

INVESTIGACIÓN CLÍNICA

Actividades paraoxonasa y arilesterasa bajas en sujetos mexicanos con enfermedad arterial coronaria

Ricardo Gamboa,* Juan Carlos Regalado,* Claudia Huesca-Gómez,* Carlos Posadas-Romero,** Juan Verdejo Paris,*** Gilberto Vargas-Alarcón,**** Óscar Pérez-Méndez****

Resumen

Propósito: Determinar la actividad de la enzima paraoxonasa-1 (PON1), y sus feno- y genotipos en posición 192 de la cadena de aminoácidos en sujetos mexicanos con diagnóstico de enfermedad arterial coronaria (EAC). **Métodos:** El polimorfismo de la PON1-192 se determinó por PCR-RFLP, y la actividad PON1 en suero se estableció utilizando dos substratos, paraoxón (actividad PONasa) o fenilacetato (denominada actividad ARE), en 155 individuos clínicamente sanos (grupo control), y en 155 pacientes con enfermedad cardiovascular que habían sufrido al menos un infarto (grupo EAC). Los sujetos en el estudio fueron clasificados de acuerdo a su fenotipo bioquímico como AA, AB y BB si el cociente de la actividad PONasa estimulada con NaCl 1M dividida por la actividad ARE era < 2, entre 2 y 8, y > 8, respectivamente. **Resultados:** Las actividades PONasa y ARE fueron significativamente menores en los pacientes con EAC en relación con los sujetos control (233.1 ± 102.1 vs 295.8 ± 159.1 nmol/min/mL, y 103.1 ± 33.7 vs 220.2 ± 120.7 micromol/min/mL, respectivamente, $p < 0.05$ para ambos). Las frecuencias tanto alélicas como genotípicas de PON1-192 fueron similares en ambos grupos. Además, en nuestro estudio el genotípico PON1-192 Q/R no corresponde con el

Summary

LOW PEROXONASE AND ARYLESTERASE PLASMA ACTIVITIES IN MEXICAN PATIENTS WITH CORONARY ARTERY DISEASE

Purpose: To determine the Paraoxonase-1 (PON1) activity as well as its pheno- and genotypes at position 192 in Mexican subjects with diagnosis of coronary heart disease (CHD). **Methods:** We determined the PON1-192 polymorphism by PCR-RFLP, and serum PON1 activity, using either paraoxon (PONase activity) or phenylacetate (ARE activity) as substrates, in 155 clinically healthy individuals (control group), and 155 patients with at least one myocardial infarction (CHD group). The biochemical A/B phenotype was determined by the ratio of the NaCl 1 M-stimulated PONase activity divided by the ARE activity. **Results:** We found significantly lower PONase and ARE activities in CHD patients as compared to controls (233.1 ± 102.1 vs 295.8 ± 159.1 nmol/min/mL, and 103.1 ± 33.7 vs 220.2 ± 120.7 micromol/min/mL, respectively, $p < 0.05$ for both). Allele and genotype frequencies for PON1-192 were similar in CHD patients and healthy controls. Moreover, in the control group, the PON1-192 Q/R genotype did not match with the A/B phenotype as has been proposed by other studies. **Conclu-**

* Departamento de Fisiología.

** Departamento de Endocrinología.

*** Subdirección de Especialidades Médico-Quirúrgicas.

**** Departamento de Biología Molecular, Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez", México, D.F.

Correspondencia: Óscar Pérez-Méndez. Departamento de Biología Molecular. Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" (INCICH, Juan Badiano Núm. 1, Col. Sección XVI, Tlalpan 14080. México, D.F.). Tel. (52-55) 55 73 29 11 ext. 1461; Fax (52-55) 55 73 09 26; E-mail: opmendez@yahoo.com

Recibido: 21 de noviembre de 2007

Aceptado: 13 de mayo de 2008

fenotipo bioquímico A/B como se había propuesto anteriormente por otros autores. **Conclusiones:** Los sujetos mexicanos con EAC presentan actividades PON1 menores que los individuos control, sugiriendo que la actividad PON1, podría ser marcador de riesgo de EAC, mientras que el genotipo PON1-192 carece de valor informativo en la evaluación de dicho riesgo en esta población en particular.

Palabras clave: Paraoxonasa-1 polimorfismos. Población mexicana. Enfermedad cardiovascular. Lipoproteínas de alta densidad.

Key words: Paraoxonase-1 polymorphisms. Mexican population. Coronary heart disease. High density lipoproteins.

Introducción

Las lipoproteínas de alta densidad (HDL) poseen diferentes propiedades antiaterosclerosas, dentro de las que se incluye la capacidad que tienen de proteger a las lipoproteínas de baja densidad (LDL) contra la modificación oxidativa.^{1,2} Esta propiedad de las HDL se le ha atribuido en gran medida a la enzima paraoxonasa-1 (PON1). La PON1 es una esterasa dependiente de calcio que se mantiene unida a las HDL por interacciones hidrofóbicas entre la región N-terminal de la enzima, los fosfolípidos y las apolipoproteínas de las lipoproteínas.³ El mecanismo propuesto que explica las propiedades antiaterogénicas de la PON1 es que esta enzima cataliza la conversión de los lipoperóxidos proaterogénicos a los correspondientes lipohidróxidos que son biológicamente inocuos.^{4,5} La PON1 fue inicialmente descrita como una enzima destoxicante, debido a su capacidad de hidrolizar el paraoxón, producto metabólico del paratión, el cual se utiliza aún en México como insecticida. Sin embargo, PON1 ha tomado una nueva importancia debido a su capacidad antes mencionada para eliminar lipoperóxidos.

Dos sitios polimórficos han sido descritos dentro de la secuencia de aminoácidos de la proteína: L55M y Q192R. En particular la isoenzima que presenta una glutamina en posición 192 (PON1-Q192), posee una baja actividad para la hidrólisis del paraoxón, comparada con la isoforma que contiene una arginina en esa misma posición (PON1-R192).^{6,7} Algunos estudios han demostrado que el polimorfismo en la posición 192 de la PON1 es un factor de riesgo para enfermedad arterial coronaria (EAC), sin embargo, estos datos han sido inconsistentes.⁸⁻¹² Las diferencias son probablemente el resultado de la

sions: There were important differences in the ARE and PONase activities between Mexican CHD patients and controls, suggesting that PON1 activity could be a good marker of CHD risk, whereas PON1-192 lacks of value to assess such risk.

(Arch Cardiol Mex 2008; 78: 360-368)

carga genética que parece ser determinante en la contribución de la isoenzima PON1-R192 en la EAC.⁸⁻¹² Adicionalmente, la actividad de la enzima en plasma es otro factor de riesgo de EAC; se ha demostrado que la baja actividad paraoxonasa en suero puede ser un mejor predictor de EAC que el genotipo de PON1.¹³⁻¹⁵ En este sentido, además de su capacidad de hidrolizar el paraoxón, actividad denominada paraoxonasa (PONasa), la PON1 puede hidrolizar diferentes ésteres de compuestos aromáticos. Cuando el fenilacetato se utiliza como substrato, la actividad de la enzima se ha denominado arilesterasa (ARE). La actividad PONasa es dependiente del polimorfismo, siendo la isoforma PON1-R192 más activa con respecto a la PON1-Q192. En contraste, la actividad ARE es independiente del polimorfismo de la proteína y es representativa de la masa activa de la enzima en plasma. Ekerson y colaboradores,¹⁶ describieron inicialmente que la relación de las actividades de la PONasa en presencia de 1M de NaCl dividido por la actividad ARE (PONasa-NaCl/ARE), resulta en una distribución trimodal correspondiente a un rango bioquímico o fenotipo bajo, medio y alto, denominados AA, AB y BB, respectivamente. Posteriormente se sugirió que las isoformas A y B corresponden respectivamente a las isoenzimas PON1-Q192 y PON1-R192.^{17,18} Cuando esta correspondencia fue establecida, la determinación del polimorfismo PON-192 sustituyó a la determinación de los fenotipos A/B. Factores ambientales y étnicos pueden modificar la actividad ARE y, como consecuencia, la correspondencia entre los genotipos y los fenotipos determinados bioquímicamente podrían no ser exactas; sin embargo esta posibilidad no ha sido analizada.

Como se mencionó previamente, la asociación entre los genes de PON1 y la EAC ha sido reportada en otras poblaciones,¹⁹ pero poco se conoce acerca de la PON1, sus polimorfismos y su actividad, en la población Mexicana.^{20,21} Por lo anterior, en este estudio analizamos el genotipo PON1-192, el fenotipo bioquímico y la actividad de la enzima en sujetos mexicanos con y sin diagnóstico de enfermedad cardiovascular, para determinar cuál de estos parámetros es de mayor utilidad como factor predictor de riesgo de EAC en esta población.

Material y métodos

Sujetos. Diseñamos un estudio transversal que incluyó a 155 pacientes (57.4% mujeres) con al menos un evento coronario, diagnosticado clínicamente por las pruebas de laboratorio y de gabinete pertinentes en el Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” durante los años de 2000 a 2001 y que han formado parte de estudios previamente reportados.²² Se incluyeron además 155 voluntarios sanos (54.1% mujeres) reclutados en el Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez. En el caso de los sujetos con EAC, 6.5% de los sujetos presentaron diabetes mellitus, 15.7% hipertensión arterial, 9.2% eran fumadores activos y 55.5% exfumadores inactivos y el 20.3% tomaban algún tipo de medicamento hipolipemiante al momento del estudio. Los sujetos control fueron reclutados después de una exploración clínica, historia médica, electrocardiograma, placa de tórax. De manera aleatoria a 56 sujetos control, se les determinó el grosor íntima-media carotídea; esta medida es un subrogado de aterosclerosis, y se realizó con el objetivo de comprobar que los criterios de inclusión permitían seleccionar individuos con grosores normales, sugiriendo así la ausencia EAC en ellos. A los sujetos control se les realizaron además pruebas de laboratorio para descartar la presencia de enfermedad hepática renal o tiroidea. Sólo se incluyeron sujetos > 36 años con niveles de glucosa plasmática en ayunas < 126 mg/dL. El 10.7% presentó hipertensión arterial, 8.9% fueron fumadores activos y 16% tomaban bebidas alcohólicas de manera ocasional. Se excluyeron a aquellos sujetos que estuvieran bajo algún tratamiento hipolipemiantte o no estuvieran de acuerdo en participar en el protocolo de investigación. Todos los participantes en el estudio firmaron una carta de consentimiento-informado. El protocolo fue apro-

bado por el Comité de Ética del Instituto Nacional de Cardiología.

Pruebas de laboratorio. Se tomaron muestras sanguíneas de los sujetos con al menos 12 horas de ayuno, se colectaron en tubos estériles con EDTA para el análisis del ADN y en tubos secos para los ensayos de la actividad paraoxonasa. El plasma y el suero fueron separados inmediatamente por centrifugación (2,500 rpm) durante 20 minutos a 4°C, separado en alícuotas y almacenado a -70°C hasta su utilización. Para la medición de las concentraciones de lípidos plasmáticos, las muestras fueron procesadas dentro de los tres días siguientes a su recolección.

El colesterol total (CT) y los triglicéridos (TG) fueron analizados por métodos enzimáticos (Boheringer Mannheim, Alemania) adaptados a un analizador Hitachi 705. El colesterol HDL (C-HDL) fue medido después de la precipitación de las lipoproteínas que contienen apoB mediante la utilización de fosfotungstato/Mg²⁺. Las lipoproteínas de baja densidad (C-LDL) fueron calculadas en las muestras con triglicéridos menores a 400 mg/dL.²³ Todos los ensayos fueron realizados bajo un esquema de control de calidad externo (Lipid Standardization Program, Center for Disease Control in Atlanta, GA).

Actividades paraoxonasa y arilesterasa. La actividad basal de la paraoxonasa (PONasa) fue determinada por el método descrito por Eckerson;²⁴ la tasa de hidrólisis del paraoxón (dietil-p-nitrofenil fosfato) se determinó por espectrofotometría monitoreando el p-nitrofenol a 25°C formado en la reacción a 412 nm²⁴. La mezcla del ensayo basal incluyó 1mM de paraoxón, 1mM de CaCl₂ en amortiguador glicina 50 mM, pH 10, y 20 µL de la muestra diluida 1:2 en eserina 10⁻⁵ M. Para la actividad PONasa estimulada por NaCl, este último se incluyó en concentración 1M en el amortiguador del ensayo. El coeficiente de extinción molar (ϵ_{412}) para el producto fue de 8290 M⁻¹cm⁻¹. La actividad PONasa se expresó como el número de nmol de p-nitrofenol formado por min por mL de plasma. La actividad ARE fue determinada utilizando fenilacetato como sustrato.²⁵ La tasa inicial de la hidrólisis fue determinada espectrofotómetricamente a 270 nm. La mezcla para el ensayo incluyó 1mM de fenilacetato, CaCl₂ 0.9 mM en Tris-HCl 20 mM, pH 8.0, y 100 µL de suero (diluido 1:100). El ϵ_{412} para la reacción fue 1310 M⁻¹cm⁻¹. La actividad arilesterasa fue expresada como los µmol de fenilacetato hidrolizados por

min por mL de suero. El cociente de la actividad PONasa en presencia de 1M de NaCl dividido por la actividad ARE (PONasa-NaCl/ARE) fue utilizada para asignar el fenotipo bioquímico. Los rangos de corte fueron los siguientes: cociente PONasa-NaCl/ARE < 2.0 se asignó como fenotipo AA, cociente entre 2.0 y 8 correspondió al fenotipo AB, y un cociente ≥ 8.0 para asignar el fenotipo BB.²⁴

Extracción del DNA y determinación del genotipo PON1-192. El DNA genómico se obtuvo a partir de sangre periférica de cada individuo utilizando la técnica de expulsión salina.²⁶ Para la amplificación de los fragmentos polimórficos de la PON1-192 se utilizaron los iniciadores: PON1-192 (sentido) 5'-TAT TGT TGC TGT GGG ACC TAG G-3', y PON1-192 (antisentido) 5' CAC GCT AAA CCC AAA TAC ATC TC 3'. El DNA obtenido de cada individuo se amplificó por el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La mezcla de reacción incluyó: 1 μ g de DNA, 1 pmol/ μ L de cada iniciador, 20 μ M de cada deoxinucleótido trifosfatado (dNTP), 2 mM de MgCl₂, 10% de dimetilsulfóxido, 1X de buffer de reacción y una unidad de *Taq polimerasa* en un volumen total de 25 μ L. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador (Perkin Elmer 9700) con las siguientes condiciones: desnaturación por 5 minutos a 94°C, seguida por 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 61°C y 1 minuto a 72°C y finalmente 7 minutos a 72°C. Los productos de PCR fueron digeridos con la enzima *AlwI*.²⁷ Las muestras se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 3% a 65V. En todas las electroforesis se utilizó un control negativo.

Ánálisis estadístico. Las frecuencias tanto alélicas como genotípicas de las variantes de la PON1 fueron obtenidas por conteo directo. Además, se evaluó el equilibrio de Hardy-Weinberg a través de la prueba de *chi cuadrada*. Se utilizó la prueba de *t* de Student para comparar los valores medios entre dos grupos con una *n* diferente. Un análisis de varianza (ANOVA) fue usado para evaluar el efecto de los genotipos de PON1-192 sobre el perfil de lípidos y las actividades PONasa y ARE. La asociación entre las variables continuas fue llevada a cabo por la correlación de Pearson. Un análisis de regresión logística fue utilizado como prueba predictora del estatus de enfermedad cardiovascular-control. Un valor de *p* menor de 0.05 fue considerado

significativo. Todos los análisis se llevaron a cabo con el programa SPSS versión 11.0 (SPSS Inc. Chicago, IL).

Resultados

Las características demográficas y bioquímicas de los sujetos incluidos en este estudio se muestran en la *Tabla I*. Existió una diferencia significativa en la edad, en consecuencia, todas las pruebas estadísticas fueron ajustadas por la edad. Los factores clásicos de riesgo tales como colesterol total, C-HDL, y glucosa fueron diferentes entre los dos grupos. Sin embargo, los triglicéridos y el C-LDL fueron similares después del ajuste. No hubo diferencias significativas entre hombres y mujeres cuando se analizaron por separado dentro de cada grupo excepto en el C-HDL (datos no mostrados).

Las frecuencias alélicas y genotípicas de la PON1 en posición 192 tanto de los pacientes como los sujetos control, se muestran en la *Tabla II*. Las frecuencias genotípicas esperadas y observadas en los controles y en los pacientes con EAC se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg. Al comparar las frecuencias entre ambos grupos se observó una disminución en el alelo Q (OR = 0.912, IC 95% = 0.664-1.253) y un aumento en el alelo R (OR = 1.096, IC 95% = 0.798-1.505) en el grupo de pacientes con EAC al compararlo con el grupo control, pero las diferencias no fueron significativas (*p* = 0.321 y *p* = 0.571, respectivamente). Como consecuencia, el polimorfismo de PON1-192 corregido por edad, no predijo el estatus de la EAC estimado por un modelo de regresión logística (*p* = 0.084).

A continuación se analizó la posibilidad de que existiera una equivalencia de los fenotipos de PON1 estimados por la relación PONase-NaCl/ARE (ver métodos) con los genotipos. Al comparar las frecuencias de los grupos de manera independiente, en el grupo control la distribución del fenotipo PON1 no correspondió con el genotipo esperado. En el grupo control, la frecuencia del fenotipo AA fue de 17.4%, mientras que el genotipo que debería corresponder al homocigoto PON-Q192 (QQ), fue de 32.2% (*p* < 0.003). También se encontraron diferencias significativas en las frecuencias del fenotipo AB y su supuesto correspondiente heterocigoto PON-Q192/PON1-R192 (QR), 67.7% y 50.3% respectivamente (*p* < 0.002), mientras que entre el fenotipo BB y el homocigoto PON1-R192 (RR) se encontró una frecuencia de 14.8% y 17.4%,

Tabla I. Características demográficas y bioquímicas de los sujetos control y de sujetos con enfermedad coronaria (EAC).

	EAC N = 155	Controles n = 155
Género (Hombres/Mujeres)	66/89	71/84
Edad (años)	53.3 ± 9.3*	49.6 ± 11.5
IMC (kg/cm ²)	27.7 ± 3.7	27.9 ± 5.4
Colesterol total (mg/dL)	191.5 ± 37*	232.1 ± 37.3
Colesterol-HDL (mg/dL)	37.0 ± 10.7*	48.5 ± 11.5
Triglicéridos (mg/dL) ^{&}	191.2 ± 80.4	188.8 ± 42.3
Colesterol-LDL (mg/dL)	116.3 ± 33.5	134.6 ± 42.2
Glucosa (mg/dL)	96.2 ± 11.6*	85.6 ± 9.2

Valores medios ± D.S.

[&] transformados logarítmicamente para su análisis

*p < 0.05

Tabla II. Frecuencias alélicas y genotípicas de PON1-192, y fenotipo de los sujetos control y de sujetos con EAC.

Alelo	EAC		Controles	
	n	frecuencia (%)	n	frecuencia (%)
Q	171	(55.1)	178	(57.4)
R	139	(44.8)	132	(42.6)
Genotipo				
QQ	41	(26.4)	50	(32.2)*
QR	89	(57.4)	78	(50.3)**
RR	25	(16.1)	27	(17.4)
Fenotipo				
AA	35	(22.5)	27	(17.4)
AB	88	(56.7)	105	(67.7)***
BB	32	(20.6)	23	(14.8)

*p ≤ 0.05 vs fenotipo AA control

**p ≤ 0.05 vs fenotipo AB control

***p ≤ 0.05 vs fenotipo AB en EAC

respectivamente, pero la diferencia en este caso no resultó ser estadísticamente significativa. Las

frecuencias en el grupo de pacientes con EAC, a pesar de no existir una correspondencia exacta entre el genotipo y el fenotipo bioquímico, no presentaron diferencias significativas entre ambos; las frecuencias fueron AA-QQ, 22.5%-26.4% (p = ns), AB-QR, 56.7%-57.4% (p = ns), y BB-RR, 20.6%-16.1% (p = ns), respectivamente.

Las actividades PONasa y ARE estratificadas tanto por el genotipo PON1-192 como el fenotipo PONasa-NaCl/ARE se muestran en la *Tabla III*. La actividad PONasa presenta una tendencia a incrementar en función del genotipo PON1-192 (actividad QQ<QR<RR) lo mismo en el grupo de pacientes con EAC que en los sujetos control. En contraste, la actividad ARE más elevada para este último grupo se observó en los sujetos homocigotos QQ, mientras que para el grupo de sujetos con EAC, la actividad más elevada fue

detectada en los pacientes homocigotos RR. Por último, observamos que la actividad PONasa es significativamente diferente entre el genotipo RR y el fenotipo BB en el grupo de pacientes con EAC (p = 0.018), apoyando la noción de que el fenotipo y el genotipo en posición 192 son dos parámetros independientes en este tipo de sujetos.

Al comparar los sujetos control contra los sujetos con EAC, después de ajustar por sexo, edad, e IMC, la media de las actividades PONasa y ARE fueron 20.2% y 48.8% más bajas respectivamente, en el grupo de EAC en comparación al control (*Tabla III*). Al dividirlas por genotipos, los pacientes con EAC tuvieron menor actividad PONasa en todos los genotipos con respecto a su correspondiente control. Las actividades ARE en los pacientes con EAC fueron 67.9%, 40.4%, y 47.9%, menores en QQ, QR y RR respectivamente, comparadas con los correspondientes grupos de controles.

Al analizar las actividades PONasa y ARE en relación al fenotipo, se encontraron igualmente diferencias significativas entre los grupos de sujetos con EAC con respecto a su control, tanto en PONasa como en ARE (*Tabla III*). La actividad PONasa fue mayor en los sujetos controles con fenotipo AB mientras que en los sujetos con EAC fue en el fenotipo BB.

Debido a que PON1 se asocia físicamente con las HDL en plasma, postulamos que la cantidad de estas lipoproteínas, cuantificadas como los niveles de C-HDL plasmáticos, podría ser uno de los principales parámetros que determinan la actividad enzimática de la PON1. Por lo tanto, en un análisis de correlación, ajustado por edad y sexo; se observó una relación positiva y significativa entre los niveles plasmáticos de C-HDL con la actividad PONasa (r = 0.188, p = 0.026) y con la actividad ARE (r = 0.244, p = 0.004) en los sujetos control. En contraste, en los sujetos con EAC no existió ninguna correlación significativa (datos no mostrados). Finalmente, tampoco se encontró correlación significativa al analizar el genotipo y/o el fenotipo con respecto a C-HDL.

Discusión

En este estudio examinamos el polimorfismo de PON1 y las actividades PONasa y ARE en sujetos con y sin diagnóstico de enfermedad arterial coronaria, demostrando que en el grupo control, el genotipo PON1-192 no corresponde al feno-

Tabla III. Actividad paraoxonasa y arilesterasa en sujetos sanos control y en sujetos con EAC, estratificados por genotipo PON1-192 y fenotipo.

	Actividad paraoxonasa nmol/min/mL		Actividad arilesterasa μmol/min/mL	
	EAC N = 155	Controles n = 155	EAC n = 155	Controles n = 155
QQ	175.1 ± 88.6 ^{a b}	258.2 ± 148.4 ^b	93.6 ± 30.4 ^{a b}	291.8 ± 128.27 ^c
QR	227.3 ± 101.7 ^{a b}	284.7 ± 157.3	101.7 ± 36.3 ^a	170.9 ± 109.0
RR	345.1 ± 113.8	389.4 ± 182.6	123.8 ± 30.1 ^a	237.9 ± 137.9
AA	108.6 ± 46.7 ^{a f}	181.5 ± 84.0	113.3 ± 22.3 ^a	210.0 ± 134.7
AB	236.8 ± 87.7 ^a	374.2 ± 160.0 ^d	102.5 ± 35.5 ^a	211.5 ± 107.5
BB	354.9 ± 97.1 ^a	266.3 ± 169.2	88.4 ± 28.3	96.9 ± 54.0 ^e
Promedio de actividades por grupo:	231.6 ± 90.0	290.2 ± 151.4	102.2 ± 32.3	199.3 ± 110.3

QQ, QR y RR indican el genotipo y AA, AB y BB el fenotipo de PON1-192.

Valores medios ± D.S.

^a p < 0.05 vs control^b p < 0.05 vs RR dentro del mismo grupo^c p < 0.05 vs QR dentro del mismo grupo^d p < 0.05 vs AA y BB dentro del mismo grupo^e p < 0.05 vs AA y AB dentro del mismo grupo^f p < 0.05 vs AB y BB dentro del mismo grupo

tipo bioquímico como ha sido descrito por otros autores.²⁸ Es innegable que existe una cierta correspondencia, pero esa correspondencia es relativamente baja (en nuestro estudio sólo alcanzó un máximo del 80% en los sujetos sanos); los sujetos homocigotos PON1-192 QQ no presentaron los fenotipos de AA, algunos sujetos heterocigotos PON1-192 QR no correspondieron al fenotipo AB, y los sujetos con PON1-192 RR no todos correspondieron con el fenotipo BB. Para nuestro conocimiento, este es el primer estudio que demuestra una baja correspondencia entre el genotipo de PON1-192 y el fenotipo bioquímico determinado por la relación PONase-NaCl/ARE. A pesar de la falta de correspondencia entre el genotipo y el fenotipo bioquímico, ninguno de los dos fue predictor de EAC, ya que no observamos diferencias significativas entre las frecuencias genotípicas ni fenotípicas de los pacientes y de los controles.

Si bien existen argumentos que apoyan nuestros resultados en el sentido de que las actividades bajas de ARE pueden favorecer el desarrollo de aterosclerosis,¹⁵ una de las debilidades de este estudio radica en que una proporción importante de nuestros pacientes recibía tratamientos antiaterosclerosos y/o antitrombóticos y que no fueron suspendidos para participar en el estudio. Por lo anterior, nuestras conclusiones referentes a la actividad ARE como posible indicador de riesgo cardiovascular, debe ser fortalecida con un estudio prospectivo.

Nuestros resultados demuestran que existe un gradiente de la actividad de la PON1 en función de la presencia del alelo R, esto es, un aumento en la actividad de hidrólisis de paraoxón en función del genotipo PON1-192, QQ<QR<RR. Como hemos establecido previamente, observamos una falta de correspondencia entre el genotipo de PON1-192 y el fenotipo bioquímico determinado por la relación PONase-NaCl/ARE. Debido a que el fenotipo A-B depende de la actividad ARE, ésta puede ser un factor determinante en la falta de asociación entre el fenotipo y el genotipo. La posible explicación de diferentes actividades ARE entre los sujetos control y los pacientes con EAC pueden ser las HDL, lipoproteínas que transportan a la enzima en plasma; la actividad ARE es una estimación de la masa funcional de la enzima en plasma, debido a que la actividad ARE, a diferencia de la PONasa no está influenciada por el genotipo.¹³⁻¹⁵ Además, la enzima PON1 en plasma se encuentra asociada a las HDL.²⁹ Nuestros resultados apoyan esta última noción, porque observamos una correlación positiva entre las actividades tanto PONasa como ARE y el C-HDL en los sujetos control. En contraste, dicha correlación entre el C-HDL en plasma y la PON1 se pierde en los sujetos con EAC. En este sentido, Ayub y cols. sugieren que la baja actividad PON1 es consecuencia del infarto agudo al miocardio, más que de la predisposición de los sujetos a tenerla.³⁰ Esto explicaría la falta de correlación entre el C-

HDL y la actividad de la enzima. Sin embargo, no se puede descartar que la estructura de las HDL, que es diferente entre controles y pacientes con EAC,³¹⁻³³ contribuya a dicha falta de correlación ya que es fundamental para la interacción con PON1.³³⁻³⁵ Esta hipótesis debe ser estudiada más profundamente en estudios específicamente diseñados para analizar la capacidad de asociación de la enzima a las HDL.

La edad puede influir sobre los niveles C-HDL en plasma, y fue significativamente diferente entre nuestros grupos de estudio. Además, se podría argumentar que la edad puede ser un factor determinante para la actividad ARE. Sin embargo, un estudio previo en población sana Mexicana entre 18-52 años,²⁰ reportó que las actividades PONasa y ARE son independientes de la edad. Por lo tanto, la edad tiene un efecto sobre los niveles de HDL, pero no necesariamente afecta las actividades PONasa y ARE. A pesar de estas evidencias, todos los datos fueron ajustados por edad y sexo cuando se compararon los grupos.

El alelo de PON1-192R ha sido propuesto como un factor de riesgo de enfermedad cardiovascular⁸⁻¹⁰ debido a que esta isoforma de la enzima es más susceptible a ser inactivada por estrés oxidativo.^{34,35} De forma interesante, detectamos una de las frecuencias más altas para el alelo R con respecto a otras poblaciones.^{11,12,19} Sin embargo, no encontramos ninguna diferencia en la frecuencia del alelo R en el grupo de EAC en comparación con el grupo control, confirmando los hallazgos de un metaanálisis previamente publicado.¹⁹ Otros reportes han sugerido una asociación entre el polimorfismo genético de PON1 y la susceptibilidad a la enfermedad arterial coronaria, pero estos resultados han sido inconsistentes.⁸⁻¹² Nuestro estudio sugiere que el polimorfismo del gen PON1 no es un marcador de EAC para la población Mexicana. En contraste, las bajas actividades PON1, particularmente la actividad ARE, puede ser un predictor de EAC, y esta observación es consistente con otros reportes.¹³⁻¹⁵ Hallazgos similares han sido descritos en sujetos con diabetes mellitus,^{36,37} hipercolesterolemia,³⁷ y daño renal.³⁸

Por último, dos individuos que comparten el mismo genotipo pueden presentar diferencias importantes en los niveles plasmáticos de PON1 debido a factores ambientales; algunos autores han demostrado que una dieta rica en colesterol, alcohol, tabaquismo, así como la vitamina C y E influyen sobre los niveles séricos de PON1.³⁹⁻⁴¹ Por lo tanto, no es sorprendente que una baja actividad de la enzima se observe en los sujetos con enfermedad cardiovascular y que el genotipo no presente diferencias significativas entre controles y cardiópatas, tal como lo hemos observado en nuestro estudio.

En resumen, en el presente estudio demostramos una baja actividad PONasa y ARE en el grupo con EAC en relación al grupo control, y la ausencia de diferencias significativas en las frecuencias alélicas o genotípicas PON1-192 en nuestra población. Estos resultados sugieren fuertemente que la baja actividad PON1, estimada con el paraoxón o el fenilacetato como sustrato, puede ser mejor marcador de riesgo de EAC que la presencia del alelo PON1-192R en la población mexicana.

Referencias

- ASSMANN G, SCHULTE H, VON ECKARDSTEIN A, HUANG Y: *High-density lipoprotein cholesterol as a predictor of coronary heart disease risk: the PROCAM experience and pathophysiological implications for reverse cholesterol transport.* Atherosclerosis 1996; 124: S11-S20.
- SCHAEFER EJ, LAMON-FAVA S, ORDOVAS JM, COHON SD, SCHAEFER MM, CASTELLI WP, ET AL: *Factors associated with low and elevated plasma high-density lipoprotein cholesterol and apolipoprotein A-I levels in the Framingham Offspring Study.* J Lipid Res 1994; 35: 871-882.
- SORENSEN RC, BISGAIER CL, AVIRAM M, HSU C, BILLECKE S, LA DU BN: *Human serum Paraoxonase/Arylesterase's retained hydrophobic N-termin*
inal leader sequence associates with HDLs by binding phospholipids: apolipoprotein A-I stabilizes activity. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1999; 19: 2214-2225.
- MACKNESS M, ARROL S, ABBOTT C, DURRINGTON PN: *Protection of low-density lipoprotein against oxidative modification by high-density lipoprotein associated paraoxonase.* Atherosclerosis 1993; 104: 129-135.
- 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.

6. MACKNESS M, MACKNESS B, DURRINGTON PN, CONNELLY PW, HEGELE RA: *Paraoxonase: Biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins*. Curr Opin Lipidol 1996; 7: 69-76.
7. LI WF, COSTA LG, RICHTER RJ, HAGEN T, SHIH TM, TWARD A, ET AL: *Catalytic efficiency determines the in-vivo efficacy of PON1 for detoxifying organophosphorus compounds*. Pharmacogenetics 2000; 10: 767-779.
8. IMAI Y, MORITA H, KURIHARA H, SUGIYAMA T, KATO N, EBISAWA A, ET AL: *Evidence for association for paraoxonase gene polymorphisms and atherosclerotic disease*. Atherosclerosis 2000; 149: 435-442.
9. SHANGERA DK, SHARA N, ASTON CE, KAMBOH MI: *Genetic polymorphism of paraoxonase and the risk of coronary heart disease*. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1997; 17: 1067-1073.
10. KARVONEN J, KAUMA H, PAIVANALO M, KESANIEMI Y: *Paraoxonase-1 gene Leu-Met55 and Gln-Arg192 polymorphisms are not associated with carotid artery atherosclerosis in a population-based cohort*. Eur J Cardiovasc Prev Rehabil 2004; 6: 511-512.
11. 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: 217-223.
12. ARCA M, OMBRES D, MONTALI A, CAMPAGNA F, MANGIERI E, TANZILLI G, ET AL: *PON1 L55M polymorphism is not a predictor of coronary atherosclerosis either alone or in combination with Q192R polymorphism in an Italian population*. Eur J Clin Invest 2002; 32: 9-15.
13. JARVIK GP, ROZEK LS, BROPHY VH, HATSUKAMI TS, RITCHER RJ, SCHELLENBERG GD, ET AL: *Paraoxonase (PON1) phenotype is a better predictor of vascular disease than is PON1(192) or PON1(55) genotype*. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2000; 20: 2441-2447.
14. JARVIK GP, HATSUKAMI TS, CARLSON C, RITCHER RJ, JAMPSA R, BROPHY VH, ET AL: *Paraoxonase activity, but not haplotype utilizing the linkage disequilibrium structure, predicts vascular disease*. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2003; 23: 1465-1471.
15. MACKNESS B, DAVIES GK, TURKIE W, LEE E, ROBERTS DH, HILL E, ET AL: *Paraoxonase status in coronary heart disease: are activity and concentration more important than genotype?* Arterioscler Thromb Vasc Biol 2001; 21: 1451-1457.
16. 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.
17. ADKINS S, GAN KN, MODY M, LA DU B: *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.
18. HUMBERT R, ADLER DA, DISTECHÉ CM, HASSETT C, OMIECINSKI CJ, FURLONG CE: *The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism*. Nat Genet 1993; 3: 73-76.
19. WHEELER JG, KEAVNEY BD, WATKINS H, COLLINS R, DANESH J: *Four paraoxonase polymorphism in 11 212 cases of coronary heart disease and 12 786 controls: meta-analysis of 43 studies*. Lancet 2004; 363: 389-395.
20. ROJAS-GARCÍA AE, SOLÍS-HEREDIA MJ, PIÑA-GUZMAN L, LÓPEZ-CARRILLO L, QUINTANILLA-VEGA B: *Genetic polymorphism and activity of PON1 in a Mexican population*. Toxicol Appl Pharmacol 2005; 205: 282-289.
21. GAMBOA R, ZAMORA J, RODRIGUEZ-PEREZ JM, FRAGOSO JM, CARDOSO G, POSADAS-ROMERO C, ET AL: *Distribution of paraoxonase PON1 gene polymorphisms in Mexican populations. Its role in the lipid profile*. Exp Mol Pathol 2006; 80: 85-90.
22. VARGAS-ALARCON G, ZAMORA J, SÁNCHEZ-GARCÍA S, RODRIGUEZ-PÉREZ M, CARDOSO G, POSADAS-ROMERO C: *Angiotensin-I-converting enzyme (ACE) insertion/deletion polymorphism in Mexican patients with coronary heart disease*. Association with the disease but not with lipids levels. Exp Mol Pathol 2006; 81: 131-135.
23. DELONG DM, DELONG ER, WOOD PD, LIPPEL K, RIFKIND B: *A comparison of methods for the estimation of plasma low- and very low-density lipoprotein cholesterol*. The Lipid Research Clinics Prevalence Study. JAMA 1986; 256: 2372-2377.
24. ECKERSON HW, WYTE CM, LA DU BN: *The human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism*. Am J Human Genet 1983; 35: 1126-1138.
25. GAN KL, SMOLEN A, ECKERSON HW, LA DU BN: *Protein purification of human serum paraoxonase/arylesterase. Evidence for one esterase catalyzing both activities*. Drug Metab Dispos 1991; 19: 100-106.
26. MILLER SA, DYKES DD, POLESKY HF: *A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells*. Nucleic Acids Res 1988; 1: 1215.
27. MOTTI C, DESSY M, GNASSO A, IRACE C, INDIGENO P, ANGELUCCI CB, ET AL: *A multiplex PCR-based DNA assay for the detection of paraoxonase gene cluster polymorphism*. Atherosclerosis 2001; 158: 35-40.
28. BROWNE RW, KOURY ST, MARION S, WILDING G, MUTI P, TREVISAN M: *Accuracy and biological variation of human serum paraoxonase 1 activity and polymorphism (Q192R) by kinetic enzyme assay*. Clin Chem 2007; 53: 310-317.
29. BLATTER 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.
30. AYUB A, MACKNESS MI, ARROL S, MACKNESS B, PATEL J, DURRINGTON PN: *Serum paraoxonase af-*

- ter myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999; 19: 330-335.
31. SVIRIDOV D, NESTEL PJ: *Genetic factors affecting HDL levels, structure, metabolism and function*. *Curr Opin Lipidol* 2007; 18: 157-163.
 32. WATANABE H, SÖDERLUND S, SORO-PAAVONEN A, HIUKKA A, LEINONEN E, ALAGONA C, ET AL: *Decreased high-density lipoprotein (HDL) particle size, preβ-, and large HDL subspecies concentration in Finnish low-HDL families: relationship with intima-media thickness*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 897-902.
 33. MORGAN J, CAREY C, LINCOFF A, CAPUZZI D: *High-density lipoprotein subfractions and risk of coronary artery disease*. *Curr Atheroscler Rep* 2004; 6: 359-365.
 34. McELEVEEN J, MACKNESS MI, COLLEY CM, PEARD T, WARNER S, WALKER CH: *Distribution of paraoxon hydrolytic activity in the serum of patients after myocardial infarction*. *Clin Chem* 1986; 32: 671-673.
 35. 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.
 36. RUIZ J, BLANCHE H, JAMES RW, GARIN MJ, VAISSÉ C, CHARPENTIER G, ET AL: *Gln-Arg 192 polymorphism of paraoxonase and coronary heart disease in type 2 diabetes*. *Lancet* 1995; 346: 869-887.
 37. MACKNESS MI, HARTY D, BHATNAGAR D, WINOCOUR TH, ARROL S, ISHOLA M, ET AL: *Serum paraoxonase activity in familial hypercholesterolemia and insulin-dependent diabetes mellitus*. *Atherosclerosis* 1991; 86: 193-199.
 38. DANTOINE TF, DEBORD J, CHARMES JP, MERLE L, MARQUET P, LACHATRE G, ET AL: *Decrease of serum paraoxonase activity in chronic renal failure*. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9: 2082-2088.
 39. JARVIK GP, TSAI NT, MCKINSTRY LA, WAN R, BROPHY V, RITCHER RJ, ET AL: *Vitamin C and E intake is associated with increased paraoxonase activity*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 1329-1333.
 40. SENTI M, TOMAS M, ANGLADA R, ELOSUA R, MARRUGAT J, COVAS MI, ET AL: *Interrelationship of smoking, paraoxonase activity and leisure-time physical activity: a population based-study*. *Eur J Intern Med* 2003; 14: 178-184.
 41. KLEEMOLA P, FREESE R, JAUVAINEN M, PAHLMAN R, ALFTAN G, MUTANEN M: *Dietary determinants of serum paraoxonase activity in healthy humans*. *Atherosclerosis* 2002; 160: 425-432.