

00524
148



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**ESTUDIOS DE LAS ACTIVIDADES
HIDROLÍTICAS DE LA PON1 EN SUJETOS
CON Y SIN DIAGNÓSTICO DE
CARDIOPATÍA ISQUÉMICA CORONARIA**

**TRABAJO CON
FALSA DE ORIGEN**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A:
REGALADO HERNÁNDEZ JUAN CARLOS



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA 2003
MÉXICO, D.F.



Facultad de Química

1



Universidad Nacional
Autónoma de México

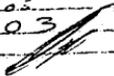


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

NOMBRE: Regalado Hernández
Juan Carlos
FECHA: 12 Nov 03
FIRMA: 

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: PROF GRACIELA NAVA DÍAZ
VOCAL: PROF MARIA EUGENIA TORRES MÁRQUEZ
SECRETARIO: PROF OSCAR ARMANDO PÉREZ MÉNDEZ
1ER SUPLENTE: PROF CLAUDIA HUESCA GÓMEZ
2DO SUPLENTE: PROF MARIA TERESA DE LOURDES FLORES CAMACHO

SITIO EN DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, ÁREA DE INVESTIGACIÓN.
INSTITUTO DE CARDIOLOGÍA "IGNACIO CHÁVEZ".


ASESOR DE TESIS: DR. OSCAR ARMANDO PÉREZ MÉNDEZ


SUSTENTANTE: REGALADO HERNÁNDEZ JUAN CARLOS

**"Nos preguntamos "¿quién me he creído para ser brillante, espléndido, talentoso, sensacional?", pero en realidad, ¿quiénes nos hemos creído para no serlo?"
Marianne Williamson**

AGRADECIMIENTOS

He sido muy afortunado y doy gracias a dios por haber tenido una familia de los que he aprendido gran parte del conocimiento de la vida

A mis padres por sus valiosos consejos y apoyo para desarrollarme profesionalmente y en la vida

A mis queridos hermanos: José Luis, Miguel Ángel y Fernando.

Al Dr. Oscar Pérez por su ayuda a desarrollar este trabajo, por sus valiosos consejos, pero sobre todo por ser un gran amigo.

A la Q.F.B Claudia Huesca Gómez por sus valiosas aportaciones.

INDICE

Capítulo 1.-Introducción.....	6
Capítulo 2.-Generalidades.....	7
2.1- Lípidos y lipoproteínas.....	7
2.2-Estructura de la paraoxonasa.....	11
3.3-Polimorfismo PON1.....	13
2.4.-Aterosclerosis- Cardiopatía isquémica coronaria y polimorfismo PON1.....	15
2.5.- Paraoxonasa y oxidación de lipoproteínas.....	18
Capítulo 3. Hipótesis y objetivos.....	23
Capítulo 4. Métodos.....	24
Capítulo 5. Resultados.....	27
Capítulo 6. Discusión de resultados.....	37
Capítulo 7. Conclusiones.....	40
Tabla de abreviaturas.....	41
Bibliografía.....	42

Capítulo 1 Introducción

Existe una correlación negativa entre la concentración de colesterol-HDL con el riesgo de aterosclerosis. Uno de los mecanismos propuestos que explican esta relación es la participación de las HDL en el transporte reverso de colesterol.

Recientemente se piensa que el papel antiaterogénico de las HDL se ha centrado en la capacidad antioxidante que poseen. Varios de sus elementos participan en esta propiedad, entre ellos sus apolipoproteínas y particularmente la enzima paraoxonasa. Esta enzima está asociada físicamente a las HDL plasmáticas.

La paraoxonasa fue descrita inicialmente como una enzima de desintoxicación que hidroliza el paraoxón, un potente inhibidor de la acetilcolinesterasa. Varios estudios han sugerido que la paraoxonasa puede disminuir el riesgo de desarrollar aterosclerosis por medio de la destrucción de moléculas pro-inflamatorias involucradas en la iniciación y progresión de la lesión arterial, debido a su actividad antilipoperoxido que es la responsable de su papel antioxidante.

Además, la enzima presenta varios polimorfismos, entre los que destaca el Q191R. La presencia de arginina en esa posición da origen a una enzima más lábil, y se presenta con mayor frecuencia en sujetos que han desarrollado aterosclerosis. En consecuencia, se ha postulado que el genotipo RR es un factor de riesgo de la enfermedad. Sin embargo, los hallazgos al respecto no han sido siempre consistentes.

En este trabajo, determinamos por un método bioquímico el fenotipo de dos grupos diferentes de sujetos, uno conformado por pacientes con historia clínica de enfermedad aterosclerótica coronaria que asisten al programa de educación preventiva del INC; el segundo está integrado por sujetos sin antecedentes personales ni familiares de la enfermedad y que asisten al banco de sangre del INC.

Se evaluó la dependencia que existe entre el nivel de C-HDL y la capacidad de la enzima presente en plasma, determinada por su actividad hidrolítica frente al fenil acetato que es representativo de su masa.

Capítulo 2 Generalidades.

2.1- Lípidos y lipoproteínas.

Las grasas absorbidas a partir de la alimentación y los lípidos sintetizados por el hígado y el tejido adiposo son transportados entre los diversos tejidos y órganos para su utilización y almacenamiento. Dado que los lípidos son insolubles en el agua, existen estrategias para su transporte en un medio acuoso, el plasma sanguíneo. La solución consiste en asociar lípidos no polares (triacilglicérolos y ésteres de colesterol) con lípidos anfipáticos (fosfolípidos y colesterol) y proteínas, para formar lipoproteínas miscibles en agua. Su insolubilidad en el agua, propiedad que los conduce a la necesidad de tener que asociarse con un tipo especial de proteínas denominadas apolipoproteínas y albúmina, para ser transportados en un medio eminente acuoso, como es el plasma. Las apolipoproteínas son compuestos que poseen una singular propiedad intrínseca que les permite interactuar en interfase, es decir, por una parte de la molécula interactúa con los lípidos y por la otra con la fase acuosa. Esta propiedad se manifiesta debido a que termodinámicamente son más estables cuando se sitúan en la superficie de una partícula, lo cual es muy importante para estabilizar la lipoproteína^{1,2}.

Las lipoproteínas difieren en razón a su composición, estructura, densidad y carga eléctrica, propiedades que han inducido al uso de diversas técnicas con el propósito de separarlas, la utilización de la centrifugación analítica permite identificar cuatro clases de lipoproteínas de diferente densidad, en cambio, la electroforesis hace lo propio aprovechando la carga eléctrica que caracteriza a cada una de ellas^{1,2}.

Sin contar a los ácidos grasos libres (AGL), se han identificado cuatro grupos mayores de lipoproteínas fisiológicamente importantes y útiles para diagnóstico clínico: quilomicrones, derivados de absorción intestinal de triacilglicérolos; lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL o prebetalipoproteínas) derivadas del hígado; lipoproteínas de baja densidad (LDL, o betalipoproteínas) que representan una etapa final en el catabolismo de VLDL y lipoproteínas de alta densidad (HDL o alfa lipoproteínas) que intervienen en el metabolismo de las VLDL y los quilomicrones y también en el transporte del colesterol².

Quilomicrones: son lipoproteínas que se encuentran en el intestino, y sintetizados utilizando los lípidos que se han ingerido con la dieta. Entre los componentes de estas lipoproteínas se encuentran los triglicéridos que se han sintetizado en el enterocito a partir de los productos de hidrólisis de los triglicéridos de la dieta, los fosfolípidos y el colesterol.

Se estructura principalmente con los triglicéridos que han sido resintetizados en nivel intestinal, los que se asocian con las apo A-I, A-II y fundamentalmente con la apo B-48 para originar los quilomicrones nacentes que por la vía linfática llegan a la circulación general donde reciben apolipoproteínas que les servirán para metabolizarse posteriormente, como son las apo C-I, C-II, C-III y apo E cedidos por las HDL^{1, 2}.

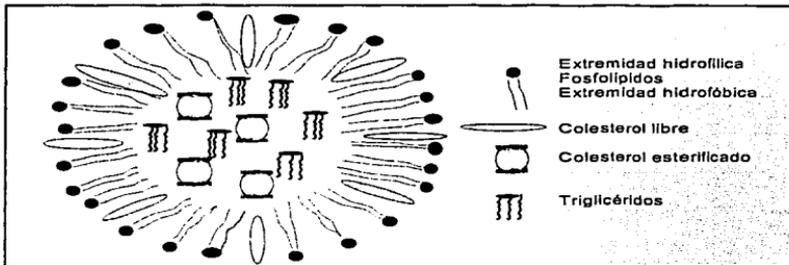


Figura 2.1- Representación esquemática de la organización de los lípidos en una lipoproteína. Las apolipoproteínas (no ilustradas) se unen por interacciones hidrofóbicas a los lípidos más externos y por atracciones electrostáticas a los fosfolípidos para estabilizar a la pseudomicela lipídica. Adaptado de Pérez O, Luc G, Posadas C³.

Lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL): Las pre-beta lipoproteínas se estructuran predominantemente en el hígado, siendo la contribución del intestino muy discreta. El mayor componente de las VLDL son los triglicéridos, que se sintetizan a partir de metabolitos proporcionados por el tejido adiposo o derivados de la glucosa, tal como el ATP, NADPH y acetil-CoA, y que sirven además para la síntesis del colesterol. La estructuración de las VLDL depende fundamentalmente de la presencia de triglicéridos, cuya disponibilidad constituye el factor que regula la secreción de la apolipoproteína B-100 componente imprescindible para las VLDL. Los triglicéridos sintetizados a partir de los ácidos grasos liberados por el tejido adiposo durante la inanición, no induce una apropiada secreción de apolipoproteína B-100, lo que trae consigo una acumulación anormal de triglicéridos en el hígado produciendo el llamado hígado graso. Los fosfolípidos, el

colesterol libre y el colesterol esterificado, principalmente estos dos últimos, parecen influir en la secreción de apo B-100².

Lipoproteínas de baja densidad (LDL): Las LDL se forman a partir de las VLDL y están constituidas básicamente por colesterol esterificado, siendo la apo B-100 su principal apolipoproteína. Estas lipoproteínas transportan el mayor porcentaje de colesterol en el organismo y existen varios tipos los que difieren por su diverso contenido en lípidos y proteínas, constituyendo su elevada presencia en sangre un factor de riesgo positivo para aterosclerosis. Gracias a la presencia de la apo B-100, es captada por órganos como el hígado que posee receptores de apo B/E, así como por el intestino y los órganos que sintetizan hormonas esteroideas y sexuales².

Lipoproteínas de alta densidad (HDL): Las lipoproteínas de alta densidad se caracterizan por ser las más pequeñas y mostrar cierta heterogeneidad a razón a la clase y proporción de los lípidos que la integran, cuyo porcentaje en relación con las apolipoproteínas no es tan alto. Sus principales apolipoproteínas son la apo A-I y A-II. Estas lipoproteínas, se originan en el hígado e intestino como partículas discoidales denominadas genéricamente HDL nacientes².

Estas están constituidas por las apolipoproteínas A1, lecitinas y en menor porcentaje colesterol y triglicéridos. Se ha evidenciado la formación de partículas similares a las HDL nacientes a partir de los quilomicrones y de las VLDL, proceso que ocurre durante el metabolismo de éstas. Las HDL nacientes se dirigen a tejidos extrahepáticos donde captan el colesterol libre que se dispone en su superficie, lugar en que se encuentran también moléculas de lecitina y las apolipoproteínas antes mencionadas².

Es bien conocido que la concentración plasmática de colesterol-HDL (C-HDL) presenta una correlación negativa con el riesgo de aterosclerosis. Uno de los mecanismos propuestos que explican esta relación es la participación de las HDL en el transporte reverso de colesterol (TRC)⁴. El TRC se define como el regreso de colesterol proveniente de las células periféricas hacia el hígado para su excreción o reciclaje⁵. La primera etapa del TRC es el flujo de colesterol de las células. El colesterol captado por las partículas pre-β1, es seguida esterificación con la participación de la Lecitina colesterol acilo transferasa (LCAT). La esterificación provoca que el colesterol pierda su carácter anfipático transformándose en una molécula hidrofóbica. En consecuencia, los ésteres de colesterol abandonan la superficie de la lipoproteína que lo transporta para situarse en el interior, aumentando el tamaño de la misma. El colesterol esterificado puede ser

intercambiado por triglicéridos provenientes de lipoproteínas que contienen la apo B, principalmente VLDL. El intercambio de lípidos hidrofóbicos está facilitado por la proteína de transferencia de ésteres de colesterol (CETP). Además de los lípidos hidrofóbicos, los fosfolípidos de las HDL son transferidos hacia las VLDL por la proteína de transporte de fosfolípidos (PLTP)^{2,3}. Los triglicéridos provenientes de las HDL₂ de las lipoproteínas ricas en triglicéridos son entonces hidrolizados por la lipasa hepática. Esta hidrólisis, en asociación con la actividad de la PLTP, disminuye el tamaño de las HDL₂ transformándolas en HDL₃ y en partículas pre-β1 que pueden reiniciar el ciclo de captación de colesterol³.

2.2.-Estructura de paraoxonasa

La paraoxonasa (PON1) fue descrita inicialmente como una enzima de desintoxicación que hidroliza el paraoxón, un potente inhibidor de la colinesterasa y de donde deriva su nombre⁴.

El gen de la PON1 es miembro de una familia que comprende al menos tres genes relacionados, PON1, PON2 y PON3. El gen PON1 está codificada en el brazo largo del cromosoma 7(7q21-22)⁵, consiste de nueve exones y ocho intrones que se extienden entre 25 y 26 Kb^{5,6,7}. La expresión del gen PON1 da origen a una glicoproteína PON1 (figura 2.2.1) de 354 aminoácidos y de masa aparente entre 43 y 45 kDa^{8,7} dependiendo del grado de glicosilación de la proteína ya que contiene más de 3 cadenas de carbohidratos que representan el 15.8 % de su peso⁸. La proteína madura retiene su señal con excepción del residuo iniciador de metionina⁹. La PON1 es una enzima estearasa tipo A que cataliza la hidrólisis de arilésteres de ácidos carboxílicos y organofosforados⁸. El sustrato más utilizado para el estudio de la enzima es el paraoxón (O,O-dietil-O-p-nitrofenil fosfato), el cual le da el nombre a la enzima de paraoxonasa. La enzima es sintetizada en el hígado, se encuentra asociada a las lipoproteínas de alta densidad (HDL), particularmente a la fracción HDL₃^{9,10}. La asociación enzima-lipoproteína está mediada por la interacción hidrofóbica de su extremo N-terminal con los fosfolípidos y las apolipoproteínas de las HDL¹¹. La PON1 (figura 2.2.1) contiene tres residuos de cisteína. En la enzima humana, los residuos Cys41 y Cys352 forman un puente disulfuro^{12,13}. La Cys 284 es un grupo sulfhidrilo libre y a pesar de que este residuo no forma parte del sitio activo de la enzima, es indispensable para su actividad ya que es requerido en la estructura terciaria del sitio activo para la conformación espacial de los aminoácidos del sitio activo^{14, 15}. Los residuos de histidina 114, 133, y 284 son también indispensables para su acción hidrolítica¹⁶, mientras que el Trp 280 forma parte del sitio activo de la enzima y está probablemente involucrada en la unión con los sustratos aromáticos^{13,17}. La paraoxonasa requiere de calcio para estabilizarse y para su actividad catalítica⁹. En este sentido, se ha sugerido que los residuos de glutamato 52 y de aspartato 53 están involucrados en la fijación del Ca²⁺. El calcio juega 2 papeles en el mecanismo catalítico, es necesario para mantener el sitio catalítico ya que uno u otro participan directamente en la reacción catalizada o por mantenimiento de la conformación apropiada del sitio activo y facilita la remoción de dietil fosfato del sitio activo posiblemente por polarización del P=O unido al paraoxón, entregando el fósforo susceptible al ataque nucleofílico⁴. Otros iones metálicos divalentes como el Zn²⁺ y el Cd²⁺ evitan la desnaturalización de la enzima, pero

carecen de la capacidad de conferirle actividad catalítica. Respecto a los otros genes de la familia, se desconocen la función del producto proteico del gen PON2. En cuanto al producto del gen PON3, se ha descrito recientemente se trata de una proteína de 40 kDa asociada a las HDL, carecen de las actividades arilesterasa y paraoxonasa características del producto proteico del gen PON1. Sin embargo, La proteína producto del gen PON3 presenta una actividad hidrolítica de lactonas aromáticas. Por esta propiedad, la PON3 es capaz de hidrolizar algunas estatinas como la lovastina¹⁸; sin embargo se ha descubierto que la PON3 ofrece una protección frente a oxidación inducida por Cu^{2+} en conejos ¹⁹.

2.3.-Polimorfismo PON1.

La PON1 es una enzima polimórfica. Se han descrito fundamentalmente dos polimorfismos de esta enzima, ambos debidos a la sustitución de un aminoácido. El primero consiste en la sustitución de glutamina (Q) por arginina (R) en la posición 191 (polimorfismo Q191R), que corresponde a los fenotipos A y B, respectivamente, de la clasificación de Adkins y colaboradores²⁰. El segundo, se caracteriza por el reemplazamiento de la leucina (L) por metionina (M) en la posición 54. Ambos sitios polimórficos están presentes en el humano²¹. Ciertos autores consideran al residuo iniciador de metionina como parte de la secuencia de la proteína madura⁹. En consecuencia los polimorfismos arriba descritos corresponden a los residuos 192 y 55, respectivamente²².

Hay algunas discrepancias en la nomenclatura del polimorfismo genético. Adkins et al, usan A para determinar la "actividad baja" y B para la "actividad alta" del genotipo; mientras Humbert et al, usan 192 QQ (actividad baja) y 192 RR (actividad alta)¹⁵.

La genética básica del polimorfismo PON1 fue investigada primeramente por Playfer et al (1976)⁸. Ellos concluyeron que las actividades bajas y altas de la PON1 sérica estaban controladas por 2 alelos en un único locus autosómico. Las dos aloenzimas son presumiblemente productos del gen localizado en el brazo largo del cromosoma 7³.

La actividad paraoxonasa de la aloenzima 191R se estimula considerablemente con NaCl a una concentración de 1M (respuesta a la sal), mientras que la aloenzima Q191 no presenta respuesta a la sal^{15,23}. Cabe destacar que la actividad enzimática de la PON1 medida con paraoxón como sustrato, no correlaciona con el riesgo de desarrollar aterosclerosis, pese a estar directamente afectada por el fenotipo Q191R. En efecto, la aloenzima 191R tiene una mayor actividad específica en comparación con la aloenzima Q191^{5,8}. No obstante la actividad paraoxonasa mayor, el genotipo 191R podría ser un factor de riesgo de aterosclerosis⁴.

La actividad arilesterasa (ARE) es asociada a la PON1. Esta actividad no se ve afectada por los genotipos Q191R⁵.

Las actividades de la paraoxonasa un cociente que clasifica a los fenotipos de acuerdo a los valores obtenidos (tabla 2.3.1).

a) Cociente a partir de las actividades PON-NaCl con ARE⁸.

Se ha definido la relación individual entre las actividades de la PON1; con la característica de estimulación NaCl 1.0M de la actividad de hidrólisis del paraoxón a un pH 10, contra la actividad de hidrólisis del fenilacetato como sustrato (actividad ARE)⁸.

Cociente = actividad paraoxonasa con NaCl 1.0 M / actividad ARE.

Tabla 2.3.1- Clasificación del fenotipo PON1 con base en su cociente^a.

Fenotipo	Cociente de actividad
QQ	<1.6
QR	1.6 - 8
RR	>8

La distribución de actividades de la PON1, así como la relación PON/ARE presentan diferencias entre ellas²³.

2.4-Aterosclerosis- Cardiopatía isquémica coronaria y polimorfismo PON1.

Los estudios que vinculan al colesterol con el desarrollo de la aterosclerosis, datan de la década de los años 50, los factores de riesgo cardiovasculares como la hipertensión arterial, la diabetes mellitus, el tabaquismo y la obesidad entre otros, han demostrado una asociación con el colesterol²⁹.

La aterosclerosis es una enfermedad crónica que se caracteriza por la formación de tejido fibroso y elementos lipídicos con el curso de agregación plaquetaria en el endotelio de las arterias, que pueden llegar a calcificarse (figura 2.4.1). Esta placa aterosclerosa o ateroma obstruyen paulatinamente la luz de los vasos hasta producir déficit de riesgo sanguíneo en el territorio tributario de dichas arterias, dicho déficit puede ser parcial cuando la arteria se encuentra significativamente obstruida o completamente cuando la obstrucción es total.

Se presenta en el endotelio vascular que es una estructura simple ya que esta constituida por una sola capa de células que recubren el interior de las arterias, tiene las siguientes funciones: contenedor de la sangre, barrera con permeabilidad selectiva, órgano que sintetiza y secreta sustancias, es regulador del tono y crecimiento vascular, regulador de la respuesta inflamatoria e inmune, regulador de la actividad homeostática y trombótica, inhibe la actividad plaquetaria^{29,29}.

La aterosclerosis resulta de curso de múltiples y complejos mecanismos que interaccionan entre sí. Por un lado, se encuentra los estímulos lesionantes del endotelio y por otra, la respuesta de la arteria para la lesión inicial, eventos que se suceden en un ambiente que se caracteriza por altas concentraciones de colesterol; así, en la cascada aterogénica se desencadena e intervienen factores genéticos y cambios anormales en el medio que rodea a la Intima arterial²⁸.

En el país la cardiopatía coronaria es la patología cardiovascular dominante, este consiste un problema de prevención y control. Las estadísticas generales informan que las Enfermedades del Corazón figuran en 1er. Lugar, como causa de muerte, desde hace más de 20 años. El problema, se va agravando gradualmente y no hay indicio de control. La aterosclerosis en todas sus formas es responsable de por lo menos la cuarta parte de todos los fallecimientos del país, la aterosclerosis coronaria es el principal determinante etiológico de la cardiopatía isquémica coronaria (CIC). Puede definirse como un proceso infiltrativo y proliferativo que afecta a la pared arterial, el cual determina la reducción del flujo sanguíneo. Podemos agrupar a las enfermedades isquémicas del corazón en dos grandes grupos: síndromes coronarios crónicos y síndromes coronarios agudos. Dentro de los crónicos se incluyen la isquemia silente y la angina de esfuerzo. Se deben a una

reducción aterosclerótica del flujo coronario, lo cual impide incrementar el flujo coronario durante las situaciones que, como el ejercicio, precisan un aumento del mismo. Se incluyen la angina inestable y el infarto de miocardio dentro de los síndromes coronarios agudos, ya que suelen compartir una fisiopatología común³⁰.

Diversos estudios epidemiológicos han demostrado una asociación entre los genotipos Q191R y M54L de la PON1 y la incidencia de CIC. El reporte de Ruiz et al. fue el primero en la serie de estudios que relacionan el polimorfismo PON1-192 con CIC. En este sentido el alelo R fue asociado positivamente con la presencia de CIC³⁶. Otros estudios han demostrado una frecuencia mayor del alelo R en pacientes con CIC, sugiriendo que este alelo es un factor de riesgo independiente de CIC^{7, 32, 37}. En estos estudios sólo se hace énfasis a CIC y no a otro padecimiento

Por otra parte se ha puesto de manifiesto que la PON1 se encuentra disminuida a niveles del 50% en pacientes con infarto agudo al miocardio (IAM) comparados con sujetos control^{33, 34}. El polimorfismo puede afectar la concentración de la proteína; al respecto se ha demostrado que el polimorfismo PON1-M54L se asocia con la modulación de la concentración sérica de la proteína dando el alelo 54M a niveles mayores comparados con el alelo 54L^{35, 36}. Ha surgido una controversia en donde se señala al polimorfismo PON1-Q191R como modulador o no de la concentración sérica de la proteína. Se tienen reportes donde el alelo 191Q presenta mayores niveles de proteína que el alelo 191R de manera independiente al fenotipo M54L^{6, 37}. De esta manera ha surgido la hipótesis que sujetos con la interacción de los alelos 191R-54L tienen un alto riesgo a desarrollar CIC³⁵.

Estudios realizados con sujetos diabéticos con y sin CIC demostraron una mayor frecuencia fenotípica del alelo 54L con CIC. El polimorfismo 54L fue asociado de manera independiente con la presencia de CIC en esta población. Además se observa que el PON1-M54L se asocia con la modulación de la concentración sérica de la enzima; el alelo 191R fue asociado como factor de riesgo a CIC en población con diabetes mellitus^{35, 38}.

Otros estudios no han logrado poner de manifiesto una relación entre el fenotipo PON1 y la incidencia de aterosclerosis. Sin embargo, algunos de estos estudios sí demuestran que la actividad arilesterasa de la PON1 se encuentra disminuida en sujetos con CIC, sin existir diferencias genotípicas con los sujetos controles³⁹. Por lo anterior se ha formulado la hipótesis de que el riesgo desarrollar CIC está asociado con actividades bajas de arilesterasa de la PON1 independientemente del genotipo en 191 y 54.

Estudios realizados con pacientes diabéticos muestran una mayor frecuencia fenotípica del alelo 191R en sujetos con IAM comparado con sujetos controles sin diabetes mellitus.

Por lo tanto, existe una interacción entre la aloenzima PON1-191 R y la diabetes mellitus que incrementan el riesgo a IAM⁴⁰. Con base en estos estudios que demuestran una mayor incidencia del genotipo 191R en pacientes con diabetes mellitus, se postula que el genotipo R es un factor predisponente para desarrollar aterosclerosis en esta población²⁷. No obstante, los estudios no asocian al polimorfismo de la PON1 con CIC como los estudios realizados por Ombres⁴¹ y Antikainen⁴² donde no se presenta la asociación del polimorfismo PON1-Q191R en pacientes diabéticos y con IAM.

A pesar de que la evidencia apunta hacia un papel anti-aterogénico de la PON1, la correlación PON1 con el C-HDL plasmático no es consistente en todos los estudios. La expresión de la PON1 no se incrementa en paralelo con el incremento de las HDL en pacientes tratados con fibratos⁴³. Por otra parte, la dieta alta en colesterol induce una disminución en la expresión y la actividad de la enzima independientemente del nivel de C-HDL^{44,45}. Todos estos resultados indican que la actividad de la PON1 no está sujeta únicamente a la regulación por el nivel de las HDL plasmáticos.

Algunas líneas indican las modificaciones en las células arteriales como consecuencia del envejecimiento y el incremento a la susceptibilidad al estrés oxidativo en el espacio subendotelial puede acelerar severamente el proceso de la aterosclerosis en sujetos de edad avanzada²⁹. Al respecto, se ha determinado que la actividad PON1 y el polimorfismo PON1-Q191R influyen en el riesgo de IAM en sujetos sanos estratificados en distribución de terciles de edad. Se ha observado que los niveles de la actividad PON1 y la correlación negativa con la edad se presentan solamente en pacientes y que la magnitud de esta asociación negativa es alta en pacientes con IAM donde prevalece el genotipo R. El efecto del genotipo y la edad sobre el riesgo a IAM se debe fundamentalmente a la relación gen-medio ambiente⁴⁶.

Las diversas explicaciones posibles de las discrepancias en los estudios son; primero, la genética heterogénea de las poblaciones; segundo, el sesgo de selección de los pacientes; tercero, el polimorfismo PON1-191 refleja fundamentalmente una mutación desconocida responsable de riesgo cardiovascular⁷.

2.5.-Paraoxonasa y oxidación de lipoproteínas

Estudios en humanos y animales sostienen fuertemente la hipótesis que la modificación de LDLs desempeña una función crucial en la patogénesis de la aterosclerosis¹. El mecanismo preventivo de la oxidación de las LDL se manifiesta como antiaterogénico.

En este contexto, se ha sugerido que la asociación HDL-PON1 es una importante barrera frente a peróxidos lipídicos originados por la LDL oxidadas². In vivo, puede PON1 actuar directamente sobre los peróxidos lipídicos o, más probablemente, los peróxidos lipídicos son transferidos primeramente a HDL y son transformados a especies no reactivas por PON1^{3, 47}.

La peroxidación lipídica ha captado mucha atención recientemente porque es posible que contribuya a la aparición de varias patologías. Por deterioro oxidativo los ácidos grasos poli-insaturados (AGPI) son convertidos a hidroperóxidos lipídicos. Los oxidantes pueden reaccionar con AGPI en membranas celulares, formando 2 o más uniones carbón-carbón insaturado (C=C) tales como las especies reactivas del oxígeno (ROS). El proceso involucra tres etapas: iniciación, propagación y terminación (figura 2.5.1)⁴⁸.

La iniciación ocurre cuando una especie radical con carácter oxidativo llamado radical libre (especie química que contiene uno o más electrones desaparejos, es decir un electrón que ocupa un solo orbital molecular o atómico), remueve hidrógenos alifáticos de AGPI. En la segunda etapa el radical peroxil lipídico atrae un átomo de hidrógeno alifático de otra molécula lipídica como un AGPI adyacente, resultando en hidroperóxido lipídico (LOOH) y un segundo radical lipídico (L[•]). Este segundo radical lipídico puede proceder a través de la misma reacción como el primero, generando hidroperóxidos lipídicos adicionales. El radical LOO[•] esta apto para sustraer átomos de hidrógeno de otra molécula como un AGPI adyacente. La terminación puede ser el resultado de cualquier reacción con otro radical, proteína o compuestos, formando un producto estable. El hidroperóxido producido puede sufrir diferentes reacciones que terminan el proceso de peroxidación lipídica. Ellos pueden estar reducidos hacia ácidos grasos hidroxil o adicional ciclización hacia productos endoperóxidos cíclicos⁴⁹. La formación de estos productos finales constituye la etapa de terminación de la peroxidación lipídica. Sin embargo, los AGPI pueden tener un número de enlaces C-H susceptibles al ataque de radicales libres, diversos productos finales pueden ser generados de cada AGPI durante la peroxidación⁵⁰.

La PON1 purificada puede prevenir efectos pro-aterosclerosos de LDL oxidadas cuando son incubadas en células del sistema vascular⁴⁰. Una de las más convincentes evidencias producidas por la función antioxidante de la PON1 proviene de la falta de

protección de la fracción HDL obtenida en ratones Knock-out PON1 comparada frente a HDL de ratones tipo silvestre⁵¹.

Otra evidencia del papel antiaterogénico de la PON1 se obtuvo de estudios con ratones modificados genéticamente, demostrando que la supresión del gen PON1 en estos ratones exacerba la susceptibilidad a la aterosclerosis inducida por una dieta rica en colesterol⁵¹.

A la luz de los estudios epidemiológicos y con animales genéticamente modificados, se han hecho esfuerzos importantes para identificar las bases moleculares que explican la relación de fenotipo y la actividad PON1 con el desarrollo de la placa aterosclerosa. A la actividad catalítica de conversión de lipoperoxidos por los hidróxidos correspondientes, se le ha denominado actividad lipoperoxidasa⁵². Así, la cascada oxidativa de los lípidos de las LDL, y en consecuencia la progresión de la placa ateromatosa, puede ser interrumpida por la acción de lipoperoxidasa de la PON1 (figura 2.5.2)⁵⁷.

Claramente hay una obvia necesidad de conocer si hay afectos ambientales semejantes de dietas, actividad física o factores terapéuticos que pueden influir en la actividad o de la concentración de la proteína PON1⁵¹.

Algunos estudios muestran que la aloenzima 191R es más lábil y se inactiva más rápidamente que la 191Q frente a un estrés oxidativo in vivo. Así, los pacientes portadores del genotipo 191R expresan una proteína más sensible a la presencia de sustancias oxidantes que en consecuencia sería menos efectiva para evitar la cascada oxidativa de las LDL que la aloenzima 191Q^{29,53}. Se ha observado que a una mayor concentración de PON1 se tiene menores niveles de oxidación de LDL⁵³.

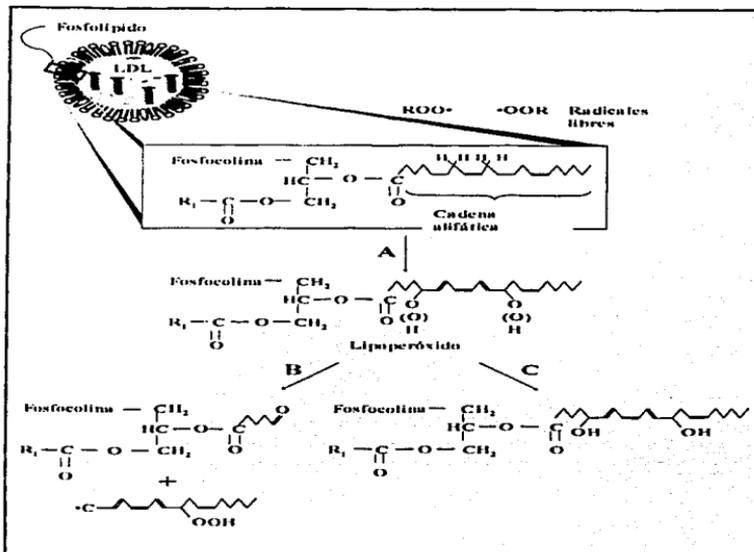


Figura 2.5.2. Actividad de lipoperóxido-hidrolasa de la PON1. A) La interacción de los radicales libres con las cadenas alifáticas de los fosfolípidos de las LDL das origen a lipoperóxidos, que son sustancias ligeramente oxidantes. B) La escisión de los lipoperóxidos p producen compuestos fuertemente oxidantes que alteran la e estructura de las LDL. C) La paraoxonasa, por medio de su actividad lipoperóxido-hidrolasa, cataliza la eliminación de los lipoperóxidos, generando compuestos que son inactivos en la cascada oxidativa de las LDL²³.

La variación de la actividad de la PON1 con respecto al proceso oxidativo LDL a revelado que la PON1-191Q es más estable comparada con PON1-191R⁵³.

La actividad ARE de 191Q se reduce por solamente 28% y el fenotipo 191R presenta una disminución cerca del 55% de su actividad durante la incubación de 4 horas dando como conclusión que la aloenzima 191 R se inactiva en medio oxidativo al paso del tiempo⁵³. Por lo que el fenotipo 191 representaría un factor de riesgo a CIC en asociación a un aumento de estrés oxidativo⁵³.

Se ha puesto de manifiesto en la población mexicana tiene una predisposición genética de presentar varias formas de dislipidemias, así como de desarrollar enfermedades cardiovasculares; esto se ha atribuido a hábitos y estilos de vida como son: consumos altos de calorías, tabaquismo, consumo de alcohol y sedentarismo⁵

Como se ha mencionado previamente, la PON1 juega un papel importante en el riesgo a desarrollar CIC; esto se puede deber debido al fenotipo presentado y/o a los niveles de enzima circulante, aunque se encuentra en controversia esta aseveración dependiendo el tipo de población estudiada. En este sentido, es importante enfatizar que la población mexicana presenta niveles de C-HDL notablemente más bajos que otros grupos étnicos lo que representa un riesgo a desarrollar CIC⁵⁴.

Al existir la influencia del C-HDL con la PON1 y estas a su vez tienen una relación con el riesgo a desarrollar CIC, nos planteamos investigar la posible relación entre la actividad de la PON1, su polimorfismo Q191R y el desarrollo de presentar cardiopatía en mexicanos.

Capítulo 3.

Hipótesis y objetivos.

Hipótesis.

Los sujetos con CIC presentarán una frecuencia del polimorfismo 191R mayor y una actividad arilesterasa menor en comparación con un grupo de sujetos sin diagnóstico de CIC. Existirá además una asociación entre los niveles de C-HDL y la actividad ARE de la PON1.

Objetivos.

General.

- Estimar el fenotipo PON1 por el cociente PON-NaCl/ARE, la masa de la PON1 por la actividad ARE y sus posibles asociaciones con el perfil lipídico, en dos grupos de sujetos, el primero con diagnóstico de CIC y el segundo sin diagnóstico de la enfermedad.

Particulares

- Realizar el perfil de lípidos de los sujetos de estudio
- Determinar las actividades PON, PON NaCl y ARE en los sujetos de estudio.
- Realizar los estudios de correlación.
- Observar la influencia de la edad con los niveles de la enzima PON1 en los grupos de estudio
- Describir la frecuencia de los fenotipos de la PON1 y su relación con la CIC en la población estudiada.

Capítulo 4. Metodología

Material

A. Grupos de estudio

Se estudiaron a 111 sujetos, agrupados en dos categorías, sujetos sin cardiopatía isquémica coronaria (CIC-) y sujetos con cardiopatía isquémica coronaria (CIC+). Estos sujetos acudieron a distintos departamentos del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez".

En el momento de la adquisición se les realizó una historia clínica en la cual se incluyen las características antropométricas. Los criterios de selección que deben reunir los sujetos para cada uno de los grupos en estudio, se mencionan a continuación.

1. Sujetos sin cardiopatía isquémica coronaria (CIC-).

Se seleccionaron 61 sujetos donadores del Banco de sangre de este Hospital, clínicamente sanos con edades comprendidas entre 20 y 60 años, sin padecimientos crónicos, sin antecedentes clínicos, ni familiares con enfermedad aterosclerosa coronaria (EAC). Sin antecedentes de diabetes, normotensos, sin enfermedades hepáticas previas, sin haber recibido algún tipo de vacuna en los últimos seis meses y sin estar en tratamiento médico de ningún tipo.

2. Sujetos con cardiopatía isquémica coronaria (CIC+).

Se seleccionaron 55 sujetos aleatoriamente, que participaron en el programa de educación preventiva que realizó el departamento de Endocrinología. Los sujetos que se integraron a este programa han sufrido al menos un infarto agudo de miocardio por isquemia aterosclerosa coronaria.

B. Recolección de muestras.

Las muestras de sangre de todos los sujetos en estudio, se recolectaron en dos tubos de vidrio, el primero con Na₂ EDTA (1.5 mg/mL) y un segundo para recolección de suero después de que los sujetos cumplieran un ayuno no menor de 12 h. Inmediatamente, las muestras se centrifugaron a 4°C, 15 min a 3500 rpm.

Posteriormente se hicieron alícuotas del suero y plasma que se refrigeraron a -70°C . Éstas se utilizaron para la determinación de la actividad de PON1 y del perfil de lípidos.

C. Análisis de laboratorio.

Se llevó a cabo la determinación de colesterol total, colesterol-HDL y triglicéridos, mediante métodos enzimáticos-colorimétricos comerciales y automatizados. El C-HDL fue determinado en el sobrenadante después de precipitar las apo B con una solución de sulfato de dextrana/magnesio (Ciba-Coming). El colesterol LDL fue calculado mediante la ecuación de Friedewald:

$$\text{C-LDL} = (\text{C-Total} - \text{C-HDL} - (\text{Tg}/5)).$$

Determinación de las actividades de la PON1.

Determinación de la actividad ARE.

La actividad a arilesterasa fue determinada usando fenilacetato por el procedimiento de Zeller y modificado por Kitchen et al. El rango inicial de la hidrólisis fue determinada espectrofotométricamente a 270 nm. Se utilizaron 0.01 mL de muestra en dilución 1:5 en H_2O . La mezcla de reacción incluye 1 mmol/L de fenilacetato y 0.9 mM CaCl_2 en 20 mM Tris-HCl, pH 8.0 a 25°C . La cinética de la reacción fue medida en un rango de 3 minutos. La hidrólisis no enzimática de fenilacetato fue sustraído del total del rango de la hidrólisis. El $E_{270\text{ nm}}$ de la reacción es de $1.310 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Una unidad de actividad a arilesterasa equivale a 1 mmol de fenilacetato hidrolizado por min. La actividad específica a arilesterasa es expresada como unidades por mL de suero.

Determinación de la actividad paraoxonasa basal y la actividad Paraoxonasa-NaCl 1.0 M. La actividad paraoxonasa fue realizada con y sin estimulación de NaCl 1.0M (actividad basal y actividad estimulada por sal). El rango de hidrólisis del paraoxón fue medida por la liberación de p-nitrofenol a 412 nm a 25°C . El buffer para la actividad paraoxonasa estimulada con NaCl 1.0 M contiene el equivalente al de la basal + la adición de NaCl 1.0 M. Se utilizó 0.020 mL de muestra en dilución 1:2 en serina 10^{-8}M . La mezcla de reacción basal incluye 1.0 mM paraoxón, 1.0mM CaCl_2 , en buffer de glicina-NaOH 50 mM, pH 10.0 a 25°C . La mezcla de reacción con estimulación de NaCl incluye 1.0 mM paraoxón, 1.0mM CaCl_2 , en buffer de glicina-NaOH 50 mM, NaCl 1.0 M, pH 10.0 a 25°C . La cinética de la reacción fue medida en un rango de 3 minutos. Una unidad de actividad

paraoxonasa produce 1 nmol de p-nitrofenol por min y la actividad específica se expresa en unidades por mL de suero. El $E_{412, nm}$ de la reacción es $18\ 290\ M^{-1}\ cm^{-1}$.

Análisis estadístico.

La comparación entre grupos de las variables continuas se realizó por medio de una prueba t de Student de dos colas asumiendo una varianza diferente. Cuando los valores se ven afectados por otras variables (confusoras), se utilizó un método de ANCOVA para la comparación entre grupos. Para la comparación de las variables nominales entre grupos se aplicó la prueba Chi cuadrada para valores independientes. Los análisis de correlación entre variables continuas y de distribución normal se realizó por medio de la prueba de Pearson.

Capítulo 5
Resultados

Comparación del perfil lipídico, edad, peso e IMC en la población de estudio.

En la tabla 5.1 se presentan las características de edad, peso e índice de masa corporal (IMC) de los sujetos sin diagnóstico de CIC (CIC-), y con diagnóstico de la enfermedad (CIC+). Observamos que no existen diferencias entre el peso y el IMC entre ambos grupos. Sin embargo, la edad promedio de los sujetos CIC+ es mayor que la de los CIC- ($p < 0.001$). Debido a que la edad tiene una influencia sobre el perfil lipídico, los análisis estadísticos subsiguientes se corrigieron por este parámetro (ANCOVA).

	Sujetos CIC- Media(DS)	Sujetos CIC+ Media(DS)
n	61	55
Edad (años)	36.5 ± 7.1	54.4 ± 7.8*
Peso (Kg)	76.4 ± 10.9	73.7 ± 12.0
IMC	27.5 ± 3.1	27.6 ± 3.6

*Prueba t, $p < 0.001$

Tabla 5.1.- Características de los sujetos que conforman los grupos de estudios. Ambos grupos muestran diferencia en la edad que presentan, por lo que se realiza la corrección de este parámetro.

Los resultados del perfil lipídico corregido por edad, se presentan en la tabla 5.2. Se observa que no existe diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos en el colesterol total. No obstante, es claro que la distribución de colesterol entre las diferentes lipoproteínas varía entre ambos grupos. En efecto, los sujetos del grupo CIC+ presentan cifras de C-LDL y C-VLDL 36 y 38% mayores respectivamente, y una disminución del 26% en el C-HDL con respecto a los sujetos CIC-. Los sujetos del grupo CIC+ presentan además un nivel de triglicéridos plasmáticos 38% mayor en comparación con el grupo CIC-.

	Sujetos CIC -	Sujetos CIC +
n	61	55
	Media(DS)	Media(DS)
C-HDL (mg/dL)	50.7 +/- 8.9	37.5 +/- 11.4**
C-Total (mg/dL)	169.9 +/- 41.1	191.0 +/- 33.7
C-LDL (mg/dL)	89.6 +/- 38.0	122.1 +/- 30.5*
C-VLDL (mg/dL)	30.3 +/- 15.4	41.9 +/- 20.4*
Triglicéridos (mg/dL)	151.3 +/- 76.8	209.3 +/- 101.9*

Tabla 5.2.- Características lipídicas de los sujetos de estudio ajustados por edad. La diferencia presentada entre los grupos de estudio radica en la distribución del perfil lipídico. Modelo ajustado por la covariable edad. ANCOVA, *p <0.05; **p <0.001.

Comparación de las actividades PON1 en los grupos de estudio.

Debido a la diferencia de edad entre los grupos de estudio, para poder llevar a cabo la comparación de las actividades PON y ARE entre ellos, se corrigieron los datos por este parámetro. Los resultados se presentan en la Tabla 5.3. La actividad ARE del grupo CIC- es aproximadamente 1.7 veces mayor que la correspondiente al grupo CIC+. Este resultado sugiere que la actividad de la PON1 es menor en los sujetos cardiopatas.

		Sujetos CIC-	Sujetos CIC+
n		61	55
		Media(DS)	Media(DS)
Actividad PON (nmol min ⁻¹ mL ⁻¹)	- NaCl	340.4 +/- 23.1	238.2 +/- 25.6 *
	+ 1.0M NaCl	814.7 +/- 71.6	472.7 +/- 79.0 *
Actividad ARE (μmol min ⁻¹ mL ⁻¹)		243.0 +/- 11.8	90.8 +/- 13.0 **
Porcentaje de estimulación		160.9 +/- 22.8	69.3 +/- 25.2 *

Tabla 5.3.- Características de la PON1 de los sujetos de estudio agrupados por diagnóstico de CIC encontradas ajustadas por edad. La presencia de la patología va acompañada de menores niveles de la PON1, al comparar los grupos de estudio. *p <0.05; **p <0.001.

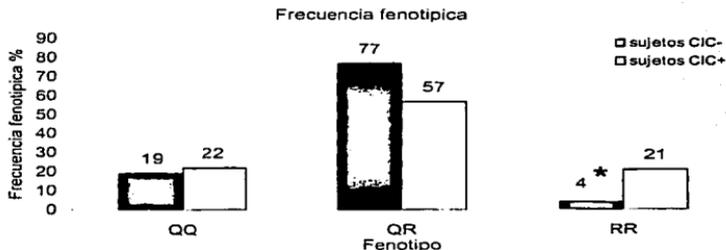
En efecto, la actividad PON1 en los sujetos CIC- es aproximadamente 40% menor con respecto al grupo control (Tabla 5.3) cuando utilizamos paraoxón como sustrato. Esta

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

diferencia alcanza el 63% cuando se utiliza fenil acetato como sustrato. En este mismo sentido, cuando se estimula la actividad PON con NaCl, ésta es 72% mayor en los sujetos CIC- respecto al grupo CIC+. Es importante enfatizar que la diferencia de actividades PON es más marcada cuando se estimula con NaCl (72% mayor) que cuando se determina en ausencia de altas concentraciones de sal (40% mayor). Esta diferencia y la dependencia de la actividad PON del fenotipo Q191R, sugieren que existe una disparidad de la distribución fenotípica entre ambos grupos. Para investigar esta posibilidad, en nuestros grupos de estudio, estimamos el fenotipo de la PON1 a través del cociente de actividades PON-NaCl/ARE, de acuerdo a la clasificación de Adkins et al⁸, según se detalla a continuación.

Distribución fenotípica de la PON1

En cuanto al fenotipo, el QR es el más frecuente en ambos grupos. Sin embargo, existen diferencias importantes en la distribución de frecuencias. En efecto, la mayor incidencia del alelo R en la población de cardiopatas, se asocia con una frecuencia del fenotipo RR 5 veces mayor en comparación con el grupo CIC-, en detrimento de la frecuencia del fenotipo QR (gráfica 5.4). Estos resultados sugieren fuertemente que el fenotipo RR se asocia con el desarrollo de enfermedad aterosclerosa coronaria.



Gráfica 5.4-Frecuencia fenotípica de sujetos con o sin diagnóstico de cardiopatía. La presencia del fenotipo RR en mayor proporción, sugiere una asociación del la patología con dicho fenotipo (fenotipo sugerido a partir de las actividades de la PON1). * Chi cuadrada, $p < 0.005$ al comparar ambos grupos.

Comparación del perfil lipídico en función del fenotipo.

La relación fenotipo PON1 RR e isquemia coronaria, puede ser de tipo causal como se ha sugerido por algunos investigadores pero no se puede descartar la posibilidad de una relación casual. En este último caso, la presencia de la enfermedad podría estar vinculada a la presencia de dislipidemias, independientemente del fenotipo RR.

Nuestros resultados muestran que el polimorfismo sugerido de la PON1 Q191R es independiente del perfil de lípidos, debido a que no existen diferencias en los niveles plasmáticos a sociadas fenotipo (tabla 5.5). El mismo resultado se observa cuando se analizaron por separado los grupos control y de cardiópatas (resultados no mostrados).

Característica	Fenotipo PON1		
	QQ Media(DS)	QR Media(DS)	RR Media(DS)
n	24	77	15
Frecuencia (%)	20.7	66.4	12.9
Edad	46.2 ± 10.9	43.7 ± 11.8	49.8 ± 11.2
C-HDL (mg/dL)	42.6 ± 12.7	45.7 ± 12.2	41.14 ± 9.6
C-TOTAL (mg/dL)	171.4 ± 36.7	181.3 ± 39.8	187.4 ± 41.1
C-LDL (mg/dL)	95.4 ± 29.6	105.1 ± 41.4	117.8 ± 36.1
C-VLDL (mg/dL)	38.1 ± 25.6	35.6 ± 16.4	34.0 ± 16.4
Triglicéridos (mg/dL)	190.5 ± 128.1	178.1 ± 82.3	169.9 ± 81.9

Tabla 5.5. - Perfil lipídico en función del fenotipo de PON1 en ambos grupos. El fenotipo de la PON1 no influye en el perfil lipídico, al analizar a la población en conjunto; se observa que la población de este estudio tiene una mayor prevalencia por el fenotipo QR.

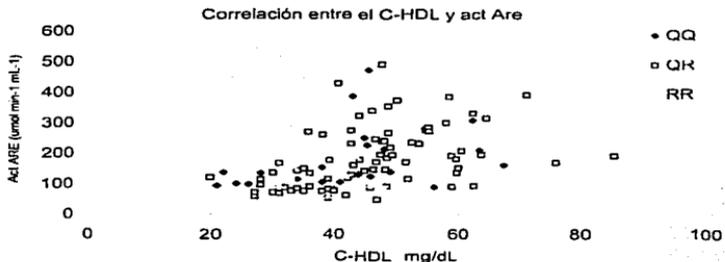
La paraoxonasa es una enzima que es transportada en plasma por medio de las HDL⁹. Además los niveles de C-HDL tienen una fuerte correlación con otros lípidos plasmáticos, en particular los triglicéridos. Para explorar la posibilidad de que los niveles de HDL y los otros lípidos determinaran la actividad paraoxonasa en nuestros sujetos de estudio, realizamos un análisis de correlación simple incluyelos a todos en un solo grupo. Estos resultados muestran que, efectivamente, la actividad de la PON1, medida como PON o

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

ARE, correlaciona con los niveles plasmáticos del C-HDL (tabla 5.6) Sin embargo, cuando analizamos los grupos de cardiopatas y sujetos sanos por separado, la correlación entre las HDL y la PON1 no se mantiene (resultados no mostrados). De igual manera, cuando separamos el total de nuestros sujetos por fenotipo, no encontramos correlación entre la actividad ARE y el nivel de C-HDL (gráfica 5.7)

Característica		C-total	C-HDL	C-LDL	C-VLDL	TRIGLICÉRIDOS
PON	r		0.266			
	p	Ns	< 0.01	Ns	Ns	Ns
PON NaCl	r		0.301			
	p	Ns	< 0.01	Ns	Ns	Ns
Porcentaje de estimulación	r					
	p	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
ARE	r	-0.185	0.424	-0.238	-0.248	-0.248
	p	0.047	< 0.01	0.010	< 0.01	< 0.01
Fenotipo	r					
	p	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns

Tabla 5.6.- Estudio de correlación del perfil lipídico con las actividades de la PON1 y su fenotipo donde muestra la influencia de los lípidos con estas, cabe destacar que este estudio se realizó con la población total de sujetos de estudios.



Gráfica 5.7. Estudio de correlación entre la actividad ARE frente al C-HDL. Observamos que al dividir la población por fenotipo la correlación de la actividad ARE con el C-HDL no se presenta, debido a la influencia de dos poblaciones que muestran diferencia entre los parámetros anteriores.

Para profundizar en la posibilidad de una relación entre las HDL y la PON1 en nuestros sujetos de estudio, dividimos al total de la población por terciles de C-HDL (tabla 5.8). Observamos que la actividad ARE (representativo de la masa activa circulante de la PON1) es mayor en los terciles 2 y 3 respecto al tercil 1, sugiriendo una asociación de la PON1 con las HDL. Cabe destacar que los sujetos cardiopatas presentaron niveles de C-HDL menores que los sujetos sanos (tabla 5.2) y en consecuencia, el tercil 1 de C-HDL agrupa preferentemente a los primeros y el último tercil, a los sujetos sin diagnóstico de la enfermedad. Se observa además que en el primer tercil el promedio de edad de los sujetos es mayor que en el segundo y el tercero (tabla 5.8), sugiriendo que la edad puede determinar la actividad de la paraoxonasa. Esta puede ser la razón de las diferencias observadas de la actividad PON1 entre los terciles de C-HDL. Por todo lo anterior, analizamos el comportamiento de la PON1 por terciles de C-HDL en los grupos CIC- y CIC+ de manera individual (tablas 5.9 y 5.10).

Característica		Terciles C-HDL		
		1	2	3
		Media(DS)	Media(DS)	Media(DS)
n		40	37	39
Edad		52.5 ± 9.9	43.7 ± 11.6**	38.6 ± 9.1**
Actividad paraoxonasa (nmol min ⁻¹ mL ⁻¹)	-NaCl	261.3 ± 25.1	294.8 ± 23.8	322.8 ± 24.2
	+ 1M NaCl	526.2 ± 77.2	662.8 ± 73.3	778.7 ± 74.6 *
Actividad ARE (µmol min ⁻¹ mL ⁻¹)		130.6 ± 14.5	192.5 ± 13.8 *	195.3 ± 14.0 *

Tabla 5.8- Características encontradas de la PON1 en función de los terciles C-HDL en el total de la población. p <0.05*; p <0.001 ** vs. tercil 1. Modelo ajustado por la covariable edad.

		Terciles C-HDL		
		1	2	3
		Media(DS)	Media(DS)	Media(DS)
n		20	20	21
Edad		39.9 ± 9.0	35.6 ± 6.2	36.0 ± 5.8
Actividad paraoxonasa (nmol min ⁻¹ mL ⁻¹)	-NaCl	325.9 ± 200.4	359.0 ± 127.6	353.8 ± 154.8
	+ 1M NaCl	767.6 ± 511.3	818.2 ± 420.3	864.1 ± 509.4
Actividad ARE (µmol min ⁻¹ mL ⁻¹)		242.7 ± 103.8	222.9 ± 95.2	242.8 ± 79.1
C-HDL (mg/dL)		41.7 ± 3.8	48.8 ± 1.6*	60.8 ± 5.7*

Tabla 5.9.- Grupo CIC- dividido en terciles de C-HDL. En el grupo no se presenta una asociación entre los niveles de C-HDL con las actividades de la PON1, dando auge a la dirección de que el nivel de C-HDL no influye de manera significativa en la cantidad de enzima circulante en sujetos CIC-. p <0.05*.

		Terciles C-HDL		
		1	2	3
		Media(DS)	Media(DS)	Media(DS)
n		18	18	19
Edad		53.0 ± 9.14	55.2 ± 6.9	55.0 ± 7.6
Actividad paraoxonasa (nmol min ⁻¹ mL ⁻¹)	-NaCl	234.5 ± 93.5	248.9 ± 124.4	217.3 ± 101.9
	+ 1M NaCl	414.3 ± 307.2	590.8 ± 486.7	450.7 ± 287.8
Actividad ARE (μmol min ⁻¹ mL ⁻¹)		96.4 ± 35.7	109.3 ± 32.6	92.1 ± 29.6
C-HDL (mg/dL)		27.5 ± 3.6	35.8 ± 2.5*	49.6 ± 10.8*

Tabla 5.10.- Grupo CIC+ dividido en terciles de C-HDL. Los resultados muestran la ausencia de asociación del nivel de C-HDL con las actividades de la PON1. *p <0.05 vs. tercil 1.

Nuestros resultados muestran que al separar por terciles de C-HDL, tanto en los sujetos sanos como en los cardiopatas, no existen diferencias en actividad PON1, independientemente del sustrato utilizado para determinarla.

Efecto de la edad sobre la actividad de la paraoxonasa

Como se mencionó anteriormente, nuestros grupos de sujetos presentaron una diferencia estadísticamente significativa en actividad PON1 medida como ARE o como PON. Los análisis estadísticos realizados, fueron corregidos por la edad, que es diferente en promedio entre los sujetos sanos y los cardiopatas. Sin embargo, falta demostrar cuál puede ser el efecto de la edad sobre la actividad PON. Para explorar lo anterior, subdividimos por terciles de edad a nuestros grupos de manera independiente y comparamos la actividad promedio en cada uno de los subgrupos (tabla 5.11 y 5.12).

		Terciles edad		
		1	2	3
		Media(DS)	Media(DS)	Media(DS)
n		20	21	20
Edad (años)		29.2 ± 1.3	35.3 ± 2.3	45.0 ± 5.3
C-HDL (mg/dL)		49.8 ± 11.0	51.3 ± 7.6	50.3 ± 8.8
Actividad paraoxonasa (nmol min ⁻¹ mL ⁻¹)	-NaCl	355.0 ± 127.4	351.3 ± 166.3	332.0 ± 189.4
	+ 1M NaCl	834.1 ± 436.0	906.4 ± 541.4	689.1 ± 416.2
Actividad ARE (µmol min ⁻¹ mL ⁻¹)		223.9 ± 91.0	247.8 ± 91.3	233.6 ± 96.8

Tabla 5.11.- Influencia de la edad con las actividades de la PON1 y el nivel de C-HDL en el grupo CIC-. Se demuestra que no presenta influencia la edad sobre las actividades de la PON1 en este grupo.

		Terciles edad		
		1	2	3
		Media(DS)	Media(DS)	Media(DS)
n		18	17	20
Edad		45.6 ± 5.3	54.5 ± 1.9	62.3 ± 2.6
C-HDL (mg/dL)		34.0 ± 7.7	43.3 ± 15.3	36.6 ± 8.8
Actividad paraoxonasa (nmol min ⁻¹ mL ⁻¹)	-NaCl	234.5 ± 93.5	248.9 ± 124.4	217.3 ± 101.9
	+ 1M NaCl	414.3 ± 307.2	590.8 ± 486.7	450.7 ± 287.8
Actividad ARE (µmol min ⁻¹ mL ⁻¹)		96.4 ± 35.7	109.3 ± 32.6	92.1 ± 29.6

Tabla 5.12. Influencia de la edad con las actividades de la PON1 y el nivel de C-HDL en el grupo CIC+. Se demuestra que no presenta influencia la edad sobre las actividades de la PON1 en este grupo.

La comparación de las actividades PON, PON NaCl y ARE entre los subgrupos formados por terciles de edad, no demuestra ninguna diferencia estadísticamente significativa, tanto para el grupo CIC- como para el grupo CIC+ (tablas 5.11, 5.12). Estos resultados analizados en su conjunto, sugieren que la actividad de la PON1 es independiente también de la edad.

Discusión de resultados

Varios estudios han puesto de manifiesto que la peroxidación lipídica juega un rol importante en la patogenia de la aterosclerosis^{1,4,7,48,51}. Asimismo está perfectamente establecido la correlación negativa que existe entre los niveles bajos del C-HDL o hipoalfalipoproteinemia y el riesgo de desarrollar enfermedad aterosclerosa coronaria. Además, la hipoalfalipoproteinemia es la dislipidemia más común en nuestra población⁵⁴. Sin embargo, estudios recientes marcan a la paraoxonasa y a su fenotipo como variantes adicionales en el riesgo de desarrollar CIC, ya que se cree que los factores metabólicos que alteran los valores de C-HDL, influyen en los niveles plasmáticos de la PON1.

En una primera evaluación, la selección de los sujetos del grupo CIC- fue muy estricta y se podría considerar a priori un buen grupo de comparación. Los resultados de este estudio demuestran que efectivamente los factores de riesgo como son C-LDL, C-VLDL y triglicéridos se encuentran elevados en los sujetos del grupo CIC+ a diferencias de los sujetos que no presentan la enfermedad. Así también existe un déficit en las concentraciones plasmáticas de C-HDL en los sujetos del grupo CIC+, otro factor de riesgo. Todas estas diferencias son estadísticamente significativas, por lo que nuestra población de sujetos CIC+ es representativa de su condición. No obstante, encontramos que nuestras poblaciones no están pareadas por edad y este es un factor determinante del nivel de lípidos plasmáticos. Por lo anterior, en los análisis estadísticos que realizamos se ajustó por la edad cada uno de los parámetros.

Hasta ahora el papel de la PON1 en la prevención de la aterogénesis continua siendo motivo de debate⁵². Esta enzima puede participar en disminuir el riesgo de desarrollar aterosclerosis por medio de la destrucción de moléculas pro-inflamatorias involucradas en la iniciación y progresión de la lesión arterial, debido a su actividad lipoperoxidasa que es la responsable de su papel antioxidante. Este concepto encuentra sustento en el hecho de que la fracción HDL obtenida de especies animales Knock-out PON1, es incapaz de prevenir la peroxidación de LDL y con ellos existe la progresión de la aterosclerosis⁵¹. Nuestros resultados muestran que la EAC se ve asociada a actividades bajas de la PON1 independiente del sustrato utilizado, paraoxón o fenilacetato. En efecto, cuando comparamos la actividad de la enzima en plasma entre nuestros grupos de estudio, observamos que los sujetos con diagnóstico de CIC presentan una actividad en promedio

menor que los sujetos clínicamente sanos. Esta diferencia es independiente del sustrato utilizado, indicando que la masa activa de la enzima en el plasma de los cardiopatas se encuentra abatida. Las disminuciones en la actividad de la cantidad de paraoxonasa activa en el grupo CIC- se podría atribuir a una incidencia mayor de diabéticos entre los cardiopatas, a la edad⁵⁵ y a un menor número de partículas HDL en circulación⁵⁶. La incidencia de diabetes en el grupo CIC+, si bien es más leve (resultados no mostrados), todos los diabéticos incluidos en el grupo tienen un control glucémico apropiado. Si consideramos que el estatus de diabetes afecta la actividad PON por glicación inespecífica de la enzima⁵⁶, bajo un control glucémico apropiado en nuestro grupo de estudio, podemos descartar a la frecuencia de diabetes como causa de las bajas actividades registradas entre los cardiopatas. Marie et al⁵⁵, sugiere que la edad puede ser un factor determinante en los niveles de actividad PON en plasma. Para explorar esta posibilidad, separamos por terciles de edad a nuestros grupos de estudio. Observamos que no hay un efecto aparente de este parámetro sobre la actividad de la enzima en ninguno de los dos. Por lo tanto, creemos que la baja actividad promedio de la PON en los CIC+ se asocia a un número menor de partículas HDL circulantes. En efecto, Deakin et al⁵⁵ han puesto manifiesto que existe una correlación entre el número de partículas HDL estimadas por el C-HDL en plasma y la actividad PON. Nuestros resultados muestran que esta correlación existe, solo cuando se analizan los dos grupos juntos, pero desaparece cuando se analizan por separado, sugiriendo que hay una segregación tanto de actividad como de niveles C-HDL como base de la correlación. Por lo tanto, decidimos analizar los grupos de manera independiente por terciles C-HDL y no observamos ninguna diferencia de actividad PON entre los diferentes terciles de cada uno de los grupos.

Cabe destacar que las HDL son un grupo de lipoproteínas muy heterogéneo en composición, estructura y actividad^{55,57}. En cuanto a la capacidad de las HDL para desorber la enzima de la membrana celular de las células productoras, solo aquellas partículas que tienen la tensión de superficie adecuada lo pueden hacer^{55,57}. En este sentido, el C-HDL no es indicativo del número de partículas que poseen dicha propiedad. Además, estudios recientes de nuestro laboratorio, demuestran que las partículas HDL pequeñas reclutan la reserva de paraoxonasa y la manifiestan como aumento de actividad en suero y las partículas de tamaño mediano son las que transportan la mayor parte de la enzima (Salazar R et al, resultados no publicados). Nuevamente, el C-HDL no es parámetro suficiente para estimar el número de partículas activas en cuanto al reclutamiento y transporte de paraoxonasa en plasma. Por último, la actividad PON en

suero no correlaciona de manera importante con la actividad PON asociada a las HDL, sugiriendo que existe una fracción de la enzima activa que no puede ser vectorizada al espacio subendotelial, y por lo tanto es una fracción que no posee propiedades antiaterogénicas (resultados no publicados). Por lo anterior, la falta de correlación entre los niveles de C-HDL y la actividad PON, no demuestra que no existe relación entre las lipoproteínas y la enzima, sino que, el C-HDL no es un parámetro apropiado para estimar la funcionalidad de las HDL⁵⁵.

La PON1 es una enzima polimórfica y sus aloenzimas presentan actividades de hidrólisis de paraoxón cuando existe una alta concentración de NaCl; con base en este hecho se realizó la clasificación por fenotipo. Observamos que fenotipo QR es el de mayor frecuencia en ambas poblaciones mientras que el RR es el que se presenta con menor frecuencia. Este último, es cinco veces más frecuente entre los cardiópatas con los respecto a los sujetos sanos. Por tanto, el fenotipo RR se puede considerar como un factor de riesgo de aterosclerosis. Es importante resaltar este hecho porque algunos estudios han mostrado discrepancias acerca de la asociación del fenotipo RR con el desarrollo de la patología mencionada. Se sabe que la aloenzima 191R es más susceptible a inactivarse en medio oxidativo que la aloenzima Q191 y esta puede ser la razón de una mayor predisposición de los individuos con fenotipo RR a la aterosclerosis.

Cabe destacar que la actividad paraoxonasa medida con paraoxón como sustrato no correlaciona con el riesgo a desarrollar aterosclerosis pese a estar directamente afectada por el fenotipo Q191R. La aseveración de que el fenotipo RR ofrece una menor protección frente a la oxidación de LDL se ha encontrado en estudios anteriores. Al agrupar por fenotipo a los individuos de estudio, de manera independiente, no se encontraron datos que sustenten una asociación del fenotipo de la PON1 y el nivel de C-HDL. En cuanto al perfil lipídico en función del fenotipo muestra que el polimorfismo Q191R de la PON1 es independiente del perfil lipídico debido a que no se presentaron diferencias en los niveles plasmáticos asociados al fenotipo. Este hecho se reporta cuando se analizaron de manera independiente los grupos CIC+ y CIC-.

Por lo tanto la influencia de los niveles de la PON1 medida por la actividad ARE constituye una estrecha relación con el desarrollo de la EAC. La edad, perfil lipídico y en particular el C-HDL, no mostraron asociación con los niveles de la PON1 circulante en este estudio.

Conclusiones

La actividad ARE o PON de la paraoxonasa es menor en los sujetos que presentaron Cardiopatía Isquémica Coronaria, sugiriendo que actividades bajas de la enzima son un factor de riesgo para desarrollar la enfermedad.

El fenotipo a través de las actividades de la PON1 muestra que es 5 veces más frecuente RR en sujetos con diagnóstico de CIC respecto a una población sin diagnóstico de la enfermedad. Por lo tanto, se sugiere que el fenotipo RR es un factor de riesgo de Cardiopatía Isquémica Coronaria en la población estudiada.

La edad y el C-HDL no se relacionan con la actividad paraoxonasa ni arilesterasa en suero.

Tabla de abreviaturas

AGL	ácidos grasos libres
ARE	actividad arilesterasa
CETP	proteína de transferencia de ésteres de colesterol
C-HDL	colesterol-HDL
CIC	cardiopatía isquémica coronaria
EAC	enfermedad aterosclerosa coronaria
HDL	lipoproteínas de alta densidad
IAM	infarto agudo al miocardio
IMC	índice de masa corporal
LCAT	Lecitina colesterol acilo transferasa
LDL	lipoproteínas de baja densidad
PLTP	proteína de transporte de fosfolípidos
PON	actividad paraoxonasa
PON1	paraoxonasa
PON NaCl	actividad paraoxonasa estimulada con NaCl
TCR	transporte reverso de colesterol
VLDL	lipoproteínas de muy baja densidad

Bibliografía

- 1.- GE Delgado. Metabolismo de lipoproteínas. Diagnostico (1999); 38: 23-48.
- 2.- R Murray, P Mayes, D Granner, V Rodwell. Bioquímica de Harper. Manual Moderno; (1992)5ª edición: 135-142, 207-263.
- 3.- O Pérez, G Luc, C Posadas. Concentraciones bajas de lipoproteínas de alta densidad (HDL) en plasma y enfermedad arterial coronaria. Arch Inst Cardiol Méx (2000)70: 312-321.
- 4.- M Mackness, B Mackness, P N Durrington, P W. Connelly , R A. Hegele. Paraoxonase : biochemistry, genetics and relations to plasma lipoproteins. Curr Opinon Lipidol (1996) 7: 69-76.
- 5.-S Adkins, K N Gan, M Mody. B N La Du. Molecular Basic 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.
- 6.- PN Durrington, B Mackness, MI Mackness. Paraoxonasa and Atherosclerosis. Arterioscler Thomb Vasc Biol (2001) 21: 473-480.
- 7.- M Aviram. Does paraoxonase play a role in susceptibility to cardiovascular disease? Mol Med Today (1999) 5: 381-386
- 8.-H M Eckerson, C M Wyte, B N La Du. The human serum paraoxonase/Arylesterase Polymorphism. Am J Hum Genet (1983) 35: 1126-1138.
- 9.- C Hassett, RJ Richter, R Humbert, C Chapline, JW Crebb, CJ Omiecinski, CE Furlong. Characterization of cDNA clones encoding rabbit and human serum paraoxonase the mature protein retains its signal sequence. Biochemystry (1991) 30: 10141-10149.
- 10.- MI Mackness. Possible medical significance of human serum paraoxonase. Enzymes Hydrolysing Organophosphorus Compounds (1989) 202-2013
- 11.- RC Sorenson, M Aviram, CL Bisgaier, S Billecke, C Hsu, B LaDu. Properties of the retained N-terminal hydrophobic leader sequence in human serum paraoxonasa/arylesterase. Chem Biol Interact (1999) 119-120: 243-249.
- 12.- RC Sorenson, SL Primo-Parmo, CL Kuo, S Adkins, O Lockridge, B LaDu. Reconsideration of the catalytic center and mechanism of mammalian paraoxonasa/arylesterase. Proc Natl Acad Sci USA (1995) 92: 7187-7191.
- 13.- D Josse, W Xie, F Renault, D Rochu, LM Schopfer, P Masson, O Lockridge. Identification of residues essential for human paraoxonase (PON1) arylesterase/organophosphatase activities. Biochemistry (1999) 38: 2816-2825.

- 14.-M Aviram, S Billecke, R Sorenson, C Bisgaier, R Newton, M Rosenblat, J Erogul, C Hsu, C Dunlop, B LaDu. Paraoxonase active site required for protection against LDL oxidation involves its free sulfhydryl group an dis different from that required for its arylesterase/paraoxonase activities. Arterioscler Thromb Vasc Biol (1998) 18: 1617-1624.
- 15.-M Aviram, M Rosenblat, C L Bisgaier, R S Newton, S L Primo-Parmo, B LaDu. Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. J Clin Invest (1998) 101: 1581-1590.
- 16.- JA Doorn, RC Sorenson, SS Billecke, C Hsu, B LaDu. Evidence that several conserved histidine residues are required for hydrolytic activity of human paraoxonase/arylesterase : Chem Biol Interact (1999)119-120: 235-241.
- 17.- D Josse, W Xie, P Masson, O Lockridge. Human serum paraoxonasa (PON1) identification of essential amino acid residues by group-selective labeling and site-directed mutagenesis. Chem Biol Interact (1999) 119-120:71-78.
- 18.- DI Draganov, PI Stetson, CE Watson, SS Billecke, B LaDu. Rabbit serum paraoxonase3 (BON3) is a high density lipoprotein-associated lactose and protects low density lipoprotein against oxidation. J Biol Chem (2000) 275: 33435-33442.
- 19.-Bert N, B LaDu. Is paraoxonasa-3 Another HDL-Associated protein protective Against Atherosclerosis? Arterioscler Thromb Vasc Biol (2001) 21: 467-468.
- 21.- B LaDu, H W Eckerson. The polymorphic paraoxonase/arylesterase isozymes of human serum. Federation Proceedings (1984) 43: 2338-2341.
- 20.- S Adkins, KN Gan, M Mody, B LaDu. Molecular basic for the polymorphic forms of human serum paraoxonase/arylesterase: glutamine or a arginine at position 191, for the respective A or B allozymes. Am J Hum Genet (1993) 52: 598-608.
- 22.-M Antikainen, S Murtomaki, M Sivanne, R Pahlman, E Tahvanainen, M Jauhiainen. The Gln-Arg191 polymorphism of the human Paraoxonase Gene (HUMPONA) is not associated with the risk of coronary artery disease in finns. J Clin Invest (1996) 98: 883-885.
- 23.- A Smole, HW Eckerson, KN Gan, N Hailat, B LaDu. Characteristics of the genetically determined allozymic forms of human serum paraoxonasa/arylesterase. Drug Metab Dispos (1991) 19: 107-112.
- 24.- B Mackness, MI Mackness, S Arrol, W Turkie, PN Durrington. Effect of the molecular polymorphisms of human paraoxonasa (PON1) on the rate of hydrolysis of paraoxon. Br J Pharmacol (1997) 112:265-268.

- 25.- HG Davies, RJ Richerter, M Kein, CA Broomfield, J Sowalla, CE Furlong. The effect of the human serum polymorphism is reversed with diazoxon, soman and sarin. Nat Genet (1998) 14:334-336.
- 26.- MI Mackness, S Arrol, B Mackness, PN Durrington. The alloenzymes of paraoxonasa determine the effectiveness of high-density lipoprotein in protecting low density lipoprotein against lipid-peroxidation. Lancet (1997) 349: 851-852.
- 27.- B Mackness, MI Mackness, S Arri, W Turkie, PN Durrington. Effect of human serum paraoxonasa 55 and 192 genetic polymorphisms on the protection by high density lipoprotein against low density lipoprotein oxidate modification. FEBS Lett (1998) 423: 57-60.
- 28.- J F Guadajara. Cardiología. Méndez Cervantes editores (1999) 649-669. México
- 29.- J E Fernández, J A Castillo. Atherosclerosis, colesterol y pared arterial: algunas reflexiones. Rev Cubana Invest Biomed (1999) 18(3); 169-175.
- 30.-DR Chávez, HJA Ramirez, GJM Casanova. La cardiopatía coronaria en México y su importancia clínica, epidemiológica y preventiva Arch Cardiol Mex (2003) 73(2): 105-114
- 31.- M Serrato, AJ Mariam. A variant of human paraoxonase/arylesterase (HUMPONA) gene is a risk factor for coronary artery disease. J Clin Invest (1995) 96: 3005-3008.
- 32.-T Z ama , M Murata,Y Matsubara , K Kawaro, N Aoki, H Yoshino, G Watanabe, K Ishikawa. A 192 Arg variant of the human paraoxonasa (HUMPONA) gene polymorphism is associated with an increased risk for coronary artery disease in the Japanese. Arterioscler Thromb Vasc Biol (1997) 17: 35565-3569.
- 33.-Mc Elveen J, Makness MI, Colley CM, Peard t, Warner s., Walker CH. Distribution of paraoxón hydrolytic activity in the serum of patients myocardial infaction. Clin Chem (1986) 32: 671-673.
- 34.- A Ayub, MI Mackness, S Arrol, M Mackness , J Patel, PN Durrington. Serum paraoxonase after myccardial infaction. Arterioscler Thromb Vasc Biol (1999)19: 330-335.
- 35.-B Garin, R W James, P Dussoix, H Blancxhe, P Passa, J Ruiz. Paraoxonase polymorphism Met-Leu is associated with modified serum concentrations of the enzyme. J. Clin Invest (1997)99: 62-66.
- 36.- R Humbert, D A Adier, C M Hassett. The molecular basic of the human serum paraoxonasa activity polymorphism. Nat Genet (1993) 3: 73-76.
- 37.- B Mackness, MI Mackness, PN Durrington, S Arrol, AE Evans. Paraoxonase activity in two healthy populations with differing rates of coronary heart disease. J Clin Invest. (2000) 30: 4-10.

- 38.- J Ruiz, H Blanche, R W James, M C Blatter, G Charpentier. The polymorphism (Gln-Arg192) of the high-density lipoprotein-bound enzyme paraoxonase is an independent cardiovascular risk factor in non-insulin dependent diabetic patients. Lancet (1995) 346: 869-872.
- 39.- B Mackness, G K Davies, W Turkie, E Lee, D H Roberts, E Hill, C Roberts. Paraoxonase Status in coronary heart disease. Are activity and concentration more important than genotype? Arterioscler Thromb Vasc Biol (2001) 21:1451.
- 40.- C Aubo, M Senti, J Marrugat, M Tomas, J Vila, J Sala, R Masia. Risk of myocardial infarction associated with Gln/Arg 192 polymorphism in human paraoxonase gene and diabetes mellitus. Eur Heart J (2000) 21: 33-38.
- 41.- D Ombres, G Panniteri, A Montali, A Candeloro, F Seccareccia, F Campagna, R Cannitini, PP Campa, G Ricci, M Arca. The Gln-Arg 192 Polymorphism of human paraoxonase gene is not associated with coronary artery disease in Italian patients. Arterioscler Thromb Biol (1998) 18: 1611-1616.
- 42.- M Antikainen, S Murtomaki, M Svanne, R Pahlman, E Tahvanainen, M Jauhainen, MH Frick, C Ehnholm. The Gln-Arg 191 polymorphism of the human paraoxonase gene (HUMPONA) is not associated with the risk of coronary heart disease in Finns. J Clin Invest (1996) 98: 883-885.
- 43.- PN Durrington, MI Mackness, D Bhatnagar, K Julier, H Prais, S Arrol, J Morgan, GN Wood. Effects of two different fibrin acid derivatives on lipoproteins, cholesteryl ester transfer, fibrinogen, plasminogen activator inhibitor and paraoxonase activity in type IIb Hyperlipoproteinaemia. Atherosclerosis (1998) 138: 217-225.
- 44.- DM Shih, L Gu, S Hama, YR Xia, M Navab, AM Fogelman, AJ Lusis. Genetic-dietary regulation of serum paraoxonase expression and its role in atherogenesis in a mouse model. J Clin Invest (1996) 97: 1630-1639.
- 45.- M Mackness, A Boullier, N Hennuyer, B Mackness, M Hall, A Tailleux, P Duriez, B Delfly, P Durrington, JC Fruchart, N Duverger, JM Caillaud, G Castro, A Boullier. Paraoxonase activity is reduced by a pro-atherosclerotic diet in rabbits. Biochem Biophys Res Commun (2000) 269: 232-236.
- 46.- C Bilato, Mt Row. Atherosclerosis and the vascular biology of aging. Aging (1996) 8: 221-234.
- 47.- J Koizumi, H Mabushi, R Takena. Deficiency of serum cholesterylester activity in patients with familiar hyperalphalipoproteinaemia. Arteriosclerosis (1985) 58: 175-186.

- 48.- J.M Glutteridge. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. J Clin Chemistry (1995)41:1819-1828.
- 49.- S Jain, M Thomas, GP Kumar, M Laloraya. Programmed lipid peroxidation of biomembranes generating kinked phospholipids permitting local molecular mobility: a peroxidative theory of fluidity management. Biochem Biophys Res Commun (1993)195:574-580.
- 50.- ME Begin. Effects of polyunsaturated fatty acids and of their oxidation products on cell survival. Chem Phys Lipids (1987) 45: 269-313.
- 51.- DM Shih, L Gu, YR Xia, M Navab, WF Li; S Hama, LW Castellani, CE Furlong, LG Costa; AM Fogelman, AJ Lusis. Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. Nature (1998) 394: 284-287.
- 52.-O Pérez, C Huesca. El papel antiaterogénico de la Paraoxonasa 1. REB2002 (2002) 21: 245-251.
- 53- M Aviram, S Billecke, R Sorenson, C Bisgaier, R Newton, M Rosenblat, J Eroglu, C Hsu, C Dunlop, B LaDu. Paraoxonase active site required for protection against LDL oxidation involves its free sulfhydryl group and is different from that required for its arylesterase/paraoxonasa activities: selective action of human paraoxonase allozymes Q and R. Arterioscler Thromb Vasc Biol (1998) 18: 1617-1624
- 54.- C A. Aguilar-Salinas, G Olaizb, V Vallesa. High prevalence of low HDL cholesterol concentrations and mixed hyperlipidemia in a Mexican nationwide survey. Journal of Lipid Research (2001) 42, 1298-1307.
- 55.- S Deakin, I Leviev, M Gomaschi, L Calabresi, G Franceschini. Enzymatically active paraoxonase-1 is located at the external membrane of producing cells and released by a high affinity, saturable, desorption mechanism. J Biol Chem (2002) 277: 4301-4308.
- 56.- CC Hedrick, SR Thorpe, CM Fu, J Yoo, SM Sim, H Wong, AL Peters. Glycation impairs High-density lipoprotein function. Diabetologia (2000) 43: 312-320.
- 57.-J R Nofer, B Kehrel, M Fobker, B Levkau, G Assmann, V Erckenstein. HDL and arteriosclerosis: Beyond reverse cholesterol transport. Atherosclerosis (2002)161: 1-16