

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.