

# Estudio de los valores de la paraoxonasa y su actividad en suero y humor vítreo de pacientes diabéticos

## Study of paraoxonasa values and their activity in serum and vitreous humor of diabetic patients

P. Pujol Gomis, P. Romero Aroca

Hospital Universitario Sant Joan de Reus. Reus. Tarragona.

### Correspondencia:

Patricia Pujol Gomis

E-mail: [patrireus@hotmail.com](mailto:patrireus@hotmail.com)

### Resumen

Las enzimas de la familia de la PON (paraoxonasa) degradan peróxidos lipídicos, lo que implica que estas enzimas podrían afectar de forma importante una gran variedad de enfermedades en las que estén involucradas alteraciones en el balance redox y producir un aumento del estrés oxidativo. Se han descrito alteraciones en los niveles circulantes de PON 1 en varias enfermedades, en las que el estrés oxidativo está involucrado. El estudio intenta demostrar la modificación de los valores de PON en los diabéticos y la consecuencia de éste cambio, tanto a nivel de suero/plasma, donde ya se habían hecho estudios al respecto, como a nivel de humor vítreo, donde no hay han estudios todavía descritos. Se encuentran resultados con significación estadística en los ojos con edema macular diabético (EMDBT), que, respecto a los que no tienen, presentan niveles aumentados en humor vítreo de PON1 y 3 y sus actividades, y valores a la inversa en suero/plasma, hecho que apoya la hipótesis de que existe una producción intraocular como respuesta a intentar frenar el grado de inflamación asociada a la enfermedad.

### Resum

Els enzims de la família de la PON (paraoxonasa) degraden peròxids lipídics, i això implica que aquests enzims podrien afectar de forma important una gran varietat de malalties en les que hi estiguin involucrades alteracions en el balanç redox i produir un augment de l'estrés oxidatiu. S'han descrit alteracions en els nivells circulants de PON1 en diverses malalties en les què l'estrés oxidatiu hi està involucrat. L'estudi intenta demostrar la modificació dels valors de PON en els diabetètics i la conseqüència d'aquest canvi, tant a nivell de sèrum/plasma, on ja s'havien fet estudis al respecte, com a nivell de humor vitri, on no hi han estudis encara descrits. Es troben resultats amb significació estadística en els ulls amb edema macular diabètic (EMDBT), que ,respecte els que no en tenen, presenten nivells augmentats en humor vitri de PON 1 i 3 i les seves activitats, i valors a la inversa en sèrum/plasma, la qual cosa recolza la hipòtesi que existeix una producció intraocular com a resposta a intentar frenar el grau d'inflamació associada a la malaltia.

### Abstract

Enzymes of the PON (paraoxonasa) family degrade lipid peroxides, and this means that what these enzymes could significantly affect a variety of diseases in which alterations involved in redox balance are increased oxidative stress. Alterations in the circulating levels of PON 1 have been described in various diseases, in which oxidative stress is involved. The study tries to demonstrate the modification of PON values in diabetic people and the consequence of this change, both at the serum/plasma levels, where studies had already been done about it, as a vitreous humor level, where studies have not been described yet. We found results with statistical significance in eyes with diabetic macular edema (EMDBT), which, with respect to those who have none, have increased levels in vitreous humor of PON1 and 3 and their activities, and values in reverse in serum/plasma. This fact support the hypothesis that there is an intraocular production in response to an attempt to halt the degree of inflammation associated with the disease.

Artículo premiado con una Beca en el 45º Congreso de la Societat Catalana d'Oftalmologia.

## Introducción

En 2015 había 387 millones de personas en todo el mundo afectadas de DM, de las que un 50% no estaban diagnosticadas. La DM ha ido escalando puestos en el ranking mundial de causas de mortalidad. Se prevé un rápido aumento del número de casos nuevos en todo el mundo, hasta llegar a 592 millones de diabéticos en 2035. Estas cifras muestran la gravedad de esta epidemia global ya catalogada por la Organización Mundial de la Salud (OMS). La consecuencia del incremento de la diabetes, se refleja claramente en la carga que representa para los servicios de salud, y se considera que la atención de esta enfermedad y sus complicaciones consume un 9-14% de los presupuestos de salud de Europa y Estados Unidos<sup>1-3</sup>.

La DM es una enfermedad compleja, ya que tiene un origen multifactorial y porque afecta a muchas partes del organismo. La incapacidad del organismo para regular la glucemia lleva a un estado de hiperglucemia mantenida que provoca la activación de diferentes mecanismos bioquímicos que suceden a nivel intracelular como consecuencia de ésta. Se activan la vía del sorbitol, glicación proteica, protein kinase, la hexosamina y, sobre todo, el estrés oxidativo<sup>4</sup>.

Este estrés oxidativo juega un papel fundamental en la patogénesis de enfermedades degenerativas crónicas, y se ve favorecido por la formación descontrolada de radicales libres que pueden proceder tanto de fuentes endógenas (del propio metabolismo celular) o de fuentes exógenas (luz ultra violeta, radiaciones, polución y/o tabaco)<sup>4</sup>.

La retina es particularmente susceptible al daño oxidativo. Como sistemas antioxidantes primarios de acción enzimática disponemos del sistema oxido-dismuntasa (SOD), glutation-peroxidasa (GPX), catalasa (CAT) y PON y como antioxidantes secundarios disponemos de los antioxidantes presentes en los alimentos como son los polifenoles, vitaminas y carotenos de entre otros<sup>4,5</sup>.

En concreto la familia de la PON<sup>6</sup> tiene un papel muy importante en la lucha contra el estrés oxidativo. Está formada por 3 miembros, conocidos como PON 1, PON 2 y PON 3, los genes se encuentran localizados de forma adyacente en el brazo largo del cromosoma 7<sup>7</sup>. Las proteínas PON 1 y PON 3 se encuentran localizadas de forma intracelular y extracelular celular, estando unidas a las lipoproteínas de baja densidad (HDL), mientras que PON2 sólo ha sido detectada intracelularmente, unida a la membrana plasmática. PON 2 y PON 3 presentan sólo actividad lactonasa, mientras que

la proteína PON1 presenta actividad paraxonasa (capacidad de hidrólisis de compuestos organofosforados), actividad esterase (capacidad para hidrolizar ésteres aromáticos) y lactonasa (capacidad para hidrolizar lactonas). En concreto, la actividad lactonasa presente en las 3, es la responsable de la hidrólisis de peróxidos lipídicos, los que están implicados en el proceso de aterogénesis y otras enfermedades caracterizadas por la acumulación de grasa. Por lo tanto se puede determinar que tanto PON 1 como PON 3 son elementos importantes de protección contra el daño oxidativo y la peroxidación lipídica<sup>4,5</sup>.

La retinopatía diabética (RPDBT) se presenta en forma de microangiopatía inflamatoria de bajo grado por la combinación de alteraciones metabólicas que engloban hipoxia, glicosilación y estrés oxidativo. Los mecanismos que inician esta microangiopatía inflamatoria de bajo grado se desconocen, pero según los estudios, parece que las lipoproteínas de baja densidad (LDL) oxidadas tienen un papel importante. Las LDL oxidadas han demostrado ser citotóxicas para las células endoteliales de los capilares de la retina y para los pericitos presentes en la membrana basal. La baja actividad de PON 1, junto con la alta concentración de proteína C reactiva (PCR) y, muy probablemente el componente inflamatorio, están asociadas a la disminución del potencial antioxidant en los pacientes diabéticos y son unos importantes marcadores de la progresión de la retinopatía.

La PON1 actuaría a través de dos vías: la vía metabólica de actuación antioxidant mediante la inhibición de la formación de MDA (producto de la peroxidación lipídica), produciendo una aumento del MDA en la lipoproteína de alta densidad (HDL) que lleva a la activación del receptor endotelial lecitina-like LDL (LOX-1) que induce la activación de la protein kinase (PK), que a su vez inhibe la vía de producción del óxido nítrico. Y la vía de actuación antiinflamatoria se realizaría a través de la inhibición de la enzima mieloperoxidasa (MPO), esta molécula en condiciones inflamatorias uniría a la HDL y en la PON 1 formando grupos ternarios, que inhibirían la acción de la PON 1. La MPO es una proteína derivada de los leucocitos que promueve la oxidación lipídica, uniéndose a la PON 1, reduciendo su actividad a través de la modificación de algunos residuos de tirosina y de metionina de la misma, lo que haría aumentar el estrés oxidativo<sup>4-6</sup> (Figura 1). Por lo tanto la PON 1 sería una enzima clave en la prevención los mecanismos antioxidant y antiinflamatorios, ambos relacionados con la DM y sus complicaciones<sup>8-15</sup>.

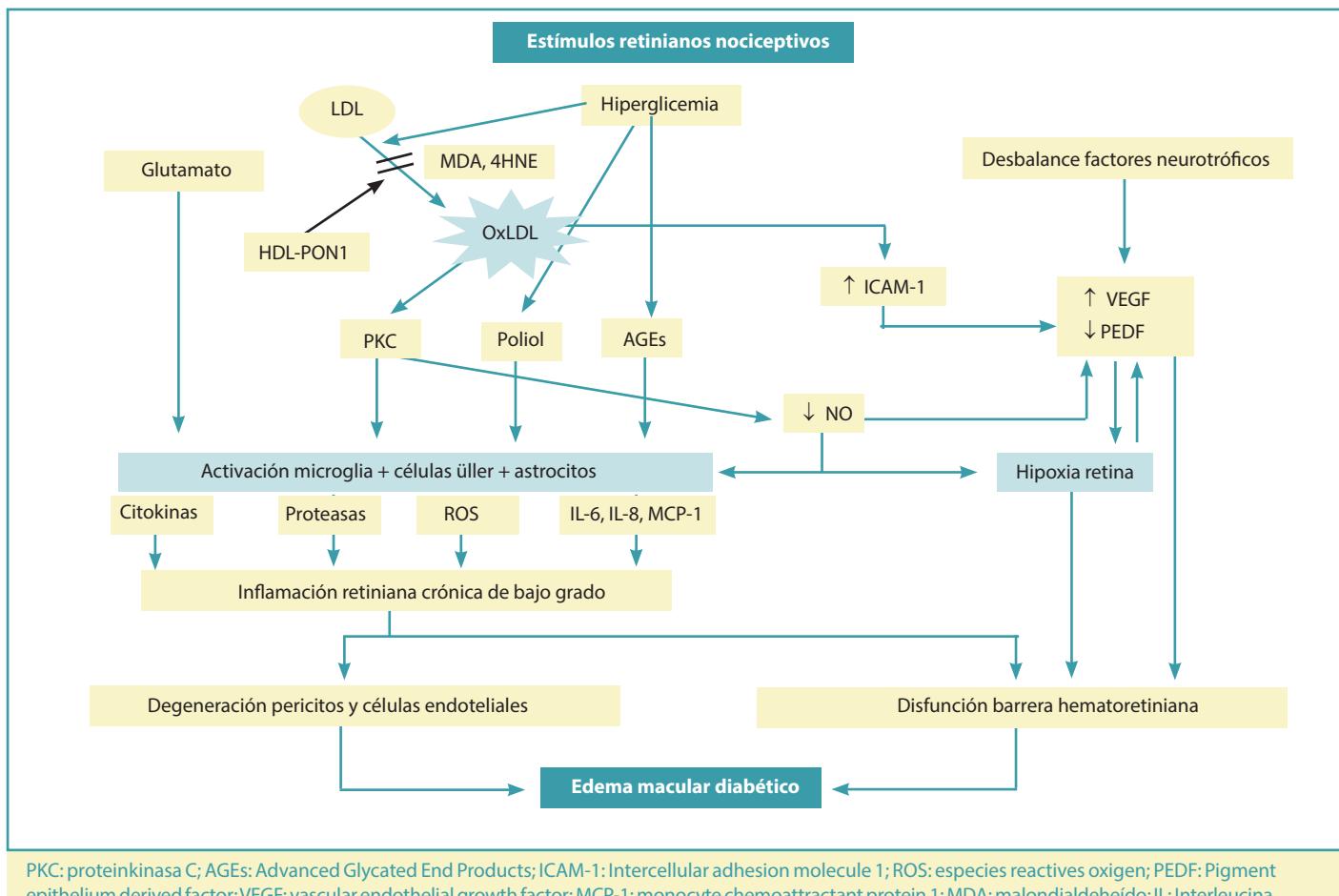


Figura 1. Esquema de la cascada inflamatoria desencadenada por la peroxidación lipídica de las LDL.

La PON 2 actuaría de forma intracelular, modulando el estrés oxidativo producido por los radicales libres generados por las mitocondrias, compuestos fundamentales en las vías que contribuyen a generar las enfermedades cardiovasculares. Los estudios publicados hasta la actualidad sugieren que la actividad antiaterogénica de la PON 2 estaría vinculada a la función mitocondrial<sup>16,17</sup>.

Finalmente, la PON 3, comparte similitudes con la forma de actuación de la PON 2 a nivel mitocondrial, pero a su vez actuaría inhibiendo la oxidación de las LDL, protegiendo del desarrollo de la DM y de la aterosclerosis<sup>16,17</sup>, actuando sobre el desarrollo de la obesidad, hecho que se han demostrado en ratones.

La relación entre la PON y la DM ha despertado interés últimamente. En la DM se produce una sobreexpresión de las especies

reactivas oxidativas (ROS), consecuencia de la hiperglicemia crónica, la hiperinsulinemia y la dislipemia. Asimismo, los niveles de PON 1 se observan disminuidos, por la glicosilación de la enzima, estos bajos niveles se observan sobre todo en caso de existir complicaciones como son la neuropatía, nefropatía o RPDBT<sup>5</sup>. A su vez la existencia de algunos polimorfismos genéticos de la PON 1 y PON 2, se han asociado a la presencia de nefropatía y RPDBT. En el caso de la RPDBT se han descrito que el alelo L del polimorfismo Met/Leu55 de PON1 está asociado a una mayor presencia de complicaciones retinianas<sup>12,16</sup>.

El mecanismo que relacionaría las paroxonosas y la DM sería a través de su acción sobre el estrés oxidativo. La sobre-expresión de PON1 disminuye en ratones el estrés oxidativo en macrófagos,

disminuyendo el riesgo de desarrollar DM. Los niveles bajos de PON 1 se han relacionado con aumento de la proteína C reactiva (PCR), que es independiente las adipocinas, y también con la obesidad o los lípidos<sup>12</sup>. A su vez un descenso de los niveles de PON1 aumentaría el nivel de inflamaciones de bajo grado, como las que se cree que acompañan a la RPDBT traccional y el EMDBT.

En la actualidad se desconoce bastante sobre la relación entre PON 1 y la RPDBT, todos los estudios realizados hasta ahora<sup>6,12,16</sup> se basan en datos analíticos a nivel de suero/plasma, no existiendo estudios de determinación a nivel de vítreo o retina de los valores de esta enzima.

Sin embargo, sí que se ha demostrado que a nivel del cristalino existen cantidades de mesurables de PON 1, así como a nivel del humor acuoso, datos publicados en un estudio realizado en enfermos intervenidos de catarata y con enfermedad pulmonar obstructiva crónica<sup>8,9</sup>.

En los estudios publicados hasta ahora se ha demostrado que la actividad PON1 está disminuida en diabéticos, ya que asocia un aumento de la peroxidación de lípidos que hay en la DM y, por tanto, contribuye a un factor determinante para la predisposición de las complicaciones de la misma.

Los estudios muestran niveles significativamente elevados de PCR en pacientes diabéticos con RPDBT en comparación con los pacientes diabéticos sin RPDBT, lo cual proporciona una correlación entre la inflamación y el desarrollo de las complicaciones microvasculares de la DM<sup>12,17</sup>.

## Material y métodos

Se seleccionaron aleatoriamente 63 ojos de pacientes derivados para cirugía vitreoretiniana, 32 (50,8%) eran diabéticos, de los cuales 5 era tipo 1 y 28 eran tipo 2, y 31 (49,2%) no diabéticos. La subpoblación diabética estaba formada por 3 (4,8%) ojos con RPDBT leve, 14 (22,2%) ojos con RPDBT moderada y 16 (25,4%) ojos con RPDNT proliferativa, y 20 (31,74%) de los ojos eran de pacientes que estaban tratados con insulina. Dentro de la población seleccionada los motivos para la intervención quirúrgica fueron en 11 (17,5%) casos extracción de membrana epirretiniana (MER), en 4 (6,3%) casos luxación del cristalino, en 8 casos (12,7%) vitrectomía por edema macular traccional, en 14 (22,3%) casos desprendimiento de retina, en 2 (3,2%) casos luxación de lente intraocular (LIO), en 18 (28,6%) casos hemovítreo y en 4 (6,3%) casos

agujero macular. Sólo 2 ojos (3,17%) habían recibido inyecciones intravítreas previas, y 15 (23,8%) ojos habían recibido tratamiento con láser argón previo.

Las variables de cantidad estudiadas fueron actividad paraxonasa en sérum (U/L), actividad lactonasa en sérum (U/L), concentración de PON 1 y 3 en sérum (mg/L), concentración de PON 1 y 3 en humor vítreo y sus actividades específicas (mg/dL) edad, índice de masa corporal (IMC), creatinina en sérum (mg/dL), urea en sérum (mg/dL), filtrado glomerular en sérum, glucosa en sérum (mg/dL), hemoglobina glicosilada en sérum (HbA1c), peso (Kg) y talla(cm).

Los objetivos principales eran demostrar la presencia de PON 1 a las muestras de humor vítreo, determinar los valores de PON en suero/plasma y humor vítreo en diabéticos y en pacientes diabéticos con EMDBT, determinar la relación entre la PON y el grado de RPDBT observada. Como objetivos secundarias relacionar niveles de PON en suero/plasma con los del humor vítreo, relacionar el control metabólico de la DM (a través de los valores de hemoglobina glicosilada [HbA1c]) con los niveles de PON en suero/plasma y humor vítreo y relacionar variables propias de la enfermedad diabética (tipo de DM, tratamiento, edad, hipertensión arterial [HTA], índice de masa corporal [IMC]) con PON en suero/plasma y humor vítreo. Los criterios de exclusión que se establecieron eran que los pacientes no hubieran tenido ninguna cirugía ocular en los 6 meses anteriores, la presencia de uveítis anterior o posterior activa o no en la actualidad, tratados con antiinflamatorios no esteroidales (AINE) y/o corticoides vía oral y/o vía tópica en los 6 meses anteriores y los tratados con anti factor de crecimiento endotelial (anti-VEGF) y/o corticoides por vía intravítreo en los 6 meses anteriores.

Se realizó una exploración oftalmológica completa con retinografía y tomografía de coherencia óptica (OCT) macular incluidas. La recogida y análisis de datos, con previa firma del consentimiento informado y la aprobación por parte del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitari San Juan de Reus (CEIC), fue mediante extracción de muestras de suero y plasma-EDTA, que fueron centrifugadas y guardadas a -80°C hasta el momento de las determinaciones y muestras de humor vítreo intraocular extraídas vía vitrectomía pars plana enviadas directamente para realizar la inmunohistoquímica.

Las variables de cantidad estudiadas fueron: actividad paraxonasa en suero (U/L), actividad lactonasa en suero (U/L), concentración de PON 1 y 3 en suero (mg/L), concentración de PON 1 y 3 en humor vítreo y sus actividades específicas (mg/dl) edad, índice de

masa corporal (IMC), creatinina en suero (mg/dl), urea en suero (mg/dl), filtrado glomerular en suero, glucosa en suero (mg/dl), HbA1c, peso (kg) y talla (cm).

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa estadístico SPSS. El grado de significación mínima se estableció en P 0,05 a cada test. Se utilizaron métodos estándar (Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilks) para comprobar si las variables seguían una distribución normal. Las diferencias entre dos grupos se analizaron con el test t-Student (paramétrico) o con el test U-Mann-Whitney (no paramétrico). Las diferencias que hay entre grupos se analizaron con el ANOVA. Para evaluar el grado de asociación entre dos variables se utilizaron los coeficientes de correlación de Pearson (paramétrico) y Spearman (no paramétrico) o el test de Kruskall Wallis (categórico).

## Resultados

No se encontraron diferencias dependientes del sexo, ni por edad, ni por presencia de HTA, ni por IMC.

El análisis estadístico entre ojos diabéticos y no diabéticos, excluyendo los casos de hemovítreo, no mostró resultados significativamente estadísticos, pero sí se obtuvo curiosamente un aumento

de las medias de los valores de PON1, PON3 y las actividades paraxonasa y lactonasa en el humor vítreo, y viceversa en suero/plasma (Tabla 1).

Donde se obtuvieron los resultados con más relevancia y con significación estadística fue al comparar los ojos con EMDBT y los ojos sin EMDBT, entendiendo que los ojos de pacientes que no presentaban EMDBT engloban a pacientes diabéticos y a pacientes no diabéticos. PON 1 y 3, la actividad paraxonasa y lactonasa específicas en humor vítreo se hallaron aumentados, y los mismos valores disminuidos en sangre/suero (Tabla 2). El análisis estadístico al comparar los pacientes con EMDBT y sin EMDBT excluyendo los no diabéticos no daba resultados significativos.

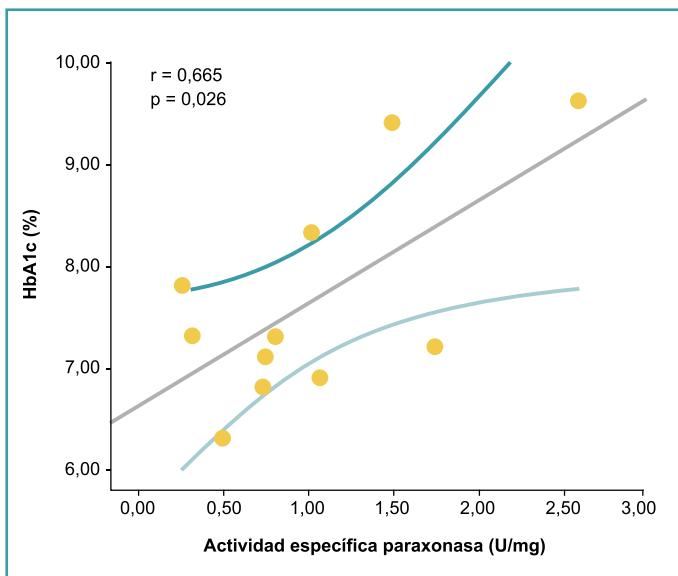
Según el grado de RPDBT se observó que la mayoría de datos significativos eran al comparar los casos de ojos sin RPDBT con los que tenían RPDBT proliferativa. Curiosamente los valores de las medias de PON 1 en humor vítreo aumentaron paralelamente al aumento del grado de RPDBT, menos en el estadio de RPDBT proliferativa, donde se producía un descenso (Tabla 3). Los ojos de los pacientes tratados con insulina comparados con los ojos de los paciente que no se trataban con insulina mostraba una diminución de los valores PON 1 y de la actividad paraxonasa en

	Diabético (N=32)	No diabético (N=31)	P
Actividad paraxonasa sérum (U/L)	138,40 (99,94-210,08)	135 (108,20-212,51)	0,48
Actividad lactonasa sérum (U/L)	6 (2,99-9,6)	6,15 (3,4-9,7)	0,89
Concentración PON 1 sérum (mg/L)	182,37 (4,90-550,02)	218,30 (37,28-631,72)	0,50
Concentración PON3 sérum (mg/L)	8,1 (6,03-20,63)	9,80 (5,54-17,16)	0,36
Concentración PON1 HV	0,24 (0,001- 1,12)	0,03 (0,0004-0,33)	0,67
Concentración PON3 HV	1,21 (0,09-58,3)	1,29 (0,17-12,80)	0,60
Edad paciente (años)	71,50 (42,30-81,00)	71 (48,20-83,80)	0,56
Creatinina sérum (mg/dL)	0,93 (0,33-2,90)	0,78 (0,55-1,44)	0,08
Urea sérum (mg/dL)	39,0 (22,8-135,16)	36,0 (18,7-55,7)	0,66
Filtrado glomerular sérum	44,00 (30,4-77,39)	64,5 (59-70)	0,18
Glucosa sérum (mg/dL)	144,00 (79,0-282,0)	91 (77,2-114,7)	<b>0,00</b>
HbA1c (%)	7,7	5,9 (5,9-5,9)	0,09
Peso (kg)	85,5 (62,45-105,0)	72,5 (51-96)	<b>0,01</b>
Talla (cm)	165 (150,3-182,2)	161,5 (143-175)	0,258
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	30,9 (25,5-39,48)	26,67 (21,45-40,35)	<b>0,05</b>
Actividad específica paraxonasa (U/mg)	0,80 (0,26-8,09)	0,62 (0,17-4,61)	0,27
Actividad específica lactonasa (U/mg)	0,03 (0,008-0,47)	0,27 (0,009-0,15)	0,39

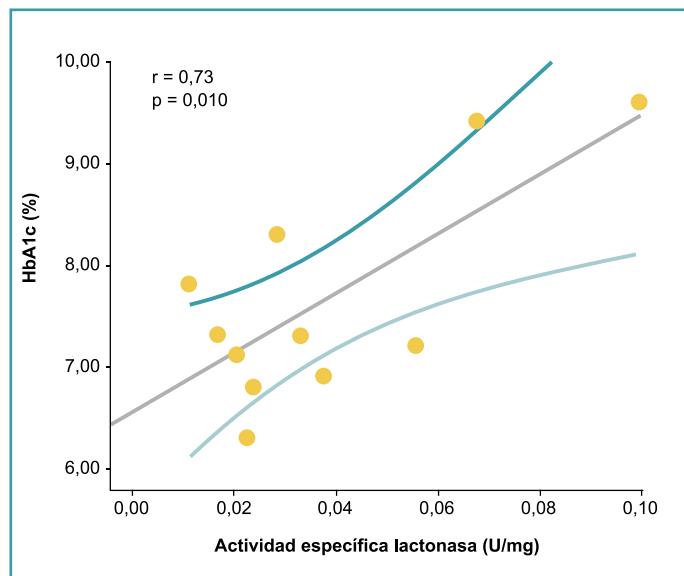
**Tabla 1.** Tabla descriptiva entre pacientes diabéticos y no diabéticos, excluyendo los casos con hemovítreo. Observamos marcados los valores de P con significación estadística de las variables cuantitativas.

Variables cuantitativas	EMDT (N = 8)	No EMDT (N = 55)	P
Actividad paraxonasa sérum (U/L)	131,70 (119,90-163,60)	136,70 (108,20-214,68)	0,87
Actividad lactonasa sérum (U/L)	6,00 (3,90-7,00)	6,15 (3,41-9,90)	0,58
Concentración PON 1 sérum (mg/L)	114,68 (63,14-588,03)	218,30 (10,55-423,82)	0,64
Concentración PON3 sérum (mg/L)	8,00 (6,10-21,80)	9,2 (5,7-15,98)	0,75
Concentración PON1 HV	0,15 (0,02-1,33)	0,02 (0,001-0,28)	<b>0,02</b>
Concentración PON3 HV	3,47 (0,78-19,67)	1,18 (0,18-12,29)	<b>0,01</b>
Edad paciente (años)	69,50 (49,00-79,00)	72 (43,80-81,4)	0,40
Creatinina sérum (ml/min o mg/dL)	0,89 (0,40-1,25)	0,81 (0,55-2,44)	0,95
Urea sérum (mg/dL)	39,50 (31,00-55,00)	37,00 (22,15-74,8)	0,77
Filtrado glomerular (mg/dL)	---	45,00 (30,4-77,39)	---
Glucosa en sérum (mg/dL)	129,00 (110,00-223,00)	102,00 (79,0-260,40)	0,06
HbA1c (%)	7,75 (7,2-9,40)	7,30 (5,9-13,50)	0,53
IMC	29,75 (26,77-35,88)	30,11 (5,9-13,50)	0,85
Actividad específica paraxonasa (U/mg)	1,18 (0,26-2,01)	0,65 (0,26-5,34)	<b>0,53</b>
Actividad específica lactonasa (U/mg)	0,05 (0,01-0,11)	0,02 (0,008-0,21)	<b>0,40</b>

**Tabla 2.** Tabla descriptiva entre pacientes con EMDT y sin EMDT. Observamos marcados los valores de P con significación estadística de las variables cuantitativas.



**Figura 2.** Gráfica de correlación positiva entre HbA1c y la actividad específica paraxonasa en los pacientes diabéticos.



**Figura 3.** Gráfica de correlación positiva entre HbA1c y la actividad específica lactonasa en los pacientes diabéticos.

sérum/plasma y aumento de la actividad paraxonasa y lactonasa en humor vítreo (Tabla 4). Las gráficas de correlación también mostraron resultados estadísticamente significativos en la población

diabética, donde se encontró una  $r = 0,665$  entre los valores de HbA1c y la actividad específica paraxonasa, y una  $r = 0,73$  entre los valores la HbA1c y la actividad específica lactonasa (Figuras 2 y 3).

Variables cuantitativas	No RPDBT (N = 30)	RPDBT leve (N= 3)	RPDBT mod. (N= 14)	RPDBT prolif. (N = 16)	P1	P2	P3	P4	P5	P6
Actividad paraxonasa sérum (U/L)	135 (108,20-212,51)	177,00 (155,20-215,60)	138,40 (116,60-197,20)	131,70 (96,40-183,70)	<b>0,05</b>	0,53	0,80	0,12	<b>0,03</b>	0,43
Actividad lactonasa sérum (U/L)	6,1 (3,43-9,70)	5,7 (5,60-7,80)	6,20 (3,90-7,00)	5,80 (2,60-10,40)	0,70	0,79	0,95	0,76	0,76	0,94
Concentración PON 1 sérum (mg/L)	218,3 (37,2-631,72)	281,21 (241,68-356,18)	176,26 (63,14-588,03)	153,30 (2,73-342,36)	0,19	0,83	0,13	0,57	<b>0,02</b>	0,19
Concentración PON 3 sérum (mg/L)	9,8 (5,54-17,16)	7,30 (7,20-16,00)	8,10 (7,10-21,80)	8,40 (6,00-10,30)	0,84	0,94	0,15	0,55	0,88	0,51
Concentración PON 1 HV	0,03 (0,0004-0,33)	0,02 (0,01-0,05)	0,04 (0,01-1,33)	0,01 (0,001-0,29)	0,71	0,43	<b>0,03</b>	0,48	0,55	<b>&lt;0,01</b>
Concentración PON 3 HV	1,42 (0,17-13,05)	0,98 (0,56-3,62)	1,30 (0,00-19,67)	1,18 (0,23-84,09)	0,94	0,65	<b>0,03</b>	<b>0,02</b>	0,85	0,64
Edad paciente	71,5 (47,85-83,90)	74,00 (67,00-81,00)	71,00 (49,00-79,00)	70,50 (41,00-81,00)	0,57	0,51	0,31	0,43	0,25	0,72
Creatinina sérum (ml/min o mg/dL)	0,78 (0,55-1,44)	1,09 (1,09-1,09)	0,93 (0,40-1,76)	0,91 (0,29-3,10)	0,40	0,13	0,23	0,83	0,87	0,95
Urea sérum (mg/dL)	36,00 (18,70-55,70)	36,00 (36,00-36,00)	46,00 (26,00-71,00)	35,00 (22,00-150,20)	0,90	0,19	0,75	0,80	0,90	0,41
Filtrado Glomerular (mg/dL)	64,5 (59,00-70)	---	44,00 (44,00-46,00)	38,30 (30,40-77,39)	---	0,20	0,80	---	---	0,70
Glucosa en sérum (mg/dL)	90,5 (77,00-114,00)	101,00 (101,00-101,00)	126,00 (79,00-176,00)	166,50 (92,00-282,00)	0,48	<b>0,001</b>	<b>0,000</b>	0,46	0,23	<b>0,02</b>
HbA1c (%)	5,9 (5,90-5,90)	6,80 (6,80-6,80)	7,50 (6,12-8,30)	9,00 (6,30-13,50)	0,31	0,22	<b>&lt;0,01</b>	0,44	<b>0,02</b>	0,31
IMC	26,67 (21,45-40,35)	29,04 (27,60-30,48)	32,52 (25,05-36,51)	31,16 (24,52-39,64)	0,64	0,06	<b>0,03</b>	0,53	0,44	0,97
Actividad específica paraxonasa (U/mg)	0,62 (0,17-4,61)	0,60 (0,55-0,73)	0,84 (0,26-2,01)	1,06 (0,28-45,79)	0,71	<b>0,05</b>	<b>0,05</b>	0,57	0,29	0,25
Actividad específica lactonasa (U/mg)	0,02 (0,009-0,15)	0,02 (0,01-0,02)	0,03 (0,01-0,10)	0,04 (0,007-2,12)	0,35	0,63	<b>0,04</b>	0,69	0,12	0,17

P1: No RPDBT- RPDBT leve, P2: No RPDBT- RPDBT moderada, P3: No RPDBT- RPDBT proliferativa, P4: RPDBT leve - RPDBT moderada, P5: RPDBT leve- RPDBT proliferativa, P6: RPDBT moderada - RPDBT proliferativa.

**Taula 3.** Tabla descriptiva entre los distintos grados de RPDBT.

## Discusión

Existieron varias limitaciones en el estudio, la principal fue el número de ojos incluidos en el estudio, sobretodo al intentar comparar la subpoblación diabética y la no diabética, y aun más agravado al intentar excluir los casos de hemovítreo en algunas comparaciones estadísticas, que ya no fueron posibles por el numero insuficiente de casos, y el programa estadístico no lo permitía. La

otra limitación fue que, se aceptó previamente con el CEIC del Hospital el no intervenir quirúrgicamente para la obtención de muestra de humor vítreo a los ojos que no hubiera una indicación quirúrgica para hacerlo, de este modo no podemos obtener muestras suficientes de diabéticos que no precisan cirugía.

Hay que tener en cuenta que los valores de PON y de otros componentes de la cascada inflamatoria pueden estar influenciados por

Variables cuantitativas	Si TT con insulina (N=20)	No TT con insulina (N=43)	P
Actividad paraxonasa sérum (U/L)	128,5 (96,4-183,7)	156,9 (123,3-215,6)	<b>0,03</b>
Actividad lactonasa sérum (U/L)	6,0 (2,6-10,4)	6,0 (3,9-7,8)	1,0
Concentración PON 1 sérum (mg/L)	160,29 (2,7-375,34)	261,4 (63,14-588.03)	<b>0,01</b>
Concentración PON3 Sérum (mg/L)	8,2 (6,0-12,9)	8,0 (7,1-21,80)	0,84
Concentración PON1 HV	0,02 (0,001-1,33)	0,04 (0,01-0,21)	0,27
Concentración PON3 HV	1,31 (0,23-84,09)	0,87 (0,00-7,07)	0,17
Edad paciente	70,5 (41,1-80,9)	71,0 (49,0-81,0)	0,25
Creatinina sérum (ml/min o mg/dL)	0,95 (0,30-3,07)	0,86 (0,4-1,47)	0,57
Urea sérum (mg/dL)	37,0 (22,0-150,2)	46,0 (31,0-64,0)	0,58
Filtrado Glomerular (mg/dL)	44,0 (30,4-77,39)	46,0 (46,0-46,0)	0,66
Glucosa en sérum (mg/dL)	151,0 (79,0-282,0)	127,0 (101,0-176,0)	0,31
HbA1c (%)	7,7 (6,3-13,5)	7,45 (6,1-8,3)	0,28
IMC	31,93 (24,52-39,64)	30,11 (25,05-36,26)	0,48
Actividad específica paraxonasa (U/mg)	0,99 (0,28-45,79)	0,66 (0,266-2,01)	<b>0,02</b>
Actividad específica lactonasa (U/mg)	0,04 (0,007-2,12)	0,02 (0,01-0,1)	<b>0,01</b>

**Taula 4.** Tabla descriptiva entre pacientes con tratamiento con insulina y sin tratamiento con insulina.

variables interpersonales de cada paciente, como por ejemplo en los casos de enfermedad hepática, donde pueden existir valores inferiores de PON ya que ésta se sintetiza principalmente en el hígado.

Teniendo en cuenta que no hay referencias de otros estudios similares y las limitaciones del estudio, nos cuesta extraer conclusiones firmes sobre los resultados obtenidos.

## Conclusión

Parte del grupo de investigación donde se realizó el estudio ya había publicado resultados sobre la PON en otras enfermedades, en concreto en las hepatopatías crónicas, donde se observó que la disminución significativa de la actividad de PON 1 en enfermedades hepáticas crónicas está relacionada con el grado de disfunción hepática y no con diferencias alélicas o genotípicas<sup>18</sup>. El mismo grupo de investigación estudió las relaciones entre la PON1 y las alteraciones endoteliales corneales en los pacientes con enfermedad pulmonar crónica (EPOC), estos últimos mostraron una disminución significativa de la actividad de PON1 en suero y una disminución significativa en la densidad de células endoteliales corneales<sup>9</sup>. Asimismo Fang *et al.*<sup>19</sup> mediante estudios genéticos,

analizaron los polimorfismos que afectan la actividad de la PON 1 y observaron que aquellos fenotipos que mostraban una actividad alta presentaban un menor riesgo de desarrollar cáncer<sup>19</sup>.

Nuestro estudio mostró una disminución de PON1 a nivel de suero/plasma en diabéticos, aunque no obtuvo resultados con significación estadística, pero si hay otros estudios del grupo Karabina *et al.*<sup>10</sup> que habían obtenido resultados que sugerían que la protección de la actividad esterolítica de PON1 por antioxidantes era importante para preservar su acción sobre los peróxidos de fosfolípidos, dicho de otra manera, que un incremento del estrés oxidativo en diabéticos llevaba a una pérdida en la actividad PON 1, además la disminución en la actividad de PON1 estaba inversamente relacionada con los niveles de LDL oxidadas en el sérum/plasma de estos pacientes.

Los hallazgos más significativos fueron, por un lado, una correlación positiva con significación estadística entre los grados de actividad paraxonasa y lactonasa en humor vítreo y el valor de HbA1c de los ojos diabéticos. Creemos que fue un hallazgo importante teniendo en cuenta que la HbA1c es uno de los marcadores del estado diabético del enfermo a medio/largo plazo, se visualizó

claramente siguiendo las líneas de tendencia de las gráficas de correlación. Y por otro lado el aumento de producción de PON 1 y 3, y sus actividades a nivel de humor vítreo en los casos que asociaban un cierto grado de inflamación, como en los casos de EMDBT, y viceversa en suero/plasma, ya que la etiología del EMDBT reside en el inicio de un estadio inflamatorio que va a desencadenar una serie de complicaciones. El grupo que no mostraba EMDBT también englobaba pacientes diabéticos, resultado que nos hace pensar en que este aumento estadísticamente significativo de PON 1 y 3 en humor vítreo se halla más gravemente afectado en los casos que asocian complicaciones inflamatorias, lo que nos justificaría que no saliesen resultados con significación estadística al comparar los que presentaban EMDBT y los que no en la subpoblación diabética. No se conoce exactamente el mecanismo que la producía, pero este resultado refuerza la hipótesis sobre una producción intraocular como respuesta a un estadio inflamatorio de bajo grado en los estadios iniciales de la RPDBT. La publicación de Sarabina *et al.*<sup>11</sup> trata de conocer la distribución tisular de quimiocinas, PON y mediadores de la inflamación en las situaciones que engloban acciones antioxidantes y antiinflamatorias, utilizando inmunohistoquímica y PCR cuantitativa en tiempo real se investigó PON 1 y mensajero en 23 tejidos de ratones, obteniendo una presencia de PON 1, 2 y 3, y quimiocinas en la mayoría de los tejidos investigados y, sorprendentemente el ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de estas proteínas también se expresó en la mayor parte de estos tejidos sugiriendo una producción local y la capacidad de responder *in situ* a los estímulos inflamatorios. Además, la amplia distribución y expresión del ARNm para PON y citoquinas sugerían un papel sistémico, probablemente coordinado, en la respuesta inflamatoria global.

Encontramos tendencia a un aumento paralelo entre del grado de RPDBT y los valores de PON 1 y 3 en humor vítreo, hasta llegar al estadio de RPDBT proliferativa donde estos valores sufrieron una disminución. Creemos que este hallazgo puede tener relación con una incapacidad de la PON para poder modular su producción y poder hacer frente a los estadios de inflamación más avanzados. Esta hipótesis se vería apoyada por el hecho que se demuestro una presencia intraocular de PON en humor vítreo, un vínculo entre la concentración de PON 1 y 3, la inflamación y el desarrollo de complicaciones microvascular es en DM, sugerido todo ello por los resultados obtenidos. Sobre las diferencias de evaluación de la PON entre diabéticos con RPDBT y sin RPDBT habla el estudio de Nowak *et al.*<sup>12</sup> cuyos resultados se basan en

comparar pacientes diabéticos sin RPDBT y pacientes diabéticos con RPDBT, obteniendo valores significativamente elevados de *high-sensitivity C-reactive protein* (hs-CRP) y inferiores de PON 1 en sérum/ plasma en los pacientes diabéticos con RPDBT, que confirmaría que el estrés oxidativo podría desempeñar un papel en la patogénesis de la RPDBT. Debido a la diferencia significativa en la relación PON 1/PCR entre los pacientes diabéticos con y sin RPDBT, parece que ésta relación PON 1/PCR puede utilizarse como un marcador bioquímico para la progresión de la RPDBT, aunque, evidentemente, se precisaría de más estudios al respecto.

Otros estudios<sup>14</sup> hablan sobre la influencia de PON 1 sobre las alteraciones metabólicas inducidas por las LDL oxidadas. Los resultados sugieren que PON 1 puede desempeñar un papel significativo en la supervivencia de células endoteliales mediante la protección de las mismas de las alteraciones de la cadena inducida por las LDL oxidadas, ya que existe un papel protector de HDL y PON 1 contra la oxidación y la apoptosis en las células endoteliales. Así pues las HDL de ratones deficientes de PON 1 tenían una capacidad deteriorada para proteger las células endoteliales de las LDL oxidadas. Nuestro estudio no obtuvo resultados relevantes en este sentido ya que se encontró un aumento de actividad paraxonasa en sérum/plasma y valores de PON 1 en humor vítreo disminuidos en los ojos de pacientes dislipémicos, comparados con los no dislipémicos.

Y por último, destacar los resultados que se obtuvieron al comparar los ojos de pacientes tratados con insulina con los de los ojos de pacientes no tratados con insulina, pudiendo ser o no ser diabéticos éstos últimos. Teniendo en cuenta que el hígado es uno de los principales órganos donde existe producción de PON<sup>11</sup>, y que al realizar la comparación, el grupo de tratados con insulina sólo englobaba a diabéticos, y el grupo de no tratados con insulina englobaba a algunos diabéticos y no diabéticos, podemos interpretar estos resultados como una posible consecuencia del mayor riesgo de enfermedades del hígado que tienen los diabéticos en comparación con otro grupo que engloba pacientes diabéticos no tratados con insulina y pacientes no diabéticos, así pues los diabéticos padecerían una dificultad en la producción de PON en suero/plasma debido a su peor estado hepático. En éste sentido se han realizado estudios<sup>13</sup> donde se evaluaron los efectos de la metformina en el hígado de ratones deficientes de PON1 que, sin tratar, presentaban un grado leve de esteatosis hepática. La administración de metformina agravó la inflamación

en los animales que recibieron un alimento estándar para ratones en comparación con aquellos alimentados con una dieta rica en grasas, así pues, podemos deducir que la administración de metformina produce efectos indeseables en el hígado de los ratones deficientes de PON 1.

### Agradecimientos

A todo el personal del servicio de Oftalmología del Hospital Sant Joan de Reus, en especial al Dr. Marc Baget y Dr. Ángel Bautista. A todo el personal del Instituto Pere Virgili de Reus, en especial a la Dra. Anabel Heredia. Y finalmente a la enfermera Eulàlia Oriol por su habilidad en extracciones de sangre en diabéticos.

### Bibliografía

- Organización Mundial de la Salud. Informe mundial sobre la diabetes. Disponible en: [www.who.int/diabetes/global-report](http://www.who.int/diabetes/global-report). Acceso 30 de noviembre 2016.
- Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med.* 2006;3(11):e442.
- Organización Mundial de la Salud. Plan de acción mundial para la prevención y control de las enfermedades no transmisibles 2013-2020. Disponible en: [http://www.who.int/cardiovascular\\_diseases/15032013\\_updated\\_revised\\_draft\\_action\\_plan\\_spanish.pdf](http://www.who.int/cardiovascular_diseases/15032013_updated_revised_draft_action_plan_spanish.pdf). Acceso 30 de noviembre 2016
- Elizalde J, López MI. *Retinopatía Diabética y otras complicaciones oculares de la diabetes mellitus*. Barcelona: Trespunktzero; 2007.
- Hofer SE, Bennetts B, Chan AK, et al. Association between PON 1 polymorphisms, PON activity and diabetes complications. *J Diabetes Complications.* 2006;20:322-8.
- Tang J, Kern TS. Inflammation in diabetic retinopathy. *Prog Retin Eye Res.* 2011;30(5):343-58.
- Mackness M, Mackness B. Human paraoxonase-1 (PON1): Gene structure and expression, promiscuous activities and multiple physiological roles. *Gene.* 2015;567(1):12-21.
- Soler N, Romero-Aroca P, Gris O, et al. Corneal endothelial changes in patients with chronic obstructive pulmonary disease and corneal vulnerability to cataract surgery. *J Cataract Refract Surg.* 2015;41:313-9.
- Soler N, Garcia-Heredia A, Marsillach J, et al. Paraoxonase-1 is associated with corneal endothelial cell alterations in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Inv Ophthalmol Vis Sci.* 2013;54(8):5852-8.
- Karabina SA, Lehner AN, Frank E, et al. Oxidative inactivation of paraxonase-implications in diabetes mellitus and atherosclerosis. *Biochim Biophys Acta.* 2005; 1725(2): 213-21.
- Rodríguez-Sanabria F, Rull A, Beltrán-Debón R, et al. Tissue distribution and expression of paraoxonases and chemokines in mouse: the ubiquitous and joint localisation suggest a systemic and coordinated role. *Journal of Molecular Histology.* 2010;41(6):379-86.
- Nowak M, Wielkoszyński T, Marek Kos-Kudła B, et al. Antioxidant potential, paraoxonase 1, ceruloplasmin activity and C-reactive protein concentration in diabetic retinopathy. *Clin Exp Med.* 2010;10(3):185-92.
- García-Heredia A, Riera-Borrull M, Fort-Gallifa I, et al. Metformin administration induces hepatotoxic effects in paraoxonase-1-deficient mice. *Chem Biol Interact.* 2016;249:56-63.
- García-Heredia A, Marsillach J, Rull A, et al. Paraoxonase-1 inhibits oxidized low-density lipoprotein-induced metabolic alterations and apoptosis in endothelial cells: a non directed metabolomic study. *Mediators Inflamm.* 2013;2013:156053.
- García-Heredia A, Kensicki E, Mohney RP, et al. Paraoxonase-1 deficiency is associated with severe liver steatosis in mice fed a high-fat high-cholesterol diet: a metabolomic approach. *J Proteome Res.* 2013;12(4):1946-55.
- She ZG, Chen HZ, Yan Y, et al. The human paraoxonase gene cluster as a target in the treatment of atherosclerosis. *Antioxid Redox Signal.* 2012;16(6):597-632.
- Devarajan A, Shih D, Reddy ST. Inflammation, infection, cancer and all that... the role of paraoxonases. *Adv Exp Med Biol.* 2014; 824:33-41.
- Ferré N, Camp J, Prats E, et al. Serum Paraoxonase activity: a new additional test for the improved evaluation of chronic liver damage. *Clinical Chemistry.* 2002;48(2):261-8.
- Fang D, Fan C, Ji Q, et al. Differential effects of paraxonase 1 (PON1) polymorphisms on cancer risk: evidence from 25 published studies. *Mol Biol Rep.* 2012;39:6801-9.