

El título de anticuerpos anti-LDL oxidada no está relacionado con la actividad paraoxonasa en suero ni con sus polimorfismos genéticos en sujetos normales y en pacientes con infarto de miocardio

N. Ferré, M. Tous, J. Camps y J. Joven

Centre de Recerca Biomèdica. Institut de Recerca en Ciències de la Salut. Hospital Universitari de Sant Joan. Reus.

Fundamento. La paraoxonasa (PON1) es una éster hidrolasa relacionada con la eliminación de componentes oxidados de las lipoproteínas de baja densidad (LDL). El presente estudio analiza la relación entre el título de anticuerpos contra la LDL oxidada (Ac-LDLox), la actividad PON1 en suero y sus polimorfismos genéticos en 39 individuos normales y 39 pacientes supervivientes de un infarto de miocardio.

Pacientes y métodos. Los valores de Ac-LDLox se determinaron por enzimoimmunoanálisis. La actividad PON1 en suero se determinó mediante la hidrólisis de paraoxon. Los polimorfismos de la PON1 en las posiciones 55 y 192 se analizaron mediante amplificación por reacción en cadena de la polimerasa y análisis de restricción.

Resultados. Los resultados obtenidos no demostraron ninguna relación significativa entre los valores de Ac-LDLox ni con la actividad PON1 en suero ni con sus polimorfismos, en sujetos controles o en pacientes con infarto de miocardio.

Palabras clave:

Infarto de miocardio. LDL oxidada. Paraoxonasa. Polimorfismos genéticos.

ANTIBODY ANTI-OXIDIZED LDL TITER IS NOT RELATED TO SERUM PARAOXONASE ACTIVITY AND THEIR GENETIC POLYMORPHISMS IN NORMAL SUBJECTS AND PATIENTS WITH MYOCARDIAL INFARCTION

Background. Paraoxonase (PON1) is an ester hydrolase related to the elimination of oxidized compounds of LDL particles. The aim of the present study was to analyze the relationship between the antibody titre against oxidized LDL (Ac-LDLox), PON1 activity in serum and its genetic polymorphisms in 39 normal subjects and 39 survivor patients of a myocardial infarction.

Patients and methods. Ac-LDLox levels were determined by enzymeimmunoassay. PON1 activity was measured by the hydrolysis of paraoxon. PON1 polymorphisms at positions 55 and 192 were analyzed by polymerase chain reaction and restriction isotyping.

Results. Results obtained did not show any significant relationship between Ac-LDLox levels neither with PON1 activity in serum nor with its polymorphisms, in control subjects or in patients with myocardial infarction.

Key words:

Myocardial infarction. Oxidized LDL. Paraoxonase. Genetic polymorphisms.

Correspondencia: Dr. J. Camps.
Centre de Recerca Biomèdica.
Hospital Universitari de Sant Joan.
Sant Joan s/n. 43201 Reus.
Correo electrónico: jcamps@grupsgs.com

Introducción

Numerosas evidencias indican que las lipoproteínas de baja densidad oxidadas (LDLox) son un factor importante en la progresión de la arteriosclero-

sis¹. Según esta hipótesis, las partículas de LDLox producen un incremento de la adherencia y acumulación de macrófagos en el espacio subendotelial de la pared arterial², estimulan la proliferación de células del músculo liso^{3,4}, favorecen la vasoconstricción arterial^{5,6} y producen trastornos en los procesos de apoptosis^{7,8} y trombosis^{9,10} en la placa de ateroma. El efecto antiaterogénico de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) parece estar vinculado, al menos en parte, a la presencia en estas partículas de enzimas que eliminan las LDLox¹¹. Uno de estas enzimas es la paraoxonasa (PON1), una éster hidrolasa que destruye los fosfolípidos e hidroperóxidos oxidados^{12,13}. La actividad PON1 en suero está determinada al menos por dos polimorfismos genéticos¹⁴, uno en la posición 55, que es una sustitución Met-Leu (isoformas M y L, respectivamente), y otro en la posición 192 que es una sustitución Gln-Arg (isoformas Q y R). Se ha descrito que las distintas isoformas pueden presentar eficacias diferentes en la protección contra la LDLox¹³, aunque otros trabajos no han confirmado estos resultados¹⁵. Recientemente, se ha propuesto la determinación del título de anticuerpos contra LDLox (Ac-LDLox) como un método indirecto para la estimación de la concentración plasmática de esta lipoproteína^{16,17}. El presente estudio tiene como objetivo analizar si existe relación entre los valores plasmáticos de Ac-LDLox, la actividad PON1 y sus polimorfismos en el suero de individuos normales o pacientes que han sufrido un infarto de miocardio.

Pacientes y métodos

Pacientes

El estudio se llevó a cabo en muestras de suero y ADN de 39 pacientes participantes en un estudio anterior¹⁸, que sobrevivieron a un infarto de miocardio y a los que se localizó a través del examen de su historia clínica y se invitó a participar en el estudio. Todos los pacientes tenían una edad inferior a 55 años en el momento del episodio, y no tenían antecedentes de hipercolesterolemia familiar, insuficiencia renal o enfermedad hepática. Las muestras sanguíneas se obtuvieron al menos 3-4 meses después del episodio agudo. Como grupo control se estudiaron 39 sujetos sanos que participaron en un estudio epidemiológico que se llevaba a término en nuestra área¹⁹. Ambos grupos de individuos fueron elegidos para que la distribución de edad y sexo fuera similar y también en función de su genotipo PON1₁₉₂, de manera que 13 sujetos eran homocigotos para Q, 13 para R, y 13 eran heterocigotos.

Determinación del título de Ac-LDLox

Se utilizó un ensayo inmunoquímico en fase sólida (Immuno-Lisa, IMCO Diagnostics, Buffalo, NY). Los sueros de los pacientes y los correspondientes calibradores se añadieron por duplicado a pocillos de plástico, uno de los cuales estaba recu-

bierto con LDL nativa y el otro con LDLox. Las muestras se incubaron durante 2 h a 4 °C. Después de cuatro lavados, los pocillos se incubaron durante el mismo período de tiempo y a la misma temperatura con una solución de conjugado, que contenía un anticuerpo anti-IgG humana marcado con fosfatasa alcalina. Se repitieron los lavados y se añadió un sustrato que contenía p-nitrofenilfosfato. Después de una incubación a 4 °C durante 30 min, se leyó la absorbancia a 405 nm. Para cada muestra y calibrador se restó la absorbancia obtenida en el pocillo con LDL nativa de la correspondiente al pocillo con LDLox. Estos valores se interpolaron en la curva patrón. Los resultados se expresaron en UE/ml.

Determinación del genotipo de PON1 y de su actividad enzimática en suero

Se obtuvo ADN genómico de todos los pacientes y controles a partir de los leucocitos mediante técnicas convencionales (Puregene DNA Isolation Reagent Set, Gentra, Minneapolis, MN), y se determinaron los polimorfismos PON1₅₅ y PON1₁₉₂ mediante amplificación por reacción en cadena de la polimerasa y análisis de restricción con las enzimas *NlaIII* y *AlwI* (New England Biolabs, Beverly, MA)¹⁹.

La actividad PON1 se determinó mediante un método descrito previamente¹⁹ en un analizador automático Shimadzu CL-7200. Ocho μ l de suero se incubaron con 250 μ l de tampón glicina 0,05 M (pH, 10,5) con 1 mM CaCl₂ y 1 mM paraoxon. El incremento en la absorbancia se determinó automáticamente a los 17 y 51 s. La actividad PON1 se expresó en U/ml.

Análisis estadístico

Dado que las distribuciones de los valores de Ac-LDLox y PON1 en suero no siguieron una distribución normal, los análisis estadísticos se llevaron a cabo después de su transformación logarítmica. Muchas de las muestras analizadas presentaron valores de Ac-LDLox inferiores al límite de detección de la técnica, asignándoseles un valor de 1 antes del cálculo del logaritmo. Las diferencias entre grupos se calcularon mediante ANOVA. Las correlaciones entre variables se calcularon con el coeficiente de correlación de Pearson.

Resultados

Los resultados de la actividad PON1 en el suero de los sujetos control y los pacientes con infarto de miocardio se indican en la figura 1. Tal como era de esperar, la actividad enzimática varió en función del genotipo, incrementándose significativamente ($p < 0,001$) en los portadores de los alelos R y M, tanto en controles como en pacientes. No hubo diferencias significativas en la actividad PON1 entre los dos grupos de estudio. Los resultados de las determinaciones de Ac-LDLox se recogen en la figura 2. No hubo diferencias significativas en los valores de este parámetro en los pacientes con infarto de miocardio con respecto a los sujetos control. Tampoco las hubo en función de los polimorfismos PON₅₅ y PON₁₉₂. No se observaron correlaciones significativas entre la actividad PON1 en suero y los valores de Ac-LDLox ni en controles ($r = 0,11$) ni en pacientes ($r = 0,03$).

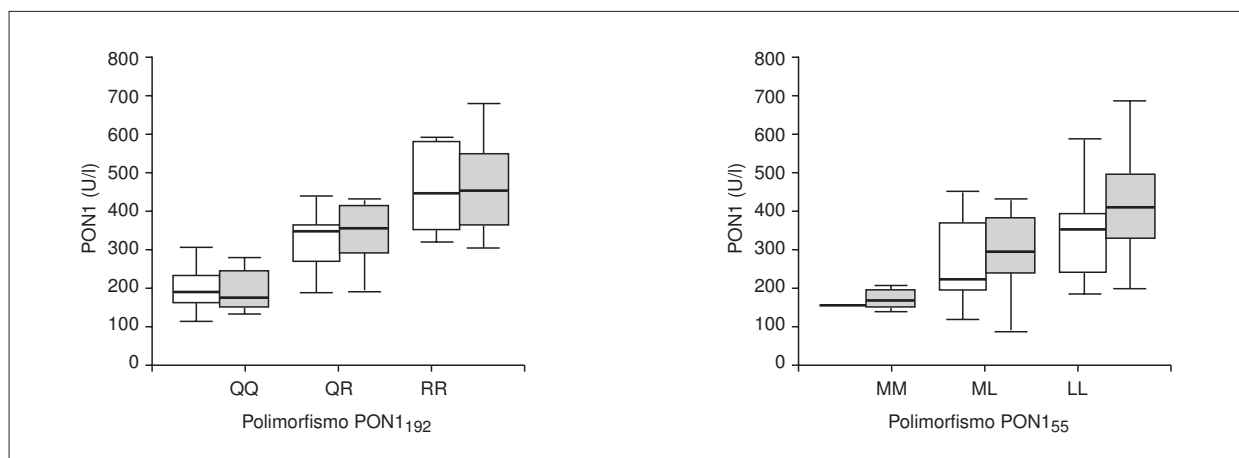


Figura 1. Diagramas de caja que representan los resultados de la actividad PON1 en función de los polimorfismos en las posiciones 192 y 55, en sujetos controles (cajas blancas) y pacientes con infarto de miocardio (cajas sombreadas).

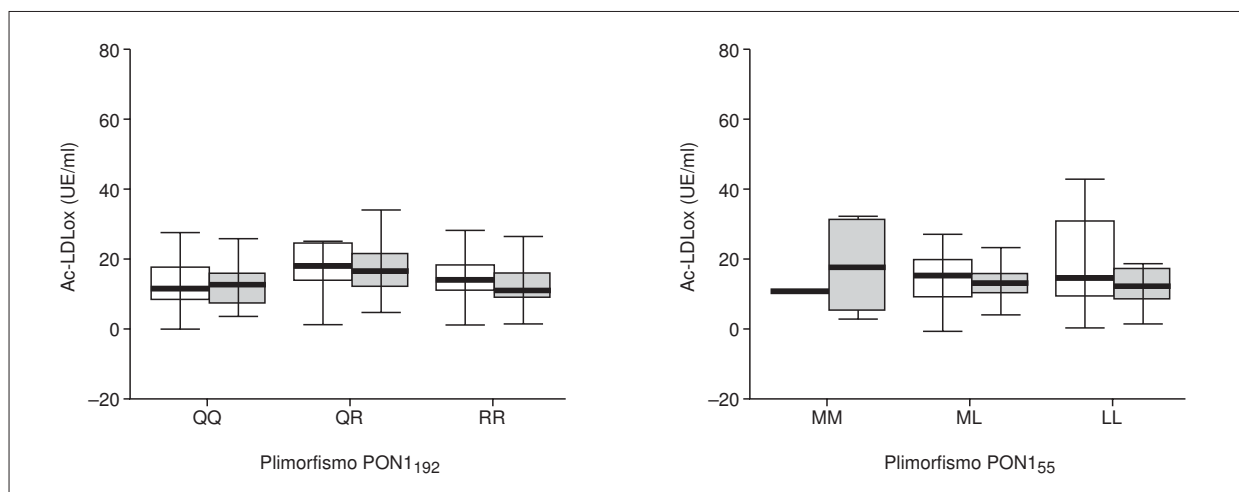


Figura 2. Diagramas de caja que representan los resultados del título de Ac-LDLox en función de los polimorfismos en las posiciones 192 y 55, en sujetos controles (cajas blancas) y pacientes con infarto de miocardio (cajas sombreadas).

Discusión

La oxidación de las partículas de LDL parece ser un importante factor proaterogénico. Diversos agentes antioxidantes presentes en el suero humano actúan previniendo la formación de lipoperoxidos en la LDL¹. Otros agentes protectores no ejercen una función preventiva, sino que destruyen los lipoperoxidos neoformados en la LDL, suprimiendo así la propagación de la oxidación²⁰. Se ha sugerido que uno de estos agentes es la PON1¹³, una éster hidrolasa asociada a la HDL. La actividad de esta enzima varía mucho de un individuo a otro, y parte de esta variabilidad está relacionada con los polimorfismos del gen *PON1*²¹. Una sustitución Gln-Arg en la posición 192 (isoformas Q y R) es de-

terminante para la actividad hidrolítica contra el paraoxon, ya que el alelo R codifica una proteína con varias veces más actividad enzimática que el alelo Q^{22,23}. Otra sustitución, Met-Leu en la posición 55 (isoformas M y L), tiene también efecto sobre la actividad enzimática y existe un fuerte desequilibrio de ligamiento entre las isoformas L y Q²⁴.

Algunos estudios han encontrado una relación inversa entre la capacidad de la PON1 de hidrolizar paraoxon y sus efectos antiaterogénico y protector contra la oxidación de la LDL, de manera que se ha observado una mayor prevalencia del genotipo RR en sujetos con enfermedad cardiovascular que en individuos sanos²⁵⁻²⁸, y que el genotipo QQ es más eficiente que el genotipo RR hidrolizando los lípi-

dos oxidados de la LDL²⁹⁻³². Sin embargo, estos resultados están sujetos a controversia, ya que otros autores, entre los que se incluye nuestro grupo de investigación, no han encontrado ninguna asociación entre los polimorfismos de la PON1 y la enfermedad cardiovascular^{15,33-36}.

El presente estudio se llevó a cabo con el objeto de saber si existía alguna relación entre el título de anticuerpos contra la LDL oxidada y la actividad PON1 en el suero o sus polimorfismos genéticos en individuos normales y en pacientes supervivientes de un infarto de miocardio. Los resultados obtenidos no demostraron ninguna relación entre estos factores. Los pacientes no presentaron valores de Ac-LDLox significativamente elevados con respecto al grupo control a los 3-4 meses después del episodio agudo, lo cual estuvo probablemente relacionado con la medicación o con cambios saludables en sus hábitos dietéticos. Asimismo, los valores de Ac-LDLox fueron independientes de los polimorfismos de la PON1 en las posiciones 55 y 192 y no se correlacionaron significativamente con la actividad enzimática. Estos resultados confirman y completan los obtenidos recientemente en sujetos sanos finlandeses, en los cuales tampoco se observó ninguna asociación entre el título de Ac-LDLox y los polimorfismos 55 y 192³⁷.

Las conclusiones del presente estudio deben ser tomadas con cierta precaución. Si bien se ha sugerido que el título de Ac-LDLox es un buen marcador de la concentración de LDL oxidada en la enfermedad cardiovascular³⁸ y en diversas situaciones clínicas en las que hay un incremento del estrés oxidativo, como la diabetes mellitus^{16,17}, la insuficiencia renal crónica³⁹ y la endometriosis⁴⁰, otros autores han llegado a conclusiones discordantes^{38,41-44}. Recientemente, se han desarrollado inmunoanálisis con anticuerpos dirigidos contra neoepítomos de la LDL oxidada¹ que permiten la medida directa de su concentración; su uso permitirá investigar con mayor fiabilidad las relaciones entre este importante factor proaterogénico y la PON1.

Bibliografía

- Mertens A, Holvet P. Oxidized LDL and HDL: antagonists in atherothrombosis. *FASEB J* 2001;15:2073-84.
- Cominacini L, Garbin U, Pasini AF, Dvoli A, Campagnola M, Contessi GB, et al. Antioxidants inhibit the expression of intercellular cell adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 induced by oxidized LDL on human umbilical vein endothelial cells. *Free Rad Biol Med* 1997;22:117-27.
- Stiko-Rahm A, Hultgardh-Nilsson A, Rengstrom J, Hamsten A, Nilsson J. Native and oxidized LDL enhance the production of PDGF and the surface expression of PDGF receptors in cultured smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb* 1992;12:1099-109.
- Kohn M, Yokokawa K, Yasunari K, Minami M, Kano H, Hanehira T, et al. Induction by lysophosphatidylcholine, a major phospholipid component of atherogenic lipoproteins, of human coronary artery smooth muscle cell migration. *Circulation* 1998;98:353-9.
- Liao JK, Shin WS, Lee WY, Clark SL. Oxidized low-density lipoprotein decreases the expression of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1995;270:319-4.
- Vidal F, Colome C, Martínez-González J, Badimon L. Atherogenic concentrations of native low-density lipoproteins down-regulate nitric-oxide-synthase mRNA and protein levels in endothelial cells. *Eur J Biochem* 1998;252:378-84.
- Heermeier K, Leicht W, Palmethofer A, Ullrich M, Wanner C, Galle J. Oxidized LDL suppresses NF-kappaB and overcomes protection from apoptosis in activated endothelial cells. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:456-63.
- Metzler B, Hu Y, Dietrich H, Xu Q. Increased expression and activation of stress-activated protein kinases/c-Jun NH(2)-terminal protein kinases in atherosclerotic lesions coincide with p53. *Am J Pathol* 2000;156:1875-86.
- Li LX, Chem JX, Liao DF, Yu L. Probucol inhibits oxidized-low density lipoprotein-induced adhesion of monocytes to endothelial cells by reducing P-selectin synthesis *in vitro*. *Endothelium* 1998;6:1-8.
- Armstrong DA. Oxidized LDL ceroid, and prostaglandin metabolism in human atherosclerosis. *Med Hypotheses* 1992;38:244-8.
- Navab M, Hama-Levy S, Van Lenten BJ, Fonarow GC, Cardinez CJ, Castellani LW, et al. Mildly oxidized LDL induces an increased apolipoprotein J/paraoxonase ratio. *J Clin Invest* 1997;99:2005-19.
- Aviram M, Rosenblat M, Billecke S, Erogul J, Sorenson R, Bisgaier CL, et al. Human serum paraoxonase (PON1) is inactivated by oxidized low density lipoprotein and preserved by antioxidants. *Free Rad Biol Med* 1999;26:892-904.
- Aviram M, Hardak E, Vaya J, Mahmood S, Milo S, Hoffman A, et al. Human serum paraoxonases (PON1) Q and R selectively decrease lipid peroxides in human coronary and carotid atherosclerotic lesions. *Circulation* 2000;101:2510-7.
- Mackness B, Durrington PN, Mackness M. Polymorphisms of paraoxonase genes and low-density lipoprotein lipid peroxidation. *Lancet* 1999;353:468-9.
- 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.
- Festa A, Kopp HP, Scherthaner G, Menzel EJ. Autoantibodies to oxidized low density lipoproteins in IDDM are inversely related to metabolic control and microvascular complications. *Diabetologia* 1998;41:350-6.
- Orchard TJ, Virella G, Forrest KYZ, Evans RW, Becker DJ, Lopes-Virella MF. Antibodies to oxidized LDL predict coronary artery disease in type 1 diabetes. *Diabetes* 1999;48:1454-8.
- Joven J, Simó JM, Vilella E, Camps J, Masana L, de Febrer G, 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.
- Ferre N, Camps J, Prats E, Vilella E, Paul A, Figuera L, et al. Serum paraoxonase activity: a new additional test for the improved evaluation of chronic liver damage. *Clin Chem* 2002;48:261-8.
- Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease. *Lancet* 1994;344:721-4.
- Humbert R, Adler DA, Distech CM, Hassett C, Omiecinski CJ, Furlong CE. The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism. *Nature Genet* 1993;3:73-6.
- Adkins S, Gan KN, Mody M, La Du BN. Molecular basis of the polymorphic forms of human serum paraoxonase/arylesterase: glutamine or arginine at position 191, for the respective A or B alleles. *Am J Hum Genet* 1993;52:598-608.
- Nevin DN, Zambon A, Furlong CE, Richter RJ, Humbert R, Honkanson JE, et al. Paraoxonase genotypes, lipoprotein lipase activity, and HDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:1243-9.
- Blatter Garin MC, James RW, Dussoix P, Blanche H, Passa P, Froguel P, et al. Paraoxonase polymorphism Met-Leu 54 is associated with modified serum concentrations of the enzyme. A possible link between the paraoxonase gene and increased cardiovascular risk in diabetes. *J Clin Invest* 1997;99:62-6.

25. Ruiz J, Blanche H, James RW, Garin MCS, Vaisse C, Charpentier G, et al. Gln-Arg 192 polymorphism of paraoxonase and coronary heart disease in type 2 diabetes. *Lancet* 1995;346:869-72.
26. Serrato S, Marian AJ. A variant of human paraoxonase/arylesterase (HUMPONA) gene is a risk factor for coronary heart disease. *J Clin Invest* 1995;96:3005-8.
27. 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.
28. Odawara M, Tachi Y, Yamashita K. Paraoxonase polymorphism (Gln 192-Arg) is associated with coronary heart disease in Japanese non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:2257-60.
29. Aviram M, Billecke S, Sorenson R, Bisgaier C, Newton R, Rosenblatt M, et al. Paraoxonase active site required for protection against LDL oxidation involves its free sulfhydryl group and is different that required for its arylesterase/paraoxonase activities: selective action of human paraoxonase allozymes Q and R. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:1617-25.
30. Mackness MI, Arrol S, Mackness B, Durrington PN. Alloenzymes of paraoxonase and the effectiveness of high-density lipoprotein in protecting low-density lipoprotein against lipid peroxidation. *Lancet* 1997;349:851-2.
31. Mackness B, Durrington PN, Mackness MI. Polymorphisms of paraoxonase genes and low-density lipoprotein lipid peroxidation. *Lancet* 1999;353:468-9.
32. Aviram MI, Hardak E, Vaya J, Mahmood S, Milo S, Hoffman A, et al. 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;101:2510-7.
33. Antikainen M, Murtomaki S, Syvanne M, Pahlman R, Tahvanainen E, Jauhainen M, et al. The Gln-Arg 191 polymorphism of the human paraoxonase gene (HUMPONA) is not associated with the risk of coronary artery disease in Fins. *J Clin Invest* 1996;98:883-5.
34. Herrmann SM, Blanc H, Poirier O, Arveiler D, Luc G, Evens A, et al. The Gln/Arg polymorphism of human paraoxonase (PON192) is not related to myocardial infarction in the ECTIM study. *Atherosclerosis* 1996;126:299-303.
35. Suehiro T, Nakauchi Y, Yamamoto M, Arai K, Itoh H, Hamashige N, et al. Paraoxonase gene polymorphism in Japanese subjects with coronary heart disease. *Int J Cardiol* 1996;57:69-73.
36. Ferré N, Tous M, Paul A, Zamora A, Vendrell JJ, Bardají A, et al. Paraoxonase Gln-Arg (192) and Leu-Met (55) gene polymorphisms and enzyme activity in a population with a low rate of coronary heart disease [en prensa]. *Clin Biochem*.
37. Malin R, Knuuti J, Janatuinen T, Laaksonen R, Vesalainen R, Nuutila P, et al. Paraoxonase gene polymorphisms and coronary reactivity in young healthy men. *J Mol Med* 2001;79:449-58.
38. Lehtimäki T, Lehtinen A, Solakivi T, Nikkila M, Jaakkola O, Jokela H, et al. Autoantibodies against oxidized low density lipoprotein in patients with angiographically verified coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:23-7.
39. Maggi E, Bellazzi R, Falaschi F, Frattoni A, Perani G, Finardi G, et al. Enhanced LDL oxidation in uremic patients: an additional mechanism for accelerated atherosclerosis? *Kidney Int* 1994;45:876-83.
40. Shanti A, Santanam N, Morales AJ, Parthasarathy S, Murphy AA. Autoantibodies to markers of oxidative stress are elevated in women with endometriosis. *Fertil Steril* 1999;71:1115-8.
41. Orchard TJ, Virella G, Forrest KY, Evans RW, Becker DJ, Lopes-Virella MF. Antibodies to oxidized LDL predict coronary artery disease in type diabetes: a nested case-control study from the Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study. *Diabetes* 1999;48:1454-8.
42. Bergmark C, Wu R, de Fraire U, Lefvert AK, Swedenborg J. Patients with early-onset peripheral vascular disease have increased levels of autoantibodies against oxidized LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:441-5.
43. Uusitupa MI, Niskanen L, Luoma J, Vilja P, Mercuri M, Rauramaa R, et al. Autoantibodies against oxidized LDL do not predict atherosclerotic vascular disease in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:1236-42.
44. Van de Vijver LP, Steyger R, Van Poppel G, Boer JM, Kruijsen DA, Seidell JC, et al. Autoantibodies against MDA-LDL in subjects with severe and minor atherosclerosis and healthy population controls. *Atherosclerosis* 1996;122:245-53.