL cholesterol and apo A-I were lower than in controls. The serum concentrations of cholesterol, triglycerides and apo B were higher in patients than in controls (Table 1). As expected, the prevalence of diabetes, hypertension and cigarette smoking was also higher in patients than in controls. Arylesterase activity was similar in patients and in controls but the paraoxonase activity (baseline and stimulated) was significantly lower in patients. Table 2 shows the odds ratios for the selected risk factors. The odds ratios for plasma triglycerides, apo A-I, apo B and the PON1 genotypes did not show any significant association with the presence of disease when compared with the age-matched controls. The risk factors associated with the

Table 2
Odds ratios for cardiovascular risk factors

	OR	95% CI
Hypertension	5.12	2.55–8.65
Smoking status	3.99	2.46–5.23
Diabetes	2.51	1.12–3.02
Plasma cholesterol	2.24	1.81–4.57
HDL-cholesterol	3.86	2.41–6.54
Plasma triglyceride	0.93	0.62–1.40
Apo A-I	0.53	0.13–2.21
Apo B	0.90	0.16–5.07
Baseline paraoxonase	2.85	1.89–3.65
Stimulated paraoxonase	2.45	1.17–2.99
Arylesterase	1.01	0.99–1.03
Carriers of the R allele	1.30	0.90–1.87
Carriers of the L allele	0.96	0.66–1.40

highest estimated odds ratio were the presence of hypertension, smoking status and HDL cholesterol. The significances were confirmed with a multiple logistic-regression model that adjusted for the presence of other cardiovascular risk factors. However, 56% of the risk of developing MI in this population was already attributable to hypertension, smoking, plasma cholesterol and HDL cholesterol.

3.2. Genotypes do not predict myocardial infarction

Table 3 summarizes the genotyping data. These genotype distributions were in Hardy-Weinberg equilibrium. There were no statistical differences in the PON1 (55) and PON1 (192) genotype or the allele distribution between case patients and age-matched controls. Neither were there any differences in the frequencies of combined haplotypes (Table 3). A previously described linkage disequilibrium [8], which produced arginine at position 192 and leucine at position 55, was also observed in our sample (Table 3). The PON1 (55), PON1 (192) and combined haplotypes did not predict case status by use of logistic regression.

3.3. Influence of PON1 polymorphisms on enzyme activities

When the enzyme activities were plotted according to the polymorphisms studied, it was evident that PON1 (55) and PON1 (192) polymorphisms greatly influenced baseline and stimulated paraoxonase activities but arylesterase was less influenced. There were also some statistically significant differences in paraoxonase and arylesterase activities between patients and controls (Fig. 1) that disappeared when the haplotypes were considered. Table 4 shows the enzyme activities of the haplotypes for the whole group. The Met-Leu55 polymorphism influenced the hydrolysis of both substrates. The activity of isoenzymes with methionine at codon 55 was lower. Serum PON1 activity increased in the order MM < ML < LL in both the patient and control groups. There was also a good correlation between the

Table 3
PON1 (192) and PON1 (55) genotypes and combined haplotype distributions

	Controls, n (%)	Patients, n (%)	OR (95% CI)
PON1 (192) genotypes			
QQ	106 (49.3)	105 (48.8)	
QR	93 (43.2)	87 (40.4)	
RR	16 (7.5)	23 (10.8)	
Alleles			
Q (Gln)	0.75	0.69	
R (Arg)	0.25	0.31	
PON1 (55) genotypes			
MM	38 (17.7)	30 (14.1)	
ML	91 (42.3)	107 (49.7)	
LL	86 (40.0)	78 (36.2)	
Alleles			
M (Met)	0.39	0.39	
L (Leu)	0.61	0.61	
Combined			
QQ/MM	36 (16.7)	27 (12.6)	1.49 (0.70–2.81)
QQ/ML	46 (21.4)	51 (23.7)	0.81 (0.45–1.45)
QQ/LL	24 (11.2)	27 (12.6)	0.85 (0.43–1.67)
QR/MM	2 (0.9)	3 (1.4)	—
QR/ML	46 (21.4)	54 (25.1)	0.72 (0.41–1.29)
QR/LL	45 (20.9)	30 (13.9)	1.70 (0.89–3.10)
RR/MM	0	0	—
RR/ML	0	0	—
RR/LL	16 (7.4)	23 (10.7)	0.63 (0.30–1.35)

Q refers to Glutamine and R to Arginine at position 192; L refers to Leucine and M to Methionine at position 55.

baseline and stimulated paraoxonase activities within the PON1 (192) genotypes or combined haplotypes, and the activity increased in the order QQ < QR < RR. The linkage disequilibrium that associated L and R alleles, and which led to a greater proportion of R allele carriers among the L allele carriers than among the M allele carriers, may explain the different activity toward paraoxon.

3.4. The effect of PON1 activities is not independent of other risk factors

As expected, serum baseline and stimulated paraoxonase activity phenotypes significantly predicted CHD cases vs. controls (Baseline paraoxonase: $R^2 = 0.489$; $B = 0.052$; $p = 0.032$. Stimulated paraoxonase: $R^2 = 0.510$; $B = 0.103$; $p = 0.015$, respectively). Logistic regression was used with age as a covariate. However, when PON1 (192), PON1 (55) genotypes or combined haplotypes were added to paraoxonase in the prediction model, the effects were no longer significant. A similar effect was observed when the prediction model was adjusted for total cholesterol, HDL-cholesterol, triglycerides, apoA-I and apo B.

4. Discussion

There is increasing evidence showing that serum PON1 is related to the prevention of CHD [11–17]. According to

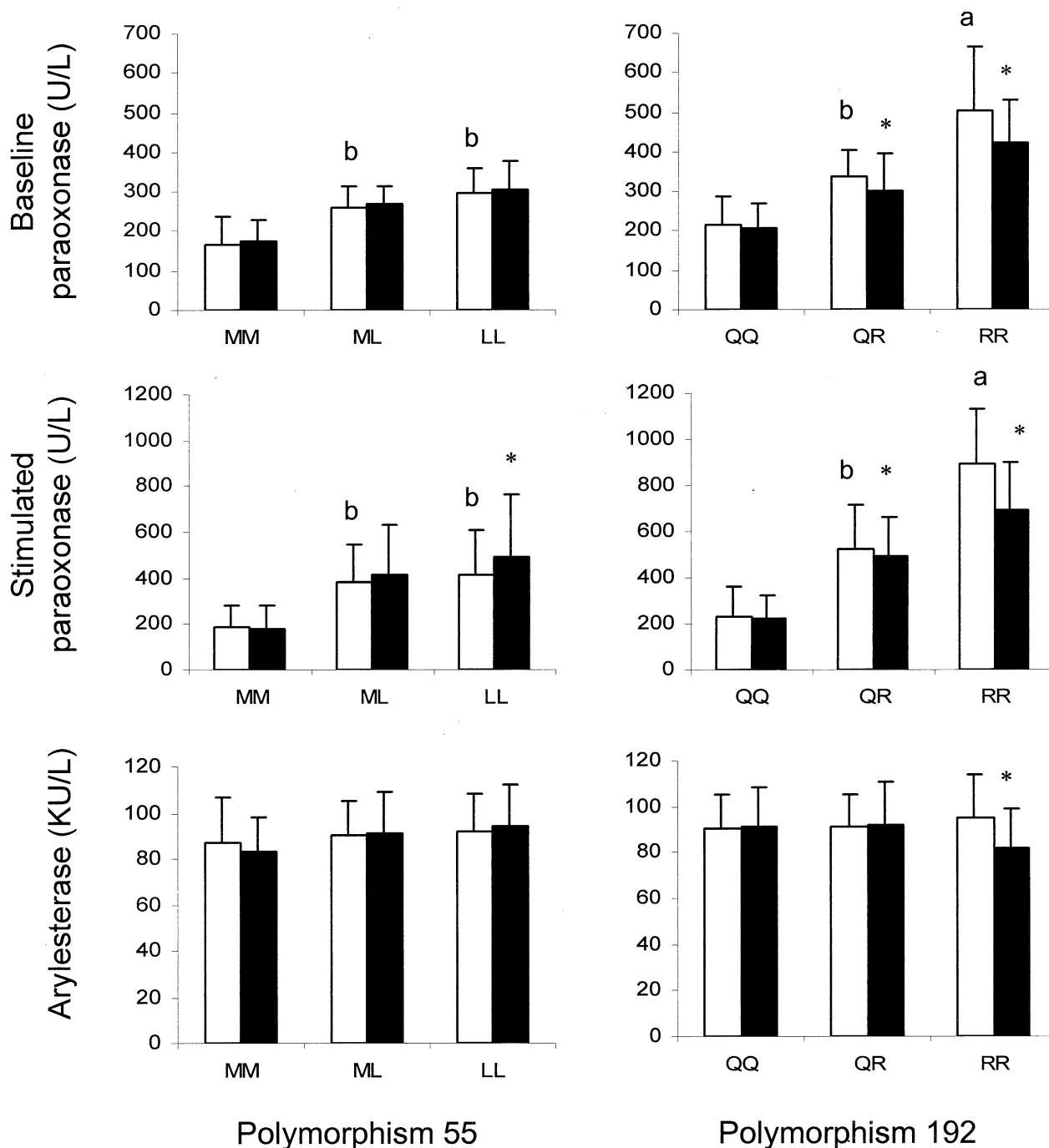


Fig. 1. Serum PON activities in patients (black bars) and controls (white bars) according to the 55 and 192 gene polymorphisms. *p < 0.05 with respect to controls; ^ap < 0.05 with respect to the other two genotypes; ^bp < 0.05 with respect to QQ or MM, respectively.

the oxidation hypothesis of atherosclerosis, this enzyme prevents lipoperoxides from accumulating in LDL particles [3–5]. Consequently, considerable research has been done to determine its physiological role and the functional differences between its isoenzymes. The Gln-Arg192 and Leu-Met55 polymorphisms are known to affect PON1 activity using paraoxon as a substrate and, therefore, both genotypes should be included in association studies although, to our knowledge, previous data are scarce [29].

In a Spanish sample, we found no significant differences in genotype and allele frequencies for PON1 polymorphisms at positions 55 and 192 between control subjects and patients with MI. The frequencies were similar to those described for other Caucasian populations [8,10,12,17,18], although the variability and discrepancies were considerable even in studies conducted in the same ethnic population. These discrepancies may be related to the effects caused by other genes as PON2 [37] or to posttranslational modifica-

Table 4
Baseline stimulated (in the presence of 1M of NaCl) paraoxonase and arylesterase activities (mean±SD) in the whole group (n=430)

	QQ	QR	RR	ANOVA P value
Baseline				
Paraoxonase (U/L)				
MM	167 ± 34	236 ± 163	—	<0.0001
ML	211 ± 59	298 ± 68	—	<0.0001
LL	246 ± 62	315 ± 82	434 ± 118	<0.0001
P value	<0.0001	0.0056		
Stimulated				
Paraoxonase (U/L)				
MM	163 ± 54	286 ± 290	—	<0.0001
ML	236 ± 141	480 ± 176	—	<0.0001
LL	271 ± 115	546 ± 180	876 ± 240	<0.0001
P value	<0.0001	0.0048		
Arylesterase (KU/L)				
MM	83 ± 15	82 ± 20	—	NS
ML	93 ± 17	91 ± 19	—	NS
LL	98 ± 16	95 ± 19	92 ± 17	NS
P value	0.028	0.043		

Q refers to Glutamine and R to Arginine at position 192; L refers to Leucine and M to Methionine at position 55.

tions of the enzyme. However, we found that paraoxonase activity was significantly lower in survivors of MI. It is obvious, therefore, that if the genotype distribution in patients is not different from that in controls, these genetic polymorphisms or combined haplotypes cannot be the cause of the difference in PON1 activity between them.

In our sample, however, the two polymorphisms were associated with PON1 activity, which increased in the order of the QQ < QR < RR genotype in the PON1 (192) polymorphism and MM < ML < LL genotype in the PON1 (55) polymorphism. In our cohort, then, the genotype is seen to have an effect. The lower activity of PON1 using paraoxon as a substrate observed in our patients suggests that there is an association between paraoxonase and CHD, but the relationship seems to be weak (OR = 2.85) as compared with that of hypertension (OR = 5.12) or smoking status (OR = 3.99) (Table 2). Our patients, however, were survivors of myocardial infarction; a possible selection bias cannot be excluded. Patients who did not survive may have a different prevalence of this risk factor. In our patients, the association with well-known cardiovascular factors was stronger in terms of the estimated odds ratio and these conventional factors explain most of the attributable risk. Moreover, when we added these variables to the prediction model in a regression analysis, paraoxonase was no longer a statistically significant factor. Therefore, in accordance with previous results [19–26], our data suggest that differences in PON1 do not affect healthy individuals. Interestingly, however, most of the associations between PON1 polymorphisms and higher cardiovascular risk have been found in diabetics. The different protection of PON1 isoenzymes may therefore only be evident in individuals with

certain additional cardiovascular risk factors or increased oxidative stress.

Although association studies into multifactorial diseases have played a key role in implicating some genes in MI, they do have certain limitations [38]. The PON1 genotypes do not seem to be the cause of the disease, and the positive association is probably dependent on the characteristics of the population studied [11–13]. However, these genotypes may still interact with other inherited traits to cause the disease process and some modifiers of paraoxonase activity not reflected by these two polymorphisms may play a role in atherogenesis. To illustrate this point it can be mentioned a recent finding by our group describing an interaction between apo E and PON1 (55) polymorphisms that affect PON1 activity [39].

Other factors should be considered in an attempt to shed some light on these confusing results. It has been suggested that some isoenzymes may protect LDL from oxidative modifications more effectively than others [40–43]. This suggestion, however, has raised considerable controversy. It may also be possible that the antioxidant effect of some PON1 isoenzymes prevents certain processes that are closely connected to the development of CHD and their effects are only detectable under stress conditions [44,45]. Diet should also be considered. One of the characteristics of the Mediterranean diet is that it is high in antioxidants and low in cooking-related oxidants. This decreases the waste of nutritional and endogenous antioxidants and may mask quantitative and functional changes in serum paraoxonase [46,47]. Similar effects have been observed with a moderate daily consumption of alcohol [48]. Moreover, a high intake of antioxidants can preserve the activity of the enzyme and its capacity to hydrolyze hydroperoxides [49–51], and the concentration of PON1 in populations with traditional Western-type diets is lower than in Mediterranean populations [39,52].

In summary, there is no association between the PON1 (192) and PON1 (55) genotypes and increased risk of myocardial infarction in our population but patients have lower plasma paraoxonase activity than controls. Further studies are needed to ascertain the role of antioxidants in preventing CHD.

Acknowledgements

Supported by grants 98/0425, 99/0901 and 00/0291 from the Fondo de Investigaciones Sanitarias. N. Ferré was supported by grant FI/FIAP 99 from the Generalitat de Catalunya.

References

- [1] Tribble DL. Lipoprotein oxidation in dyslipidemia: insights into general mechanisms affecting lipoprotein oxidative behaviour. *Curr Opin Lipidol* 1995;6:196–208.

- [2] Parthasarathy S, Barnett J, Fong LG. High-density lipoprotein inhibits the oxidative modification of low-density lipoprotein. *Biochim Biophys Acta* 1990;1044:275–83.
- [3] Klimov AN, Gurevich VS, Nikiforova AA, et al. Antioxidative activity of high density lipoproteins in vivo. *Atherosclerosis* 1993;100:13–8.
- [4] Mackness MI, Arrol S, Durrington PN. Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. *FEBS Lett* 1991;286:152–4.
- [5] Watson AD, Berliner JA, Hama SY, et al. Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase. *J Clin Invest* 1995;96:2882–91.
- [6] Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL, Newton RS, Primo-Parmo SL, La Du BN. Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. *J Clin Invest* 1998;101:1581–90.
- [7] Durrington PN, Mackness B, Mackness MI. Paraoxonase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:473–80.
- [8] Eckerson HW, Wyte CM, La Du BN. The human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism. *Am J Hum Genet* 1983;35:1126–38.
- [9] Blatter Garin M-C, James RW, Dussoix P, et al. Paraoxonase polymorphism Met-Leu54 is associated with modified serum concentrations of the enzyme. *J Clin Invest* 1997;99:62–6.
- [10] Leviev I, Negro F, James RW. Two alleles of the human paraoxonase gene produce different amounts of mRNA. An explanation for differences in serum concentrations of paraoxonase associated with the (Leu-Met54) polymorphism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:2935–9.
- [11] Serrato M, Marian AJ. A variant of human paraoxonase/arylesterase (HUMPONA) gene is a risk factor for coronary artery disease. *J Clin Invest* 1995;96:3005–8.
- [12] Sanghera DK, Saha N, Aston CE, Kamboh MI. Genetic polymorphism of paraoxonase and the risk of coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:1067–73.
- [13] Ruiz J, Blanche H, James RW, et al. Gln-Arg192 polymorphism of paraoxonase and coronary heart disease in type 2 diabetes. *Lancet* 1995;346:869–72.
- [14] Pfohl M, Koch M, Enderle MD, et al. Paraoxonase 192 Gln/Arg gene polymorphism, coronary artery disease, and myocardial infarction in type 2 diabetes. *Diabetes* 1999;48:623–7.
- [15] Aubó C, Sentí M, Marrugat J, et al. Risk of myocardial infarction associated with Gln/Arg 192 polymorphism in the human paraoxonase gene and diabetes mellitus. *Eur Heart J* 2000;21:33–8.
- [16] Zama T, Murata M, Matsubara Y, et al. A 192 Arg variant of the human paraoxonase (HUMPONA) gene polymorphism is associated with an increased risk for coronary artery disease in the Japanese. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:3565–9.
- [17] Odawara M, Tachi Y, Yamashita K. Paraoxonase polymorphism (Gln192-Arg) is associated with coronary heart disease in Japanese noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocr Metab* 1997;82:2257–60.
- [18] Herrmann SM, Blanc H, Poirier O, et al. The Gln/Arg polymorphism of human paraoxonase (PON 192) is not related to myocardial infarction in the ECTIM study. *Atherosclerosis* 1996;126:299–303.
- [19] Antikainen M, Murtomäki S, Syväne M, et al. The Gln-Arg192 polymorphism of the human paraoxonase gene (HUMPONA) is not associated with the risk of coronary artery disease in Finns. *J Clin Invest* 1996;98:883–5.
- [20] Cao H, Girard-Globa A, Serusclat A, et al. Lack of association between carotid intima-media thickness and paraoxonase polymorphism in non-insulin dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 1998;138:361–6.
- [21] Cascorbi I, Laule M, Mrozikiewicz PM, et al. Mutations in the human paraoxonase 1 gene: frequencies, allelic linkages, and association with coronary artery disease. *Pharmacogenetics* 1999;9:755–61.
- [22] Dessi M, Gnasso A, Motti C, et al. Influence of the human paraoxonase polymorphism (PON1 192) on the carotid-wall thickening in a healthy population. *Coronary Artery Dis* 1999;10:595–9.
- [23] Hasselwander O, Savage DA, McMaster D, et al. Paraoxonase polymorphisms are not associated with cardiovascular risk in renal transplant recipients. *Kidney Int* 1999;56:289–98.
- [24] Malin R, Huang XH, Wirta O, et al. The Met54Leu polymorphism of paraoxonase (PON) enzyme gene is not a genetic risk factor for non-insulin-dependent diabetes mellitus in Finns. *Clin Genet* 1998;54:254–5.
- [25] Ombres D, Pannitteri G, Montali A, et al. The Gln-Arg192 polymorphism of human paraoxonase gene is not associated with coronary artery disease in Italian patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:1611–6.
- [26] Sanghera DK, Saha N, Kamboh MI. The codon 55 polymorphism in the paraoxonase 1 gene is not associated with the risk of coronary heart disease in Asian Indians and Chinese. *Atherosclerosis* 1998;136:217–23.
- [27] Rice GI, Ossei-Gerning N, Stickland MH, Grant PJ. The paraoxonase Gln-Arg 192 polymorphism in subjects with ischaemic heart disease. *Coronary Artery Dis* 1997;8:677–82.
- [28] Hong SH, Song J, Min WK, Kim JQ. Genetic variations of the paraoxonase gene in patients with coronary artery disease. *Clin Biochem* 2001;34:475–81.
- [29] Jarvik GP, Rozek LS, Brophy VH, et al. Paraoxonase (PON1) phenotype is a better predictor of vascular disease than is PON1₁₉₂ or PON1₅₅ genotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:2441–7.
- [30] Tunstall H, Kuulasmaa K, Amouyel P, Arveiler D, Rajakangas AM, Pajak A. Myocardial infarction and coronary deaths in the World Health Organization MONICA project. *Circulation* 1994;90:583–612.
- [31] Joven J, Simó JM, Vilella E, et al. Lipoprotein(a) and the significance of the association between platelet glycoprotein IIIa polymorphisms and the risk of premature myocardial infarction. *Atherosclerosis* 1998;140:155–9.
- [32] Report of the Joint International Society, and Federation of Cardiology/World Health Organization Task Force on Standardization of Clinical Nomenclature: nomenclature and criteria for diagnosis of ischemic heart disease. *Circulation* 1979;59:607–30.
- [33] Humbert R, Adler DA, Disteche CM, Hassett C, Omiecinski CJ, Furlong CE. The molecular basis of the serum paraoxonase activity polymorphism. *Nat Genet* 1993;3:73–6.
- [34] Hasselwander O, McMaster D, Fogarty DG, Maxwell AP, Nicholls DP, Young IS. Serum paraoxonase and platelet-activating factor acetylhydrolase in chronic renal failure. *Clin Chem* 1998;44:179–81.
- [35] Ferré N, Camps J, Cabré M, Paul A, Joven J. Hepatic paraoxonase activity alterations and free radical production in rats with experimental cirrhosis. *Metabolism* 2001;50:997–1000.
- [36] Gómez F, Camps J, Simó JM, Ferré N, Joven J. Agreement study of methods based on the elimination principle for the measurement of LDL- and HDL-cholesterol compared with ultracentrifugation in patients with liver cirrhosis. *Clin Chem* 2000;46:1188–91.
- [37] Boright AP, Connelly PW, Brunt JH, Scherer SW, Tsui LC, Hegele RA. Genetic variation in paraoxonase-1 and paraoxonase-2 is associated with variation in plasma lipoproteins in Alberta Hutterites. *Atherosclerosis* 1998;139:131–6.
- [38] Lander ES, Schork NJ. Genetic dissection of complex traits. *Science* 1994;265:2037–43.
- [39] Murphy M, Vilella E, Ceruelo S, et al. The MTHFR C677T, APOE, and PON55 gene polymorphisms show relevant interactions with cardiovascular risk factors. *Clin Chem* 2002;48:372–5.
- [40] Mackness B, Mackness MI, Durrington PN, et al. Paraoxonase activity in two healthy populations with differing rates of coronary heart disease. *Eur J Clin Invest* 2000;30:4–10.
- [41] Mackness B, Mackness MI, Arrol S, Turkie W, Durrington PN. Effect of the human serum paraoxonase 55 and 192 genetic polymorphisms on the protection by high density lipoprotein against low density lipoprotein oxidative modification. *FEBS Lett* 1998;1423:57–60.
- [42] Aviram M, Billecke S, Sorenson R, et al. Paraoxonase active site required for protection against LDL oxidation involves its free sulf-

- hydriyl group and is different from that required for its arylesterase/paraoxonase activities. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:1617–24.
- [43] Cao H, Girard-Globa A, Berthezene F, Moulin P. Paraoxonase protection of LDL against peroxidation is independent of its esterase activity towards paraoxon and is unaffected by the Q→R genetic polymorphism. *J Lipid Res* 1999;40:133–9.
- [44] Bauters C, Amant C, Boulter A, et al. Paraoxonase polymorphism (Gln192Arg) as a determinant of the response of human coronary arteries to serotonin. *Circulation* 2000;101:740–3.
- [45] Ikeda Y, Suehiro T, Inoue M, et al. Serum paraoxonase activity and its relationship to diabetic complications in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism* 1998;47:598–602.
- [46] Ghiselli A, D'Amicis A, Giacosa A. The antioxidant potential of the Mediterranean diet. *Eur J Cancer Prev* 1997;6:S15–9.
- [47] Sutherland WH, Walker RJ, de Jong SH, van Rij AM, Phillips V, Walker HL. Reduced postprandial serum paraoxonase activity after a meal rich in used cooking fat. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:1340–7.
- [48] van der Gaag MS, van Tol A, Scheck LM, James RW, Urgert R, Schaafsma G, Hendriks HF. Daily moderate alcohol consumption increases serum paraoxonase activity: a diet-controlled, randomised intervention study in middle-aged men. *Atherosclerosis* 1999;147:405–10.
- [49] Aviram M, Rosenblat M, Billecke S, et al. Human serum paraoxonase (PON 1) is inactivated by oxidized low density lipoprotein and preserved by antioxidants. *Free Rad Biol Med* 1999;26:892–904.
- [50] Hayek T, Fuhrman B, Vaya J, et al. Reduced progression of atherosclerosis in apolipoprotein E deficient mice following consumption of red wine, or its polyphenols quercetin or catechin, is associated with reduced susceptibility of LDL to oxidation and aggregation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:2744–52.
- [51] Aviram M. Does paraoxonase play a role in susceptibility to cardiovascular disease? *Mol Med Today* 1999;5:381–6.
- [52] Blatter Garin M-C, Abbott C, Messmer S, et al. Quantification of human serum paraoxonase by enzyme-linked immunoassay: population differences in protein concentrations. *Biochem J* 1994;304:549–54.

PRELIMINARY REPORT

Hepatic Paraoxonase Activity Alterations and Free Radical Production in Rats With Experimental Cirrhosis

Natàlia Ferré, Jordi Camps, Maria Cabré, Antoni Paul, and Jorge Joven

Relationships between hepatic antioxidant paraoxonase (PON1) activity, lipid peroxidation, and liver injury were investigated in rats with CCl₄-induced cirrhosis. The study was performed in 60 CCl₄-treated rats and 60 control animals receiving a standard diet or one supplemented with zinc. Subsets of 10 animals each were killed at weeks 1, 5, and 7 of the study. Results showed that PON1 significantly decreased in rats given CCl₄ alone compared with control animals. This effect was partially reversed in animals receiving zinc. Conversely, lipid peroxides were significantly increased in rats given CCl₄ alone and returned to approximately normal values in animals receiving zinc supplement. PON1 was inversely correlated with lipid peroxidation in all the animals studied. These alterations coincided with changes in serum alanine aminotransferase activity. *In vitro* incubation of isolated microsomes with CCl₄ or malondialdehyde did not produce any significant changes in PON1, indicating that the decrease in PON1 in CCl₄-treated animals was not secondary to a direct inhibitory effect of lipid peroxidation products. These data show a time course and quantitative relationship between PON1 activity and lipid peroxidation in rats with CCl₄-induced cirrhosis and suggest that this enzyme plays a significant role within the antioxidant systems in liver microsomes.

Copyright © 2001 by W.B. Saunders Company

PARAOXONASE (PON1; arylalkylphosphatase E.C. 3.1.8.1) is an ester hydrolase that catalyzes the hydrolysis of organophosphorates and other xenobiotics.¹ The enzyme is found in several tissues, predominantly in the liver,^{2,3} and also in serum, in which it is bound to high-density lipoproteins (HDL).⁴ Its physiologic role is still unclear, although evidence exists for a protective effect of PON1 against oxidative stress.⁵ Being tightly associated with HDL, PON1 may be involved in the protection conferred by HDL on low-density lipoprotein (LDL) oxidation⁶ and, as such, with aspects of cardiovascular disease.

In contrast, there is a paucity of data on the hepatic enzyme. Rat and human liver PON1 are essentially microsomal enzymes associated with vesicles derived from the endoplasmic reticulum.^{7,8} An antioxidant hepatoprotective role may be readily hypothesized for hepatic PON1 because liver microsomes are the major sites for the catabolism of xenobiotic compounds, reactions in which increases in free radical species are observed. Several studies have suggested that oxidative stress plays an important role in the pathogenesis of liver diseases.^{9,10} The effects of antioxidants on the production of lipid peroxides and fibrogenesis have been investigated in models of experimental cirrhosis. For example, addition of zinc, a metal known to regulate several intracellular antioxidant systems,¹¹ to the diet has been associated with decreases in lipid peroxidation products and collagen synthesis, as well as with hepatic histologic and functional amelioration in rats treated with CCl₄.¹⁰

In view of these observations and the absence of data on the possible alterations of liver PON1 in cirrhosis, we decided to investigate the relationships between hepatic microsomal PON1 activity, lipid peroxidation and the progress of the disease in rats with CCl₄-induced cirrhosis. Further, we assessed the modulation of these processes by the dietary administration of zinc.

MATERIALS AND METHODS

In Vivo Experiment

The study was performed in 60 male Wistar rats submitted to a CCl₄ cirrhosis-induction program¹² and in 60 control animals. At the start of

the experiment, control and CCl₄-treated rats were divided into 4 groups (n = 30): group A, control rats fed with a standard diet (Panlab, Barcelona, Spain); group B, control rats fed with standard diet plus a supplement of zinc (227 mg/L of ZnSO₄ dissolved in the drinking water); group C, CCl₄-treated rats fed with a standard diet; group D, CCl₄-treated rats fed with a standard diet plus the supplement of zinc. Subsets of 10 animals from each group were sacrificed at weeks 1, 5, and 7 of the study. All animals received humane care in compliance with our institution's criteria for the care and use of laboratory animals.

Analytical Measurements

Livers were processed to obtain whole homogenates and microsome fractions as previously described.¹³ The determination of PON1 activity in rat liver microsomes was analyzed by measuring the rate of hydrolysis of paraoxon.¹⁴ Arylesterase activity was analyzed, as an indirect estimation of PON1 protein concentration,¹⁵ by measuring the rate of hydrolysis of phenylacetate.¹⁴ Units of PON1 and arylesterase activity were defined as in the report of Hasselwander et al.¹⁶ The production of lipid peroxides was measured in rat whole-liver homogenates by the thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) method.¹⁷ Serum alanine aminotransferase (ALT) was analyzed, as an index of hepatic necrosis, by the International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) method, which uses L-alanine and oxoglutarate as substrates (ITC Diagnostics, Barcelona, Spain). Protein concentration in liver fractions was determined by the colorimetric technique of pyrogallol red (ITC Diagnostics). Sections of liver specimens were

From the Centre de Recerca Biomèdica, Institut de Recerca en Ciències de la Salut (IRCS), Hospital Universitari de Sant Joan de Reus and the Unitat de Bioquímica, Universitat Rovira i Virgili; Reus, Catalunya, Spain.

Submitted October 9, 2000; accepted March 30, 2001.

Supported by a grant from the Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS 00/0252). N.F. received a grant from the Generalitat de Catalunya (FI/FIAP-99).

Address reprint requests to Jordi Camps, PhD, Centre de Recerca Biomèdica, Hospital Universitari de Sant Joan, C/Sant Joan s/n, 43201 Reus, Catalunya, Spain.

Copyright © 2001 by W.B. Saunders Company

0026-0495/01/5009-0002\$35.00/0

doi:10.1053/meta.2001.25589

stained with hematoxylin, reticulin, and Masson trichrome stains for histologic examination.

In Vitro Study

The possible effects of CCl_4 and of malondialdehyde (MDA) on microsomal PON1 activity were investigated by incubating these compounds at 37°C for 30 minutes with isolated microsomes obtained from normal rats in an incubation medium containing ATP (0.1 mmol/L), NADPH (0.1 mmol/L), and an NADPH regenerating system.¹⁸ CCl_4 was added to the incubation mixture at concentrations of 9, 27, and 81 mmol/L. MDA was added at 15, 45, and 135 $\mu\text{mol/L}$. The concentrations of these 2 compounds in this experiment were similar to those previously used in studies on free radical generation in isolated liver microsomes.¹⁹ Experiments were performed in triplicate.

RESULTS AND DISCUSSION

Histopathologic assessment of the hepatic tissue indicated a normal architecture in all of the control animals (groups A and B). Rats given CCl_4 alone (group C) had normal livers at week one; at week 5, 6 of the 10 animals' livers were fibrotic and 4 were cirrhotic. By week 7, most of the rats (8 of 10) in this group were diagnosed as cirrhotic. The rate of progress of the disease was delayed by zinc administration (group D). In rats given CCl_4 and zinc, fibrosis was observed in all the rats at week 5 and cirrhosis was observed at week 7 in only 2 of 10 animals.

The microsomal concentration of proteins in CCl_4 -treated rats decreased at week 1 (1.86 ± 0.26 v 2.54 ± 0.15 g/L; $P < .001$) and remained low for the rest of the study (week 5, 1.63 ± 0.24 v 2.49 ± 0.15 g/L; week 7, 1.19 ± 0.27 v 2.00 ± 0.29 g/L; $P < .001$). Similar results were obtained in rats given

CCl_4 and zinc at weeks 1 (1.35 ± 0.39 v 2.56 ± 0.13 g/L) and 5 (1.53 ± 0.34 v 2.58 ± 0.28 g/L), but at week 7 this parameter increased to values similar to those of control animals (2.17 ± 0.17 v 2.10 ± 0.21 g/L).

Results of the PON1 activity measurement are shown in Fig 1A. PON1 activity was significantly decreased from the first week of treatment in the rats administered CCl_4 alone. This effect was partially reversed in animals receiving a zinc-supplemented diet. Similar results were obtained for the ratio of PON1 to arylesterase (Fig 1B). The reverse situation applied in TBARS concentrations (Fig 1C), which were significantly increased in rats treated with CCl_4 and returned to normal values at week 7 in rats given CCl_4 and zinc. Serum ALT activity (Fig 1D) progressively increased in rats treated with CCl_4 alone; this increase was lower in the animals given CCl_4 and zinc. PON1 activity was inversely correlated with the concentrations of TBARS ($r = .56$; $P < .001$) and with ALT ($r = .45$; $P < .001$) in all the animals studied. These results establish a chronologic sequence and quantitative relationship between the decrease in hepatic microsomal PON1 activity and the generation of lipid peroxidation products in CCl_4 -treated rats. Further, clear relationships between the biochemical and histologic improvement after zinc administration together with a partial recovery of PON1 activity are observed. These data suggest that hepatic PON1 may play a protective role against free radical production in the hepatic organelles.

Liver production of PON1 may be reduced as a part of a general sign of hepatic toxicity. This concept is supported by the observation that changes of the microsomal PON1 activity parallel those of the microsomal concentrations of total pro-

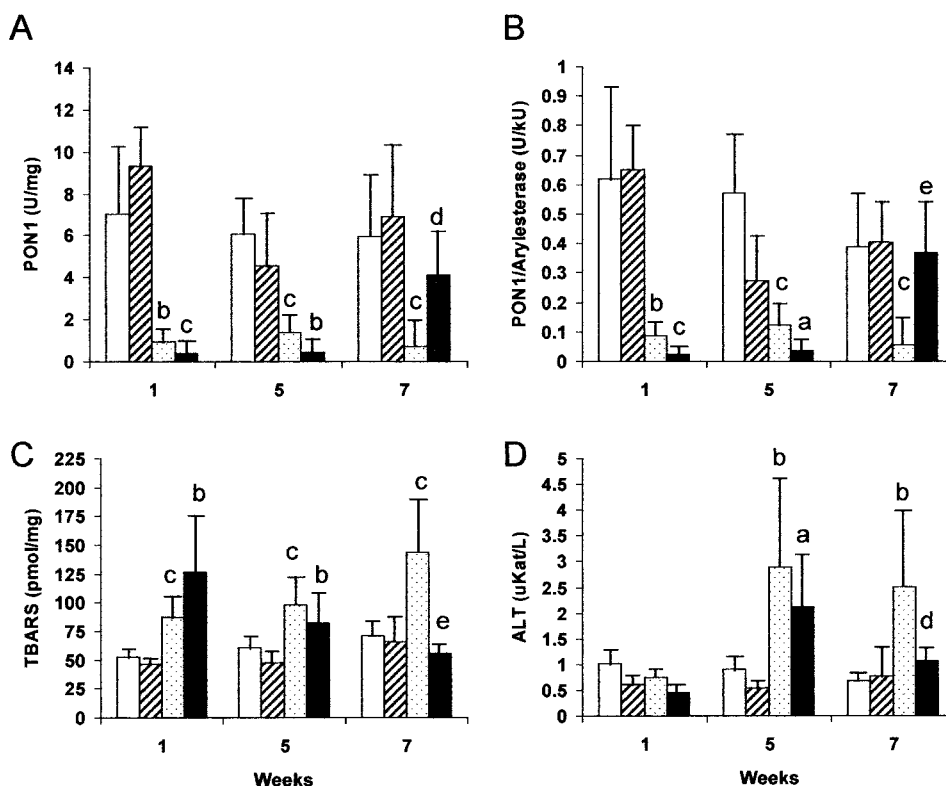


Fig 1. Results (means and SD) of the in vivo experiment in control rats (□), control rats given zinc (▨), CCl_4 -treated rats (▤), and rats treated with CCl_4 and zinc (■). ^a $P < .05$; ^b $P < .01$; ^c $P < .001$ compared with control rats. ^d $P < .01$; ^e $P < .001$ compared with rats treated with CCl_4 . Results of PON1 are expressed as units per milligram of microsomal protein. Results of TBARS are shown as picomoles per milligram of homogenate protein.

teins. However, our study shows alterations of the enzymatic specific activity (PON1 activity/mg protein) and of the ratio of PON1 to arylesterase activity, indicating that a more specific inhibition of the enzyme activity takes place as well.

The onset and development of cirrhosis have previously been related to an increase in hepatic free radical generation in this experimental model, and the hepatoprotective effects of zinc have been shown to be associated with an inhibition of free radical production.²⁰ Serum PON1, which is carried in circulation bound to HDL particles, protects LDL from peroxidation. This protection may be related to the ability of PON1 to hydrolyze some oxidized phospholipids⁴ and cholesteryl hydroperoxides²¹ present in oxidized LDL. However, the protective effect of serum PON1 on LDL has been shown to be accompanied by some inactivation of the enzyme by oxidized lipids.²² To investigate whether lipid peroxidation products inhibited hepatic PON1 activity, an *in vitro* experiment was performed using hepatic microsomes. The results showed that microsomal PON1 activity was not affected either by CCl₄ or by MDA (Table 1). The reasons for this discrepancy from human serum PON1 inactivation by oxidized lipids cannot be ascertained from the present investigation. It could be related to the differences in organ and/or species investigated or, more likely, to the compositional differences of the oxidized lipids produced under different conditions. For example, the compounds involved in PON1 inactivation by LDL are oxidized arachidonate derivatives²³ that are likely to be in higher concentrations in LDL than in liver microsomes. These results suggest that the PON1 decrease in CCl₄-treated rats is not the

Table 1. PON Activity in Isolated Microsomes

	PON (U/mg)
Basal*	4.7 ± 0.5
CCl ₄	
9 mmol/L	4.3 ± 0.3
27 mmol/L	4.5 ± 1.0
81 mmol/L	5.1 ± 0.7
MDA	
15 μmol/L	4.9 ± 1.1
45 μmol/L	5.2 ± 0.3
135 μmol/L	4.6 ± 0.8

NOTE. Results are expressed as means ± SD.

*No xenobiotics added.

consequence of direct inhibition of lipid peroxidation products on PON1 activity.

In summary, the present investigation shows for the first time that a decrease in liver microsomal PON1 activity is an early biochemical change related to lipid peroxidation and liver injury observed in rats with CCl₄-induced cirrhosis. As such, this enzyme may have a role within the antioxidant systems of liver microsomes. Further studies are needed to fully define this role and to establish the relationships between hepatic PON1 alterations and the pathophysiology of chronic liver disease.

ACKNOWLEDGMENT

Editorial assistance was provided by Dr Peter R. Turner of SciMed (Reus).

REFERENCES

1. La Du BN: Human serum paraoxonase/arylesterase, in Kalow W (ed): Pharmacogenetics of drug metabolism. New York, NY, Pergamon, 1992, pp 51-91
2. La Du BN: Structural and functional diversity of paraoxonases. *Nat Med* 2:1186-1187, 1996
3. Mackness MI, Mackness B, Durrington PN, et al: Paraoxonase: Biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins. *Curr Opin Lipidol* 7:69-76, 1996
4. Watson AD, Berliner JA, Hama SY, et al: Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase. Inhibition of the biological activity of minimally oxidized low-density lipoprotein. *J Clin Invest* 96:2882-2891, 1995
5. Mackness MI, Durrington PN: HDL, its enzymes and its potential to influence lipid peroxidation. *Atherosclerosis* 115:243-253, 1995
6. Mackness MI, Arrol S, Abbott C, et al: Protection of low-density lipoprotein against oxidative modification by high-density lipoprotein associated paraoxonase. *Atherosclerosis* 104:129-135, 1993
7. Gil F, Pla A, Gonzalvo MC, et al: Rat liver paraoxonase: Subcellular distribution and characterization. *Chem Biol Interact* 87:149-154, 1993
8. Gonzalvo MC, Gil F, Hernández AF, et al: Human liver paraoxonase (PON1): Subcellular distribution and characterization. *J Biochem Mol Toxicol* 12:61-69, 1998
9. Chojkier M, Houghlum K, Solís-Herruzo J, et al: Stimulation of collagen gene expression by ascorbic acid in cultured human fibroblasts: A role for lipid peroxidation? *J Biol Chem* 264:16957-16962, 1989
10. Camps J, Bargalló T, Giménez A, et al: Relationship between hepatic lipid peroxidation and fibrogenesis in carbon tetrachloride-treated rats: effect of zinc administration. *Clin Sci* 83:695-700, 1992
11. Wilson RL: Zinc and iron in free radical pathology and cellular control, in Mills CF (ed): Zinc in Human Biology. London, UK, Springer Verlag, 1988, pp 147-171
12. Gassó M, Rubio M, Varela G, et al: Effects of S-adenosylmethionine on lipid peroxidation and liver fibrogenesis in carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *J Hepatol* 25:200-205, 1996
13. Lake BG: Preparation and characterisation of microsomal fractions for studies on xenobiotic metabolism, in Snell K, Mullock B (eds): Biochemical Toxicology: A Practical Approach. Oxford, IRL Press, 1987, pp 183-215
14. Eckerson HW, Wyte CM, La Du BN: The human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism. *Am J Hum Genet* 35:1126-1138, 1983
15. Blatter Garin MC, James RW, Dussoix P, et al: Paraoxonase polymorphism Met-Leu 54 is associated with modified serum concentrations of the enzyme. *J Clin Invest* 99:62-66, 1997
16. Hasselwander O, McMaster D, Fogarty DG, et al: Serum paraoxonase and platelet-activating factor acetylhydrolase in chronic renal failure. *Clin Chem* 44:179-181, 1998
17. Esterbauer H, Cheeseman KH: Determination of aldehydic lipid peroxidation products: Malondialdehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol* 186:407-421, 1990
18. Wofford HW, Thomas P: Peroxidation of mullet and rat liver lipids *in vitro*: Effects of pyridine nucleotides, iron, incubation buffer, and xenobiotics. *Comp Biochem Physiol* 89C:201-205, 1988
19. Poli G, Dianzani MU, Cheeseman KH, et al: Separation and characterization of the aldehydic products of lipid peroxidation stimulated by carbon tetrachloride or ADP-iron in isolated rat hepatocytes and rat liver microsomal suspensions. *Biochem J* 227:629-638, 1985
20. Cabré M, Camps J, Paternán JL, et al: Time-course of changes

in hepatic lipid peroxidation and glutathione metabolism in rats with carbon tetrachloride-induced cirrosis. *Clin Exp Physiol Pharmacol* 27: 694-699, 2000

21. Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL, et al: Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions: A possible peroxidative role for paraoxonase. *J Clin Invest* 101:1581-1590, 1998

22. Aviram M, Billecke S, Sorenson R, et al: Paraoxonase active

site required for protection against LDL oxidation involves its free sulfhydryl group and is different than the required for its arylesterase/paraoxonase activities: Selective action of human paraoxonase alloenzymes Q and R. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18:1617-1624, 1998

23. Aviram M, Rosenblat M, Billecke S, et al: Human serum paraoxonase (PON1) is inactivated by oxidized low density lipoprotein and preserved by antioxidants. *Free Rad Biol Med* 26:892-904, 1999

1. *Justificació*

2. *Introducció*

3. *Hipòtesi i objectius*

4. *Participants, materials i mètodes*

5. Resultats

Estudi 1

6. *Discussió general, conclusions i perspectives*

7. *Referències bibliogràfiques*

Abreviatures

Índex

Universitat ROVIRA i VIRGILI
Facultat de Medicina
Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques

Utilitat de l'enzim
paraoxonasa/ariesterasa (PON1) en la
investigació de la malaltia
cardiovascular i l'hepatopatia

Tesi doctoral presentada per Natàlia Ferré i Pallàs per optar
al grau de Doctora.

Reus, gener de 2003.