



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

FACULTAD DE QUÍMICA

ESTUDIO DE LA CAPTACIÓN DE PARAOXONASA *in vivo* POR LAS  
LIPOPROTEÍNAS DE ALTA DENSIDAD.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
*QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO*

PRESENTA

Eric Gustavo Ramírez Salazar



EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUÍMICA

MÉXICO, D.F.

2004

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

FACULTAD DE QUÍMICA

ESTUDIO DE LA CAPTACIÓN DE PARAOXONASA *in vivo* POR LAS  
LIPOPROTEÍNAS DE ALTA DENSIDAD.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
*QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO*

PRESENTA

Eric Gustavo Ramírez Salazar

DIRECTOR DE LA TESIS

Dr. Oscar A. Pérez Méndez

MÉXICO, D.F.

2003

ESTA TESIS NO SALL  
DE LA BIBLIOTECA

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Ramírez Salazar

Eric Gustavo

FECHA: 16-Enero-2009

FIRMA: 

**Jurado asignado:**

**Presidente:** Profesor. Rogelio Rodríguez Sotres.  
**Vocal:** Profesora. Graciela Nava Díaz.  
**Secretario:** Profesor. Oscar Armando Pérez Méndez.  
**1<sup>er</sup> Suplente:** Profesora. Martha Leticia Jiménez Pardo.  
**2<sup>o</sup> Suplente:** Profesora. Ma. De la Paz Sánchez Jiménez.

Trabajo desarrollado en el Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez".



Oscar Armando Pérez Méndez.

Asesor de Tesis



Eric Gustavo Ramírez Salazar.

(Sustentante)

A María del Carmen Salazar y Benigno Ramírez pilares de mi vida y de mi profesión.

**Gracias.**

**Mi más profundo agradecimiento :**

Al **Dr. Oscar A. Pérez Méndez** por su atinada y contante dirección y asesoría.

Al Instituto Nacional de Cardiología por haber facilitado un difícil sueño como es el de realizar un trabajo de investigación.

A la Candidata a Dra. Claudia Huesca por todo su apoyo, su ayuda en todos los aspectos técnicos y por su amistad.

A todos los miembros del laboratorio de Metabolismo de Lípidos del departamento de Fisiología del INC.

A Erika Almeraya por todo el amor y paciencia que me ofrece.

A toda mi familia por la comprensión y ánimo que siempre he tenido con ellos.

A todos mis compañeros de la facultad (Pedro, Pancho, Valeria, Enrique, Vanessa, Juan Veronica, Emilio, Lizbeth, Armando, Alejandro, Miguel Angel , Emilio, Ginori, Mario, Myrna, Mauricio, Karla, Mario, Fernando, Lorena) por la bonita amistad que me brindaron desde el comienzo de esta aventura.

---

---

Hay Hombres que luchan un día y son buenos,  
hay Hombres que luchan un año y son mejores,  
hay los que luchan muchos años y son muy buenos  
pero hay los que luchan toda la vida, esos son los imprescindibles.

**Bertold Brech**

---

---

# CONTENIDO

	<b>Página</b>
ÍNDICE DE TABLAS Y GRÁFICOS	iii
ABREVIATURAS	v
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>3</b>
I.I. Justificación	4
I.II. Hipótesis	5
I.III. Objetivos Generales	6
I.IV. Objetivos Particulares	6
<b>II. ANTECEDENTES</b>	<b>7</b>
II.I. Aterosclerosis	8
II.I.I. Endotelio Vascular	8
II.I.II. Generación de células espumosas	10
II.II. Metabolismo de las Lipoproteínas de alta densidad (HDL)	13
II.II.I. Estructura de las HDL	13
II.II.II. Metabolismo de las Lipoproteínas de alta densidad	16



II.III. Lipoproteínas de alta densidad y aterosclerosis	20
II.III.I. La capacidad antioxidante de las HDL	20
II.III.II. estructura y función de la paraoxonasa	21
<b>III. METODOLOGÍA</b>	28
III.I. aislamiento y purificación de lipoproteínas de alta densidad humanas	29
III.II. Administración de HDL exógenas y obtención de muestras sanguíneas	30
III.III. Actividad de paraoxonasa asociada a las HDL	31
III.IV. Actividad pon en plasma heparinizado	31
III.V. especificidad de las HDL humanas	33
III.VI. Análisis estadístico de los datos	34
<b>IV. RESULTADOS</b>	35
<b>V. DISCUSIÓN</b>	52
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	60
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA</b>	62
<b>VIII. ANEXOS</b>	70
Anexo A. Ultracentrifugación	71
Anexo B. Determinación de proteínas (Método de Lowry)	73
Anexo C. Electroforesis en gel nativo	74
Anexo D. Determinación de paraoxonasa en muestras de rata	76

## ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y GRÁFICOS

	<b>Página</b>
<b>CUADROS</b>	
Cuadro 1. Funciones y manifestaciones de la disfunción del endotelio vascular	9
Cuadro 2. Subfamilias de las HDL de acuerdo a su tamaño	16
<b>FIGURAS</b>	
Figura 1. Mecanismo de oxidación de las LDL	11
Figura 2. Generación de células espumosas	12
Figura 3. Representación esquemática de una HDL	15
Figura 4. Metabolismo de las HDL	18
Figura 5. Efecto antiaterogénico de las HDL	19
Figura 6. Reacciones de hidrólisis de los sustratos sobre los que actúa la PON	24
Figura 7. Estructura primaria de la PON humana	27
Figura 8. Esquema en dos dimensiones de la estructura de la PON	27
Figura 9. Gel de corrimiento de muestras revelado con paraoxón	33
<b>GRÁFICOS</b>	
Gráfico 1. Actividades PON y ARE en las muestras	31
Gráfico 2. Porcentaje de cambio en actividades PON y ARE	32
Gráfico 3. Areas de las bandas equivalentes a la cantidad de PON en las muestras	34
Gráfico 4. Porcentaje de cambio en las áreas equivalentes a la cantidad de PON	35

Gráfico 5. Correlación de Pearson de las técnicas de revelado en gel y actividad enzimática	36
Gráfico 6. Efecto de los anticuerpos anti-HDL humanas sobre la actividad PON	38
Gráfico 7. Efecto de los anticuerpos anti-HDL humanas sobre la actividad ARE	39
Gráfico 8. Efecto de los anticuerpos anti-HDL humanas en las áreas equivalentes a la cantidad de Pon en las muestras	40
Gráfico 9. Comportamiento de las subfamilias de HDL en relación con la captación de la PON	42
Gráfico 10. Porcentaje aumento de las subfamilias de HDL en las muestras	50

## ABREVIATURAS

PON: Paraoxonasa

ARE: Arilesterasa

HDL: Lipoproteína de alta densidad

LDL: Lipoproteína de baja densidad

VLDL: Lipoproteína de muy baja densidad

LCAT: lecitin colesterolacilo transferasa

PLTP: Proteína transportadora de fosfolípidos

CETP: Proteína de transferencia de ésteres de colesterol

CL: Colesterol libre

CE: Esteres de colesterol

apo: Apolipoproteína

EAC: Enfermedad aterosclerosa coronaria

C-HDL: Colesterol HDL

ROS: Especies reactivas de oxígeno

TRC: Transporte reverso de colesterol

## ***INTRODUCCIÓN***

En la actualidad se conocen suficientes evidencias epidemiológicas sobre el carácter protector de las lipoproteínas de alta densidad (HDL: "High density lipoproteins") contra la aterosclerosis. Sin embargo, aún no se conocen con certeza las bases moleculares de este carácter protector. Una posibilidad es la asociación física que se presenta entre las moléculas HDL y la enzima paraoxonasa (PON).

La paraoxonasa, una enzima dependiente de calcio de la familia de las esterasas aromáticas, encargada de catalizar la hidrólisis de compuestos organofosfatados, entre otras de sus funciones. Se encuentra distribuida en tejidos tales como hígado, riñón, intestinos y en sangre. Esta enzima se asocia estrechamente a las moléculas de HDL, mostrando una inhibición en la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL). Esta asociación es debida a interacciones hidrofóbicas entre fosfolípidos y la proteína.

Por consecuencia de esta asociación la paraoxonasa es transportada en el suero por las HDL además de ser vectorizada por las mismas a los espacios subendoteliales donde llevará a cabo su función antioxidante.

Se propone que el efecto protector dependerá de la cantidad de complejo HDL-paraoxonasa que se encuentre presente en el suero; por lo que, en el presente trabajo se muestran evidencias de un aumento en la cantidad de este complejo y se comprueba que dicho aumento es promovido por la presencia de moléculas de HDL humanas *in vivo*.

## ***I . PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA***

## **I.I Justificación**

La oxidación de los lípidos circulantes, representa un grave problema de salud, debido a que es un mecanismo por el cual se puede desarrollar enfermedad aterosclerosa coronaria. Se han planteado diferentes formas de tratamiento para evitar que se generen los lípidos oxidados o para eliminarlos una vez que han sido formados.

Un mecanismo natural para eliminar o inhibir la oxidación de lípidos de la circulación es gracias a la acción de la enzima paraoxonasa. Para que esta enzima pueda realizar su acción contra la oxidación de los lípidos, requiere estar unida a las HDL que se encargan de vectorizarla hasta los espacios subendoteliales. Por lo tanto, el efecto protector de la PON depende directamente de la cantidad de complejo enzima-HDL presente en suero. De esta manera la infusión de HDL exógenas deberá manifestarse por un aumento en la cantidad de complejos PON-HDL circulantes.

El presente estudio se realiza con el fin de demostrar que la enzima paraoxonasa se unirá a lipoproteínas de alta densidad de origen exógeno y, así, incrementar en circulación la cantidad del complejo PON-HDL, que es potencialmente antioxidante y antiateroscleroso.



## **L.II Hipótesis**

La reserva de paraoxonasa que se encuentra asociada a la membrana de los hepatocitos, puede ser movilizada hacia la circulación sanguínea por un incremento agudo de HDL de origen exógeno, aumentando así la actividad de la enzima en plasma y la cantidad de complejos PON-HDL circulantes. Además, el proceso de reclutamiento de la PON estará mediado principalmente por las HDL de menor tamaño.

### **I.III. Objetivos Generales**

- I. Aislar e infundir HDL de origen humano en un modelo animal que expresa PON(rata).
- II. Determinar la actividad PON presente en el plasma del animal receptor a diferentes tiempos después de la infusión aguda de HDL.
- III. Poner en evidencia la unión de paraoxonasa a lipoproteínas de alta densidad de origen humano
- IV. Determinar de manera semicuantitativa la cantidad de enzima asociada a las HDL y el comportamiento de esta asociación en el tiempo posterior a la infusión de las HDL
- V. Determinar la subfamilia de HDL que presenta una mayor captación de paraoxonasa.

### **I.IV. Objetivos Particulares**

1. Establecer una técnica para la realización de geles de poliacrilamida en los cuales se observe la actividad de enzima paraoxonasa en las muestras de suero de las ratas, por medio del revelado "in situ" usando el Dietil-p-nitrofenilfosfato (paraoxón) como sustrato de la enzima.
2. Corroborar los resultados obtenidos en el gel por medio de la medida de la actividad de la enzima de manera espectrofotométrica, empleando como sustratos el paraoxón y el fenilacetato.
3. Realizar una prueba con anticuerpos anti-HDL humanas tanto en las cinéticas enzimática como en el gel para hacer evidente la captación de paraoxonasa por las HDL humanas administradas.

## ***II. ANTECEDENTES***

## **II.I ATEROSCLEROSIS**

La aterosclerosis es un proceso crónico, degenerativo e inflamatorio de la pared vascular de las grandes arterias<sup>1</sup>. Las lesiones comienzan como respuesta a la formación de daños del endotelio vascular, por la formación de estrias grasas. Esta consiste en la acumulación de lípidos, principalmente colesterol, dentro de macrófagos que los transforman en células espumosas que quedan atrapadas en la capa íntima del endotelio vascular de la arteria. El colesterol presente en circulación debe ser transportado por las lipoproteínas hacia el hígado para su excreción y/o reciclaje. Una acumulación de lípidos en el interior de la capa íntima junto con otros factores, tales como la proliferación de células de músculo liso y de tejido conectivo provoca la formación de placas conocidas como ateromas. Algunos de los factores de riesgo para el desarrollo de aterosclerosis son: edad, sexo masculino, y predisposición genética (No modificables); tabaquismo, alcoholismo, sedentarismo y dieta inadecuada (Modificables); obesidad, hipertensión arterial, diabetes mellitus, intolerancia a glucosa, síndrome metabólico y dislipidemia (Controlables)<sup>2</sup>.

### **II.I.I. Endotelio vascular**

La pared de los vasos sanguíneos está formada por tres constituyentes principales: endotelio, músculo liso y tejido conectivo. Estos se encuentran dispuestos en tres capas conocidas como íntima, media y adventicia. La capa íntima se compone por células endoteliales, que forman una membrana de espesor monocelular y tejido conectivo subendotelial. Es considerada como una barrera pasiva, aunque hoy en día se considera al endotelio vascular como un órgano multifuncional.

Las alteraciones en su estructura generadas principalmente por: citocinas, proteasas locales, infecciones, radicales libres, diabetes y lípidos oxidados; puede dar lugar a cambios localizados, generando manifestaciones diversas según la función que se vea afectada<sup>3-6</sup> (Cuadro 1).

**Cuadro 1. Funciones del endotelio vascular y manifestaciones de su disfunción.**

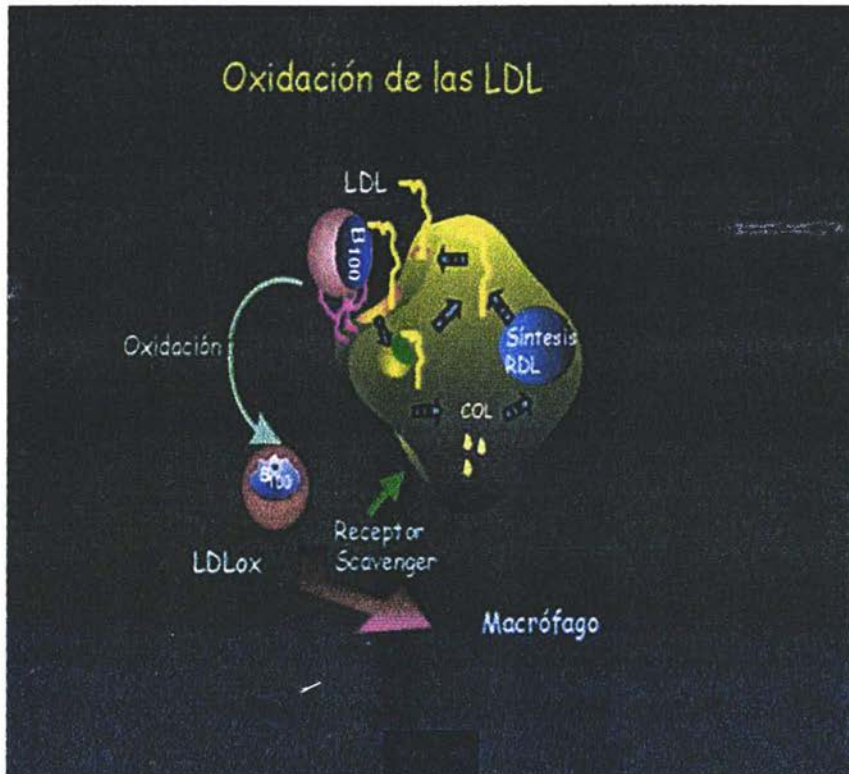
<b>FUNCIÓN</b>	<b>MANIFESTACIÓN DE LA DISFUNCIÓN</b>
Barrera permeable selectiva	Permeabilidad aumentada de lipoproteínas plasmáticas
Órgano secretor	Síntesis de citocinas
Regulador del tono vascular	Alteración en el balance de sustancias vasoactivas
Regulador de crecimiento vascular	Disminución de actividad fibrinolítica
Regulador de homeostasis y trombosis	Aumento de actividad procoagulante
Regulador de respuesta inmune e inflamatoria	

### **II.II.II. Generación de células espumosas**

En el endotelio vascular disfuncional se presenta una alteración en la permeabilidad permitiendo la entrada y acumulación excesivas de lipoproteínas de baja densidad (“Low Density Lipoproteins”: LDL) hacia la matriz subendotelial (capa íntima). Aquí las cadenas alifáticas de las que están compuestos los fosfolípidos de las LDL blanco de la peroxidación de lípidos llevada a cabo por especies reactivas de oxígeno (ROS) provenientes de macrófagos, células de músculo liso o del endotelio vascular (Figura 1)<sup>7,8</sup>.

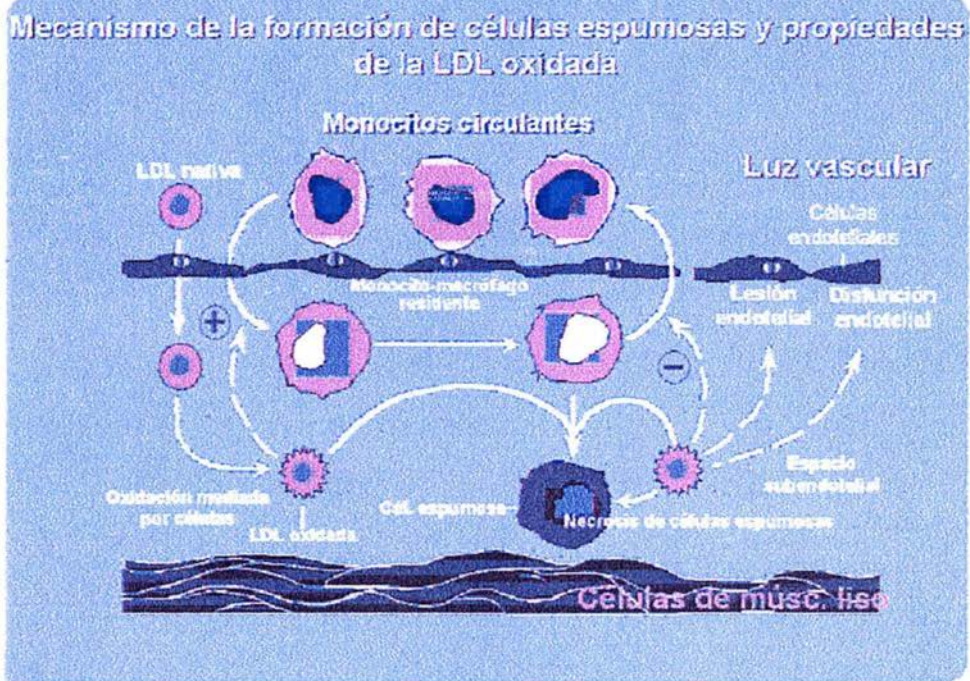
Los lipoperóxidos generados presentan modificaciones localizadas que dan origen a epítomos que son reconocidos como extraños por los macrófagos y se comienzan a producir anticuerpos (anti-LDL ox). Las LDL oxidadas presentes en el espacio subendotelial intervienen en la generación de una placa ateromatosa debido a sus actividades quimiotáctica y quimiostática, fomentando la invasión de la íntima por monocitos y la formación de células espumosas<sup>9</sup>.

Los monocitos reclutados en la íntima derivan hacia macrófagos que captan a las LDL oxidadas, por medio de receptores scavenger, conduciendo a la formación de un número elevado de gotas de lípidos en la célula dando el aspecto espumoso (Figura 2).



**Figura 1.** Mecanismo de oxidación de las LDL, previo al reconocimiento por el macrófago para después generar la célula espumosa.





**Figura 2. Generación de células espumosas.** Las LDL que entran al espacio subendotelial son blanco de la oxidación por radicales libres, generando LDL oxidadas que son reconocidas y fagocitadas por los macrófagos. La enzima paraoxonasa (PON) inhibe la oxidación de lípidos por los radicales libres.



## **II.II METABOLISMO DE LIPOPROTEÍNAS DE ALTA DENSIDAD (HDL)**

### **II.II.I. Estructura de las HDL**

En un medio acuoso como lo es el plasma, los lípidos por su característica hidrofóbica necesitan ser transportados por proteínas conocidas como lipoproteínas que son solubles en el medio acuoso. Un tipo de estas lipoproteínas son las lipoproteínas de alta densidad (“High Density Lipoproteins”: HDL).

Las HDL son complejos macromoleculares, pseudomicelares, constituidos por lípidos anfipáticos (fosfolípidos y colesterol libre), lípidos no polares (triglicéridos y ésteres de colesterol) y por proteínas llamadas apolipoproteínas (apo) (Figura 3). Los lípidos anfipáticos se organizan en una monocapa en la superficie del complejo, presentando sus grupos polares hacia el medio acuoso. La estabilidad de esta monocapa está garantizada por la apolipoproteínas. Los lípidos no polares son insolubles en un medio acuoso como el plasma y en consecuencia se sitúan en el interior de las lipoproteínas, evitando así las interacciones con los grupos polares que serían fisicoquímicamente desfavorables<sup>10</sup>.

La mayoría de las apolipoproteínas de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) son sintetizadas tanto en el hígado como en el intestino delgado, estas lipoproteínas pueden ser secretadas con lípidos como una molécula de HDL<sub>3</sub> (naciente) y, probablemente, también como lipoproteínas libres.

Las HDL son las lipoproteínas con mayor proporción proteica (55-60% de su masa seca), siendo la apo A-1 su apolipoproteína más abundante<sup>11</sup>. La apo A-1, además de su función estructural, es indispensable para el eflujo de colesterol de las células periféricas.

La apo A-1 desempeña también el papel de funcionar como coenzima de la lecitin colesterol acil transferasa (LCAT), enzima clave en el transporte reverso del colesterol.

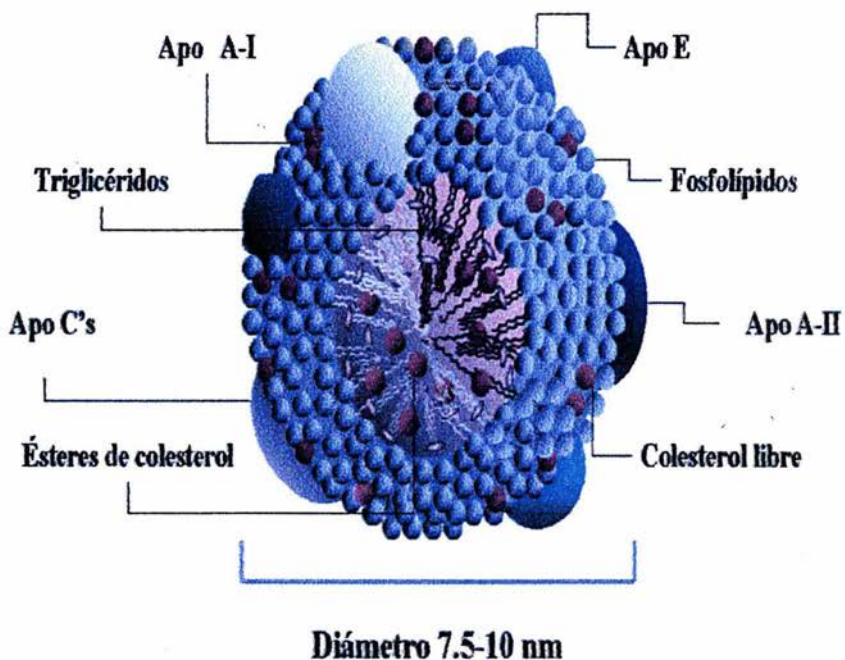
Se han descrito varias subclases de HDL en función de ciertas características fisicoquímicas y funcionales. Una clasificación con base en la densidad de flotación ( $\rho$ ), las distingue en HDL<sub>2</sub> ( $1.063 < \rho < 1.12$  g/mL) y las HDL<sub>3</sub> ( $1.12 < \rho < 1.21$  g/mL) (Cuadro 2)<sup>12</sup>. Las HDL<sub>2</sub> son ricas en lípidos hidrofóbicos, mientras que las HDL<sub>3</sub> están formadas por fosfolípidos y proteínas, principalmente.

Las HDL migran en su mayoría dentro de la fracción  $\alpha$  del plasma, por lo que se les ha identificado como  $\alpha$ -lipoproteínas. También, por su movilidad electroforética en combinación con su tamaño, se han descrito otras subfracciones de HDL entre las que destacan las partículas pre- $\beta$ <sup>120</sup>. Estas partículas están compuestas principalmente por fosfolípidos y apo A1.

Otros métodos de separación como la electroforesis en gradiente de poliacrilamida o filtración en gel, se han empleado para refinar la clasificación de las HDL.

Fig. 3

## HDL



*Figura 3. Representación esquemática de la organización de una lipoproteína de alta densidad. Se muestran los lípidos hidrofóbicos del núcleo. Las apolipoproteínas se unen por interacciones hidrofóbicas a los lípidos más externos y por atracciones electrostáticas con los fosfolípidos para estabilizar a la pseudomicela lipídica*

**Cuadro 2. Subfamilias de HDL de acuerdo a su tamaño<sup>12</sup>.**

<b>SUBCLASES</b>	<b>TAMAÑO (nm)</b>
HDL 2b	9.71 – 12.9
HDL 2a	8.77 – 9.71
HDL 3a	8.17 – 8.77
HDL 3b	7.76 – 8.17
HDL 3c	7.21 – 7.76

### **II.II.II. Metabolismo de las Lipoproteínas de Alta Densidad**

La heterogeneidad de las HDL tiene su origen en el metabolismo intravascular.

Uno de los mecanismos por medio del cual las HDL evitan la formación de la placa aterosclerótica, es el transporte reverso de colesterol (TRC), definido como el regreso del colesterol hacia el hígado para su excreción o reciclaje<sup>13</sup>.

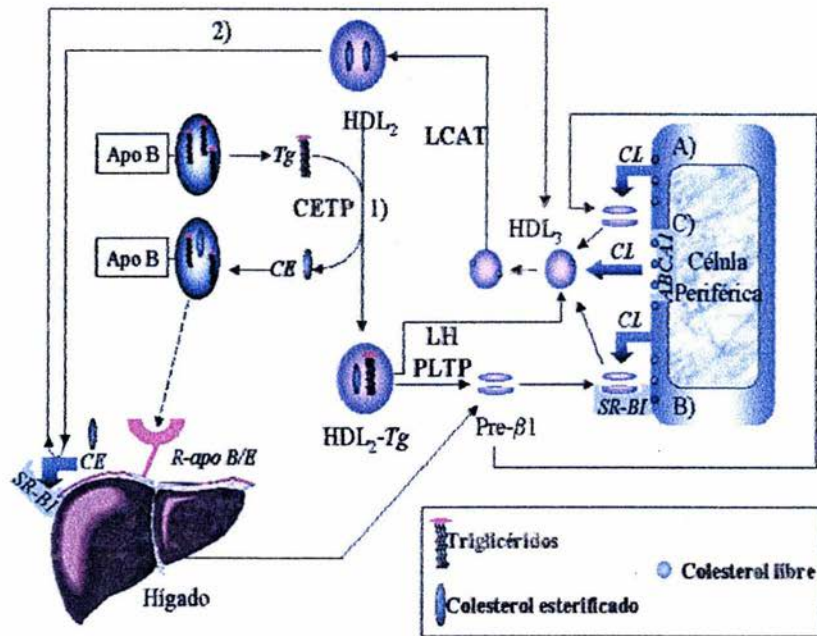
La primera etapa del TRC es el eflujo de colesterol de las células; este colesterol captado (colesterol libre: CL) por partículas pre- $\beta$  es esterificado por la lecitina colesterolacil transferasa (LCAT), provocando que el colesterol pierda su carácter anfipático transformándose en una molécula hidrofóbica. Por esta razón, los ésteres de colesterol abandonan la superficie de la lipoproteína que los transporta, aumentando el tamaño de la misma.

Este colesterol esterificado puede ser intercambiado por triglicéridos provenientes de lipoproteínas que contengan la apo-B, lipoproteínas de muy baja densidad y lipoproteínas de baja densidad (VLDL y LDL, respectivamente). Este intercambio es facilitado por la

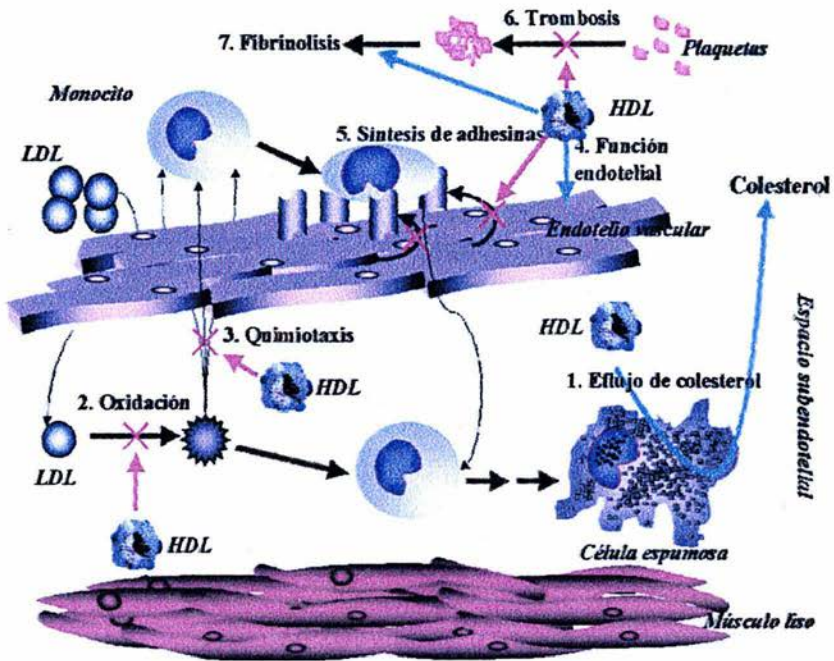
proteína de transferencia de ésteres de colesterol (CETP). Además de los lípidos hidrofóbicos de las HDL, también los fosfolípidos son transferidos hacia las VLDL por la proteína transportadora de fosfolípidos (PLTP).

Finalmente, los triglicéridos provenientes de las HDL son hidrolizados por la lipasa hepática, generando así una disminución de tamaño de las moléculas de HDL<sub>2</sub>, transformándose en HDL<sub>3</sub> y en partículas pre-β, mismas que pueden comenzar nuevamente el ciclo (Figura 4). Otra vía de eliminación de colesterol plasmático es el receptor SR-BI, ubicado en el hígado<sup>14</sup>. Se unen a él con gran afinidad tanto HDL como LDL y, por un mecanismo aún desconocido, se internaliza únicamente el colesterol dejando al resto de la lipoproteína intacta, regenerando así las partículasceptoras de colesterol que son capaces de comenzar un nuevo ciclo de TRC. Es por este último mecanismo que se elimina una cantidad considerable del colesterol circulante.





**Figura 4.** El metabolismo de las HDL. Los aceptores primarios del excedente de CL proveniente de células periféricas por 1) simple contacto. La esterificación de la lipoproteína unida al colesterol por la LCAT, da origen a aumentos del tamaño de la lipoproteína (Lp), generando así HDL<sub>3</sub> y HDL<sub>2</sub>. El colesterol esterificado (CE) puede seguir dos rutas: A) por acción de la CETP es intercambiado por triglicéridos (TG) provenientes de VLDL e IDL (lipoproteínas de muy baja densidad y Lipoproteínas de densidad intermedia, respectivamente) posteriormente, es transportado al hígado para su eliminación y/o reciclaje, o B) es eliminado directamente de la Lp mediante el receptor SR-BI, generando así HDL de menor tamaño capaces de iniciar nuevamente el ciclo.



**Figura 5.** Resumen de los efectos antiaterogénicas de las HDL. Las flechas punteadas y las cruces indican efectos inhibitorios. La flechas continuas que se originan en las HDL son indicativas de acciones que favorecen el proceso. Las HDL promueven el eflujo de colesterol de los macrófagos y células espumosas (1) que se encuentran el espacio subendotelial durante las primeras etapas de la formación del ateroma. Poseen además propiedades antioxidante (2), inhiben la quimiotáxis promovida por las LDL oxidadas (3), favorecen la producción de NO por las células endoteliales (4), regulan la síntesis de adhesinas en endotelio vascular (5) y presentan propiedades antitrombóticas (6) y profibrinolíticas (7).

## **II.III LIPOPROTEÍNAS DE ALTA DENSIDAD Y ATEROSCLEROSIS**

### **II.III.I. La capacidad antioxidante de las HDL**

La hipoalfalipoproteinemia se define como concentraciones plasmáticas de colesterol HDL (C-HDL) por debajo de la décima porcentual ajustada por la edad y el sexo del sujeto. En términos prácticos, una concentración de C-HDL menor a 36 mg/dL se considera como alfalipoproteinemia. La cantidad de HDL es importante, pero la velocidad con la que realizan sus funciones lo es aún más. La figura 5 presenta los diversos mecanismos que sostienen el papel antiaterogénico de las HDL.

Las LDL oxidadas en el espacio subendotelial intervienen en la formación de la placa ateromatosa por sus cualidades proinflamatorias. Por tanto, el papel antiaterogénico de las HDL se debe en parte a la capacidad antioxidante que poseen. Varios de sus elementos participan en esta propiedad, entre ellos sus apolipoproteínas y, particularmente, la paraoxonasa (PON), enzima físicamente asociada a las HDL plasmáticas<sup>15</sup>.

Se ha demostrado que las HDL<sub>3</sub>, es decir las HDL de menor tamaño; son los mejores aceptores plasmáticos de la paraoxonasa que originalmente se encuentra unida a la membrana del hepatocito. Se ha considerado que la captación de PON se lleva a cabo principalmente por las HDL pequeñas y que éstas sufren modificaciones a su paso por la vía del transporte reverso de colesterol hasta transformarse en HDL de tamaños mayores (HDL<sub>2</sub>), alcanzando así una mayor proporción en la circulación<sup>23,33</sup>.

Además de que se ha asociado a la paraoxonasa con la incidencia de enfermedad aterosclerosa coronaria<sup>15-18</sup>, las bases moleculares que explican la relación inversa entre la PON1 y la aterosclerosis, se han adjudicado a la capacidad que posee la enzima de eliminar los lipoperóxidos que participan en la formación de la placa ateromatosa (Figura 5).



### **II.III.II. Estructura y función de la paraoxonasa**

El gen de la paraoxonasa 1 (PON1) consiste de nueve exones y ocho intrones que abarcan poco más de 25 Kb (Kilobases). Se encuentra localizado en el brazo largo del cromosoma 7 entre los segmentos q21.3 y q22.1 con otros miembros de esta familia de genes (PON2 y PON3). La expresión del gen PON1 da origen a una glicoproteína PON1 de 354 residuos de aminoácidos y de masa aparente de 43 y 45 kD<sup>19</sup>.

La proteína madura retiene su péptido señal con excepción del residuo iniciador de metionina. La enzima se sintetiza en el hígado y queda anclada a la membrana gracias a la interacción de su péptido señal con los fosfolípidos de la membrana del hepatocito. Sin embargo, no existen reportes que hayan descrito actividad PON1 en compartimentos extraplasmáticos, probablemente por que el microambiente no le proporciona al enzima las condiciones ideales para manifestarla<sup>20</sup>.

Para que PON1 abandone la membrana del hepatocito hacia su destino final, el plasma, requiere de un aceptor formado por compuestos anfipáticos (detergentes no iónicos o fosfolípidos), organizado en micelas o bicapas anfipáticas y que posea una tensión superficial adecuada. *In vivo*, este aceptor son las HDL, particularmente la subfracción HDL<sub>2</sub>. Como consecuencia de esta asociación, la paraoxonasa es transportada en el plasma por las HDL además de ser vectorizada por las mismas a los espacios subendoteliales donde llevará a cabo su función antioxidante.

Este enzima pertenece a la familia de las esterasas aromáticas tipo A con especificidad muy amplia sobre diferentes compuestos no naturales: arilésteres, lactonas y ésteres de fosfato aorgánicos, incluyendo agentes nerviosos como el sarín y el somán.

La paraoxonasa es un enzima que depende de calcio para su estabilidad y actividad catalítica, por lo que las muestras de plasma obtenidas con EDTA u otro tipo de agentes quelantes son inadecuadas para determinar la actividad de la enzima. Otros iones metálicos divalentes, como  $Zn^{2+}$  y  $Cd^{2+}$ , evitan la desnaturalización del enzima, pero carecen de la capacidad de conferirle actividad catalítica.

Uno de los sustratos más utilizados para el estudio de la enzima es el paraoxón (O,O-dietil-O-p-nitrofenilfosfato), un potente inhibidor de las colinesterasas. Históricamente, fue el primer compuesto con el que se puso de manifiesto la existencia de la enzima y de él deriva su nombre. Otro de los sustratos no naturales que se ha utilizado extensivamente para el estudio de la PON1 es el fenilacetato<sup>21-23</sup> (Figura 6).

Se debe destacar que, debido a la amplia utilización de estos dos sustratos, se ha adoptado el término “actividad de paraoxonasa” cuando se usa paraoxón como sustrato de la PON1; de la misma manera, cuando se usa fenilacetato, se hace referencia a la “actividad arilesterasa” de la PON1.

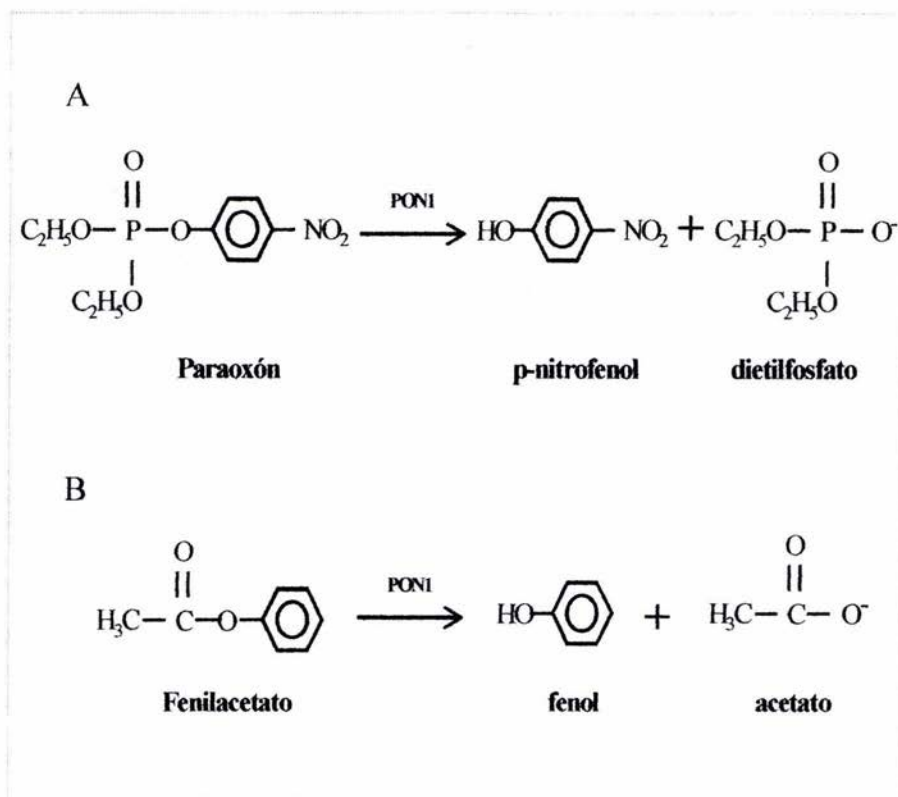
Aunque los sustratos naturales de la paraoxonasa son desconocidos, algunos sustratos sintéticos han mostrado la capacidad preventiva que esta enzima presenta en la oxidación de LDL debido a la hidrólisis de peróxidos de lípidos en las lipoproteínas.

Se ha demostrado que esta enzima también hidroliza fosfolípidos hidroxperoxidados e hidroxperóxidos de ésteres de colesterol (actividad lipoperoxidasa).

Recientemente, se ha reportado que la paraoxonasa 1 (PON1) en las HDL puede bloquear la respuesta inflamatoria contribuyendo así a la prevención de la oxidación de LDL.

En el hombre y en algunas especies animales, como el conejo, dicho gen presenta dos polimorfismos: Q o R cuando en la posición 191 se localiza una glutamina o una arginina respectivamente, y polimorfismo M o L cuando en la posición 54 se localiza una metionina o una lisina, respectivamente. Cabe destacar que en la rata, sujeto de estudio en el presente trabajo, no se presenta esta variabilidad genética.

La velocidad de reacción de la paraoxonasa (con paraoxón como sustrato) de la aloenzima 191R se incrementa considerablemente con una fuerza iónica elevada (1 M de NaCl), mientras que los parámetros cinéticos de la aloenzima 191Q no se estimulan en presencia de una fuerza iónica elevada.



**Figura 6.** Reacciones de hidrólisis de dos sustratos sobre los que actúa la paraoxonasa.

A) Hidrólisis del paraoxón, esta reacción tiene una función detoxificadora; B) Hidrólisis del fenilacetato.

En el suero la enzima PON1 está casi exclusivamente asociada a lipoproteínas de alta densidad (HDL); ésta asociación está mediada por la interacción hidrofóbica de su extremo N-terminal (péptido señal) con los fosfolípidos y las apolipoproteínas de las HDL (Figuras 7 y 8).

Las HDL son un factor limitante para la expresión de PON1 plasmática. Si no existen suficientes HDL, en particular HDL<sub>2</sub>, el número de moléculas PON1 en circulación se verá limitada y los procesos de lipoperoxidación no podrán ser atenuados.

La paraoxonasa contienen tres residuos de cisteína. En la enzima humana, los residuos Cys41 y Cys352 forman un puente disulfuro (Figuras 7 y 8). La Cys283 es un grupo sulfhidrilo libre y, a pesar de que este residuo no forma parte del sitio activo del enzima, es indispensable para su actividad. Los residuos de histidina 114, 133 y 284 son también indispensables para su acción hidrolítica, mientras que el Trp280 forma parte del sitio activo de la enzima y está probablemente involucrado en la unión con los sustratos aromáticos<sup>24-26</sup>.

Evidencias epidemiológicas y experimentales han mostrado que el proceso oxidativo *in vivo*, incluida la oxidación de LDL, juega un papel importante en el desarrollo de la aterosclerosis, siendo la oxidación de LDL el proceso clave durante la fase inicial.

Las bases moleculares que explican la relación inversa entre la PON1 y la aterosclerosis se han adjudicado a la capacidad que posee la enzima de hidrolizar los lipoperóxidos que participan en la formación de la placa ateromatosa.



El inicio y la progresión de la placa ateromatosa en la pared arterial depende en buena medida de la peroxidación de las lipoproteínas, en particular de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), peroxidación mediada por radicales libres<sup>27</sup>. Es a este nivel que la PON1 desempeña su papel protector. Estudios *in vitro* han demostrado la disminución de la actividad de monocitos por las LDL oxidadas en presencia de PON1.

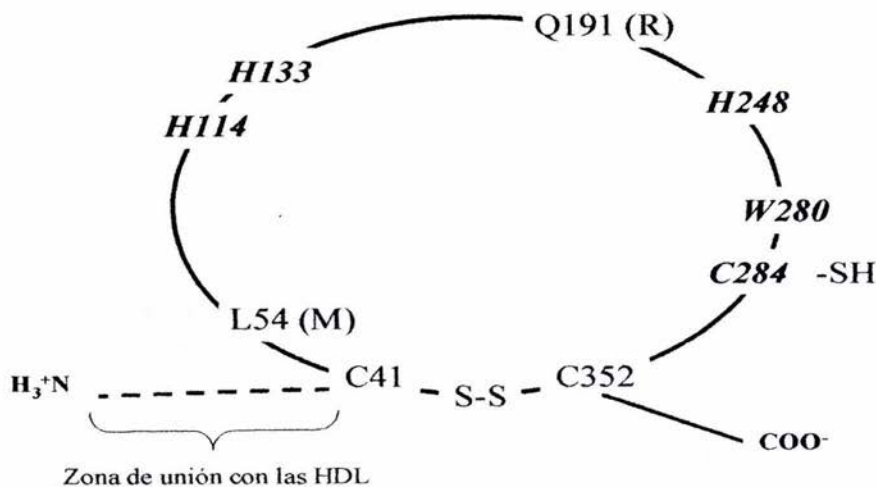
Existe además una correlación positiva entre la concentración de C-HDL o de apo A-I y la actividad enzimática de la paraoxonasa. Esta correlación se puede explicar desde la perspectiva de que las HDL funcionan como aceptor de la enzima, como ya se ha descrito. Así, la cantidad de partículas HDL podría limitar el número de moléculas de enzima presentes en plasma.

La asociación de paraoxonasa-HDL representa entonces una explicación adicional a las observaciones epidemiológicas que marcan considerablemente a los bajos niveles de C-HDL como un factor de riesgo de enfermedad aterosclerosa coronaria (EAC).

No obstante la actividad de la paraoxonasa no está sujeta únicamente al nivel de HDL plasmáticas, sino que su expresión y, por lo tanto, su actividad están reguladas por factores genéticos y ambientales. En consecuencia, es imposible concluir que este sea el único elemento responsable de la protección brindada por las moléculas de HDL; por lo que deberá contemplarse como un factor que solo puede retardar, bajo ciertas condiciones, el proceso ateromatoso<sup>28</sup>.

AKLIALTLLG MGLALFRNHQ **SSYQTRLNAL** **REVQPVELQN** CNLVKGIETG SEDMEILPNG  
 LAFISSGLKY PGIKSFNPNS PGKILLMDLN EEDPTVLELG ITGSKFDVSS FNPHGISTFT  
 DEDNAMYLLV VNHPDAKSTV ELFKFQEEEK SLLHLKTIRH KLLPNLNDIV AVGPEHFYGT  
 NDHYFLDPYL QSWEMYLGLS WSYVVYSPS EVRVVAEGFD FANGINISPD GKVVYIAELL  
 AHKIHVYEKH ANWTLTPLKS LDFNTLVDNI SVDPETGDLW YGCHPNGMKI FFYDSENPPA  
 SEVLRIQNIL TEEPKVTVQV AENGTVLQGS TVASVYKGLK LIGTVFHKSL YCEL

**Figura 7.** Estructura primaria de la paraoxonasa humana, mostrando la secuencia de aminoácidos en su código de una letra. Los aminoácidos directamente implicados en la acción catalítica se presentan sombreadas. La región N-terminal, involucrada en la unión a las HDL se presenta en letras negras. Las letras subrayadas señalan los aminoácidos responsables del enlace disulfuro (residuos cisteína 41 y 352). Las estructuras secundaria y terciaria no han sido descritos.



**Figura 8.** Esquema de dos dimensiones de la estructura de la paraoxonasa, indicando el sitio de unión a las HDL (residuo Cys 41). Los residuos Lys (L)54 y Gln (Q) 191 son los sitios responsables del polimorfismo, presente en algunas especies, entre ellas el humano.

### ***III. METODOLOGÍA***



La parte experimental del presente trabajo se realizó en el laboratorio de metabolismo de lípidos del Departamento de Fisiología del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” dependiente de la Secretaría de Salud.

### **III. AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE LIPOPROTEÍNAS DE ALTA DENSIDAD HUMANAS**

Las lipoproteínas de alta densidad se aislaron a partir de sangre humana obtenida por venipunción de voluntarios sanos y colectada en tubos de sistema Vacutainer con heparina sódica. El plasma se separó del paquete globular por centrifugación a 3500 RPM durante 20 minutos. Posteriormente, los plasmas se sometieron a ultracentrifugación para separar por diferencia de densidades sus lipoproteínas, según se describe a continuación.

La densidad del suero se ajustó a 1.063 g/mL, adicionando 205.7  $\mu$ L de una solución de KBr con densidad de 1.34 g/mL por cada mL de suero y centrifugando a 110,000 RPM, durante 2 horas 35 minutos, para separar a las VLDL, IDL y LDL. Se recuperó el infranadante que contiene las lipoproteínas de alta densidad. A éste se le ajustó nuevamente la densidad a 1.25 g/mL adicionando 307 mg de KBr sólido por cada mL y se centrifugó a 110,000 RPM por 2 horas 35 minutos. En el sobrenadante se obtuvieron las HDL.

Las HDL se recuperaron y se lavaron adicionando solución de KBr con densidad de 1.25 g/mL y centrifugando a 110,000 RPM por 2 horas 35 minutos para eliminar el exceso de albúmina

(Anexo A). Una vez aisladas las HDL son dializadas por tres días, contra un volumen de Solución Salina Isotónica (SSI), grado inyectable, para eliminar las trazas de KBr presentes

realizando recambios de la solución de SSI cada 8 horas. Después de este periodo, se cuantificó la cantidad de proteína presente en la fracción aislada por el método de Lowry (Anexo B).

La pureza e integridad de las HDL se determinó por PAGE nativo con gradiente de 4 – 30 % (Anexo C). La ausencia de actividad paraoxonasa en las HDL utilizadas se determinó espectrofotométricamente utilizando paraoxón como sustrato, según se describe más adelante.

### **III.II. ADMINISTRACIÓN DE HDL EXÓGENAS Y OBTENCIÓN DE MUESTRAS SANGUÍNEAS**

Se emplearon 15 ratas macho de la cepa Wistar con un peso aproximado de 400 g.

Las ratas fueron anestesiadas con 100  $\mu$ L de pentobarbital sódico por cada 100 g de peso.

Una vez anestesiadas, se recolectaron 200  $\mu$ L de sangre de la vena de la cola al tiempo cero (actividad basal) y, en seguida, se administraron 500  $\mu$ g de proteína de HDL a cada rata por cada 100 g de peso. A partir de la infusión de HDL, se tomaron muestras sanguíneas a los tiempos: 20, 40, 60, 80, 100, 120 y 140 minutos.

Las muestras se colectaron por punción de la vena de la cola de la rata usando heparina sódica para la obtención de plasma. Posteriormente, se centrifugaron a 3500 RPM, durante 20 minutos, para la separación del plasma, el cual fue almacenado a  $-70$  °C.

### **III.III. ACTIVIDAD DE PARAOXONASA ASOCIADA A LAS HDL**

Los geles de gradiente 4 – 30 % de poliacrilamida se prepararon siguiendo la técnica presentada en el anexo C. Para correr las muestras en el gel, se diluyen con amortiguador de muestra y con 2  $\mu\text{L}$  de  $\text{CaCl}_2$  (Anexo C). Una vez transcurridas las 24 horas de corrida, el gel se reveló con paraoxón durante 30 minutos, para hacer evidente la presencia de la enzima en las muestras.

Los geles se analizaron por densitometría óptica. La cantidad de enzima asociada a las HDL se estimó por medio del el área bajo la curva en el densitograma. Posteriormente, los geles se tiñeron con azul de Coomasie R250 para determinar el diámetro de Stokes de las partículas en donde se identificó la actividad PON, usando marcadores de diámetro conocido como referencia (Kit Pharmacia: Tiroglubulina 17 nm, Ferritina 12.2 nm, Catalasa 10.4 nm, Lactato deshidrogenasa 8.1 nm y Albúmina sérica bovina 7.1 nm).

### **III.IV. ACTIVIDAD PON EN PLASMA HEPARINIZADO**

Se realizaron las cinéticas enzimáticas para cada una de las muestras, de acuerdo a la siguiente técnica.

#### **Actividad de paraoxonasa**

Diluir 25 $\mu\text{L}$  de la muestra en 1 mL de sustrato PON

Mezclar y esperar 1 minuto

Seguir la cinética cada 30 segundos por 3 minutos a 412 nm.

### **Actividad arilesterasa**

Hacer una dilución 1:2 de las muestras en buffer ARE.

Añadir 10 $\mu$ L de la muestra a 1 mL de sustrato ARE

Mezclar y esperar 1 minuto

Seguir la cinética cada 30 segundos por 5 minutos a 270 nm.

### **Amortiguadores y sustratos**

1. Amortiguador PON: Glicina-NaOH 50 mM, CaCl<sub>2</sub>, pH = 10

Sustrato PON: En 10 mL de buffer PON agregar 3 $\mu$ L de Paraoxón y dejar reposar 30 minutos antes de su uso en la medición de la actividad PON.

2. Amortiguador ARE: Tris-HCl 20 mM, CaCl<sub>2</sub> 0.9 mM, pH= 8

Sustrato ARE: En 10 mL de buffer ARE agregar 1.27  $\mu$ L de fenilacetato y dejar reposar 15 minutos antes de su uso en la medición de la actividad PON.

Las actividades PON y ARE se expresan como *nmol p-nitrofenol formado por minuto por mL de plasma* para PON y  *$\mu$ mol fenol formado por minuto por mL de plasma* para ARE, utilizando los coeficientes de extinción molar 18290 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> y 1310 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> para el p-nitrofenol y el fenol, respectivamente.

Para cuantificar la cantidad de paraoxonasa que es captada por cada una de las subfamilias de HDL, los geles que se revelaron con paraoxón se integraron parcialmente nuevamente usando los intervalos de tamaños que se reportan en el cuadro 2 (ver antecedentes). Para obtener las fracciones correspondientes a las diferentes subfamilias de HDL.

### **III.V. ESPECIFICIDAD DE LAS HDL HUMANAS**

Con el objetivo de demostrar que el incremento en la actividad PON es debido exclusivamente a las HDL humanas infundidas, se adicionaron 100  $\mu$ L de anticuerpos anti-HDL humanas por cada 100  $\mu$ L de muestra y se incubaron a 37°C durante una hora. Al término de la incubación se centrifugaron a 2500 RPM, y se corrieron en un gel de poliacrilamida con gradiente de 4 – 30 % junto con la misma cantidad de muestra sin anticuerpos. Con las mismas muestras se realizaron también las cinéticas enzimáticas según se describe previamente.

### **III.VI. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS**

Las actividades enzimáticas tanto en gel como en las cinéticas a los diferentes tiempos se compararon contra sus respectivas actividades basales ( $t = 0$ ) por medio de una prueba t de Student pareada, considerando una diferencia estadísticamente significativa cuando la probabilidad de error fuera menor a 0.05 ( $P \leq 0.05$ ).

La correlación que existe entre los métodos de cuantificación de PON en el gel y en las cinéticas se realizó por medio de una prueba de Pearson, considerando una correlación significativa cuando la probabilidad de error fuera menor a 0.05 ( $P \leq 0.05$ ).

## ***IV. RESULTADOS***



Para determinar si la infusión aguda de las HDL humanas produce en el plasma de las ratas un aumento en la actividad PON, realizamos la cinética enzimática a los diferentes tiempos descritos en el capítulo de métodos, usando paraoxón y fenilacetato como sustratos para las actividades PON y ARE, respectivamente.

Independientemente del sustrato empleado, observamos que la actividad de la enzima aumenta gradualmente conforme transcurre el tiempo, hasta alcanzar valores máximos entre los tiempos de 60 y 80 minutos después de la infusión de las HDL humanas (Gráfico1). Una vez alcanzado el máximo de actividad enzimática ésta disminuye hasta alcanzar los niveles basales aproximadamente a los 140 minutos.

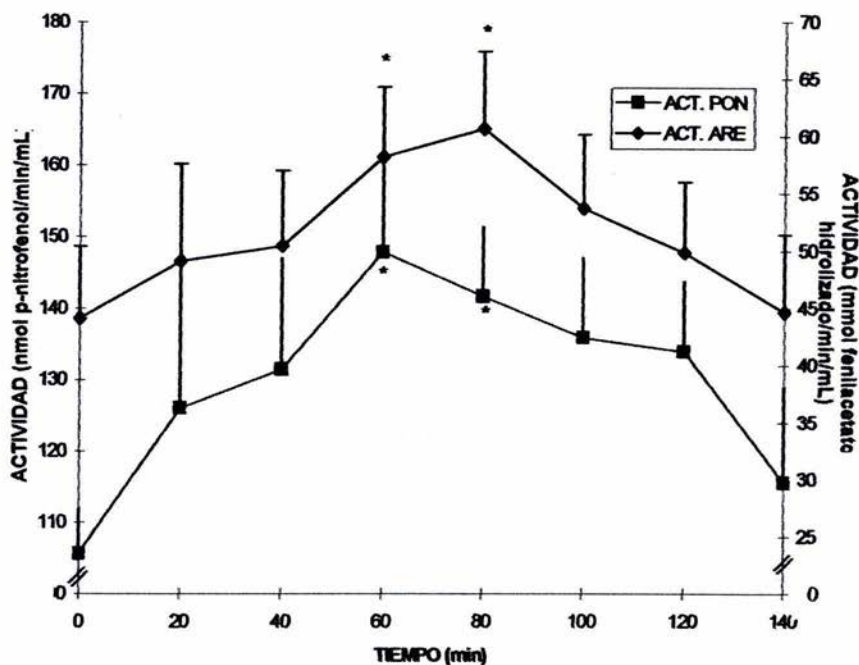
Los incrementos máximos observados fueron del 40 % a los 60 minutos para la actividad PON; y de 37 % a los 80 minutos para la actividad ARE (Gráfico 2). Indicando que ambos sustratos son representativos de la cantidad de enzima activa en plasma.

La figura 1 presenta un gel de poliacrilamida con gradiente de 4 – 30 % en el cual se corrieron las mismas muestras y fue revelado con paraoxón, según se describe en métodos. Se observaron una serie de bandas correspondientes a las muestras obtenidas a los diferentes tiempos. La relación que representa la actividad PON con respecto a los tamaños de las HDL, se encuentra localizada entre las HDL de gran tamaño a tamaño mediano, siendo éstas últimas las que presentan mayor intensidad de color. Lo anterior nos sugiere que se ha presentado una captación de la PON por las HDL y que dicha captación es debida a las HDL de tamaño intermedio a pequeño (subfamilias 2a, 3b y 3c).

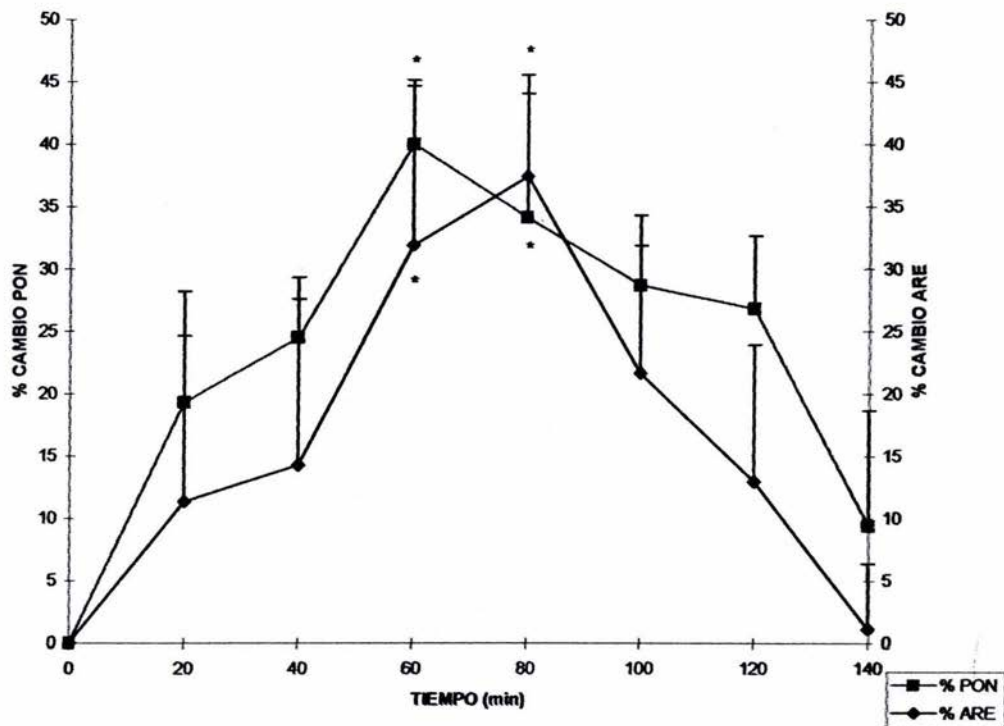


El comportamiento de la cantidad de enzima asociada a las HDL estimada por el área bajo la curva obtenida en el densitograma fue similar a lo observado en la cinética enzimática (Gráfico 3). En este gráfico encontramos que los tiempos de 60 y 80 minutos son los que presentan la mayor cantidad de PON asociada a las HDL y que arrojan los incrementos más importantes en actividad del 92.6 % y 67.4 % respectivamente (Gráfico 4).

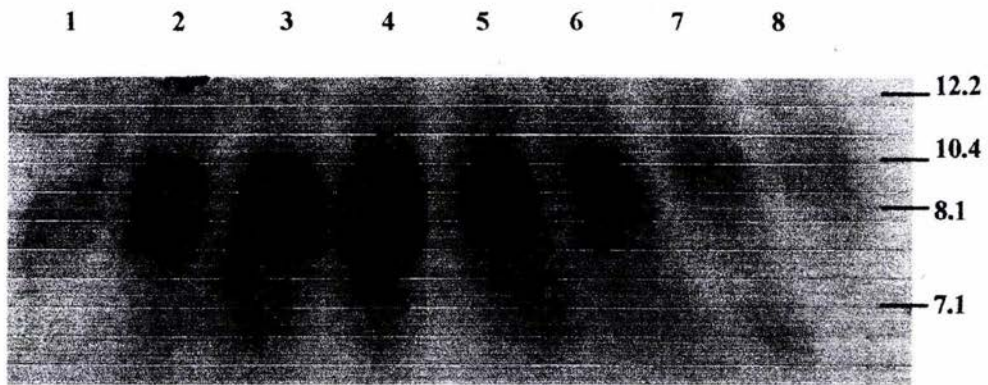
Adicionalmente, realizamos una prueba de Pearson para determinar si existe una correlación entre el método de cinética enzimática y el método en gel (Gráfico 5). El coeficiente de Pearson que arroja el análisis fue de 0.536, lo que indica una correlación relativamente pobre entre los métodos sugiriendo que puede existir una fracción libre de PON activa en el plasma.



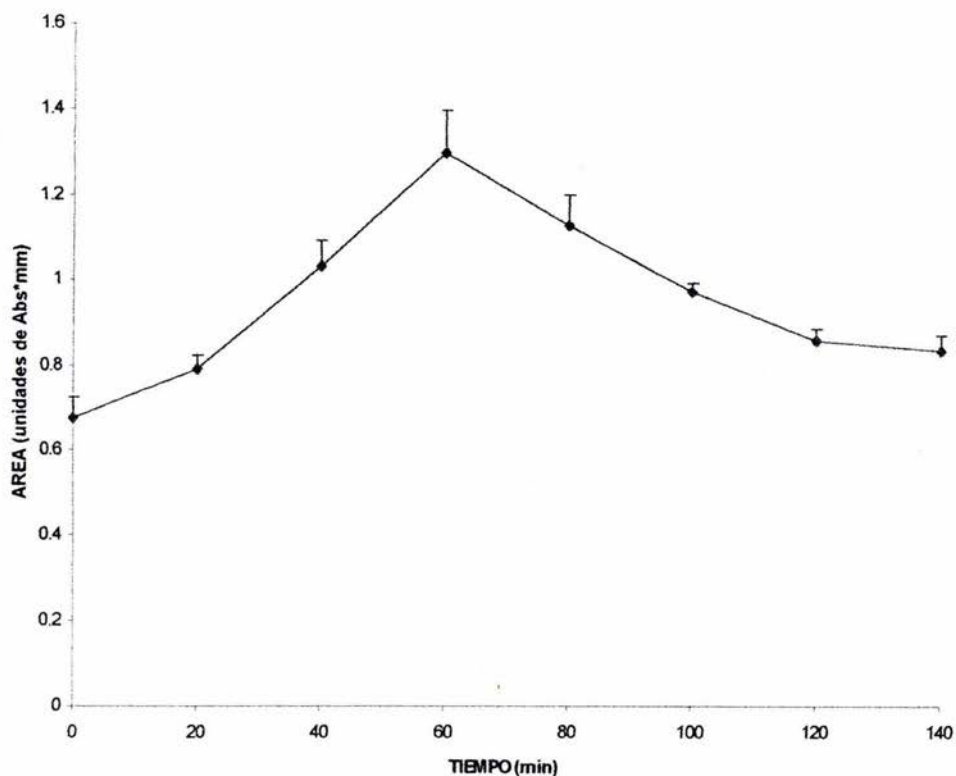
**Gráfico 1.** Actividades de paraoxonasa y arilesterasa medidas espectrofotométricamente en las muestras de plasma heparinizado, obtenidas después de la administración de HDL humanas. Los substratos utilizados fueron paraoxón para la actividad PON (nmol de p-nitrofenol/min/mL) y fenilacetato para la actividad ARE ( $\mu$ mol de fenilacetato hidrolizado/min/mL) en 20  $\mu$ L y 10  $\mu$ L de la muestra para PON y ARE respectivamente. Media  $\pm$  EE (n=11). \*P<0.05 vs T=0 min.



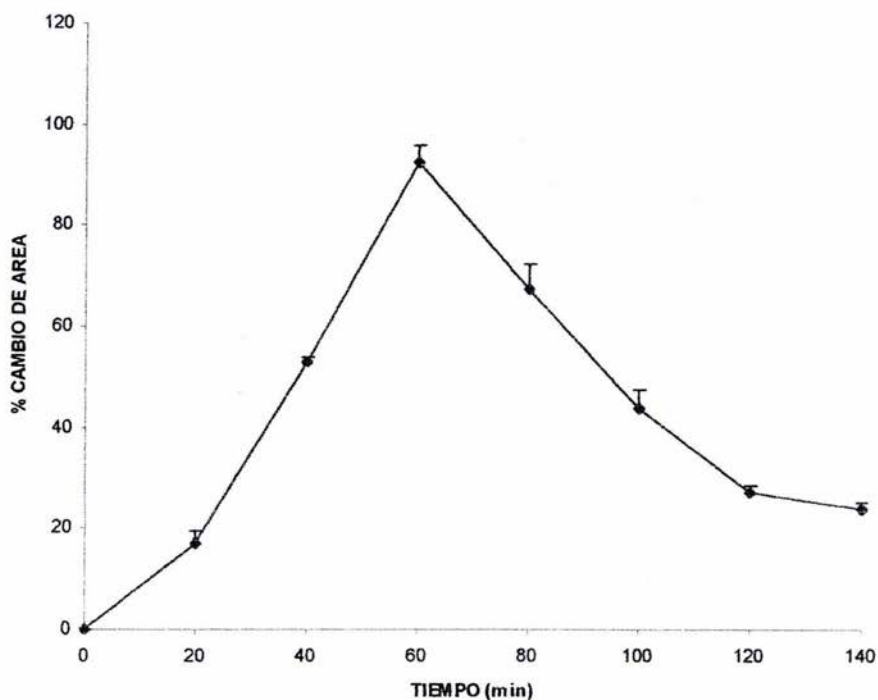
**Gráfico 2.** Porcentaje de cambio de las actividades PON y ARE. En función del tiempo después de la infusión. Datos presentados como Media  $\pm$  ER (n=11). \*P<0.05 vs T=0 min.



**Figura 9.** Electroforesis en gel de poliacrilamida de las proteínas. Se muestran las bandas plasmáticas de los sueros de las ratas en el gel que se reveló con paraoxón. Se observa que la banda se hace más intensa en las muestras correspondientes a los tiempos intermedios, también se observa que esta se extiende hacia tamaños más pequeños de HDL. El carril 1 muestra la actividad de las HDL humanas infundidas, los carriles 2 al 8 representan las muestras a los diferentes tiempos (basal --- 140 min). Los carriles 4 y 6 son los que presentan mayor intensidad de color y los que se extienden más hacia abajo, es decir, a tamaños más pequeños de HDL. Las líneas a un costado representan la referencia de posición del marcador de diámetro molecular (nm).

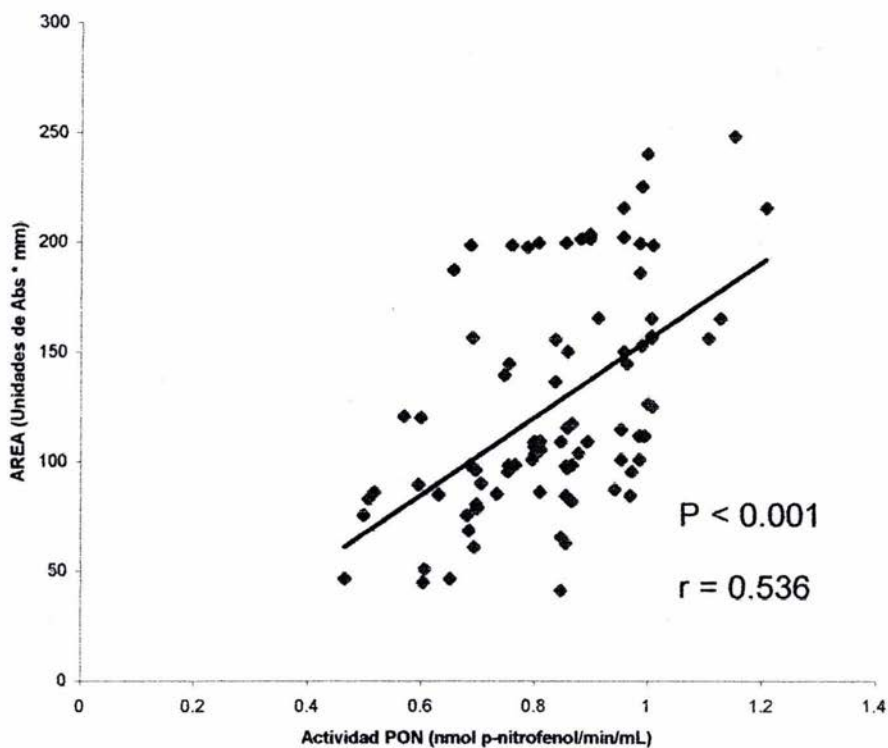


**Gráfico 3.** Densidad de color de las bandas de actividad paraoxonasa presente en las muestras de suero de rata después de la administración de HDL humanas. Los gels fueron cargados con 20  $\mu$ L de muestra de cada uno de los diferentes tiempos y revelados con paraoxón, generando bandas de color amarillo correspondientes a la formación de p-nitrofenol en las zonas dónde se encuentra la enzima. Las bandas fueron integradas para obtener las áreas bajo la curva usando un densitómetro. Los resultados son mostrados como media de las áreas de todos los animales analizados  $\pm$  error estándar (n=11). \*p<0.05 vs tiempo 0 minutos.



**Gráfico 4.** Porcentaje del incremento de la actividad relativa de la paraoxonasa presente en las muestras con respecto al área en el tiempo 0 minutos. Los datos se presentan como la media  $\pm$  el error estándar (n=11). \*p < 0.05 vs T= 0 min.

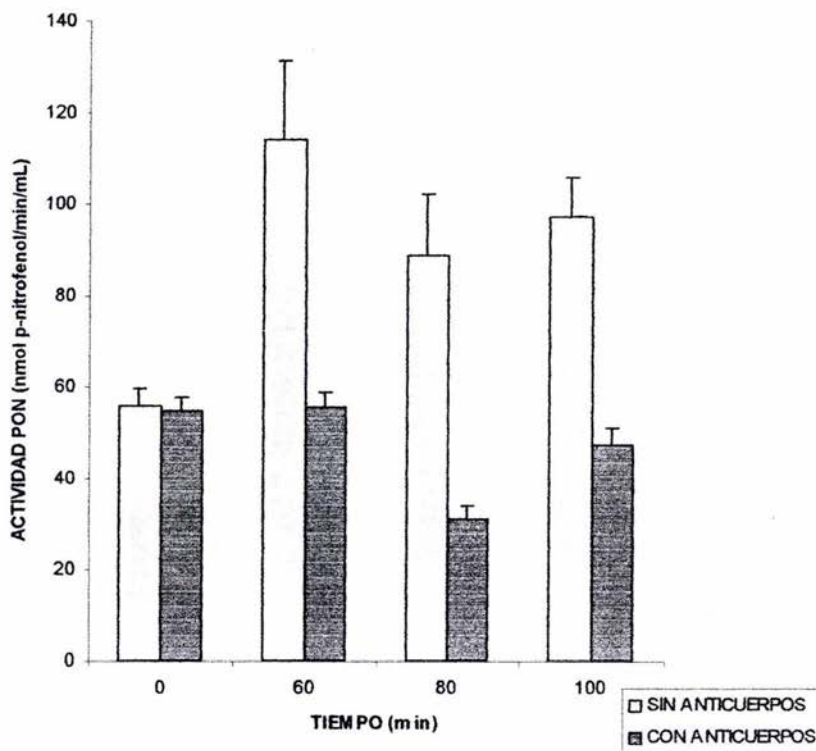




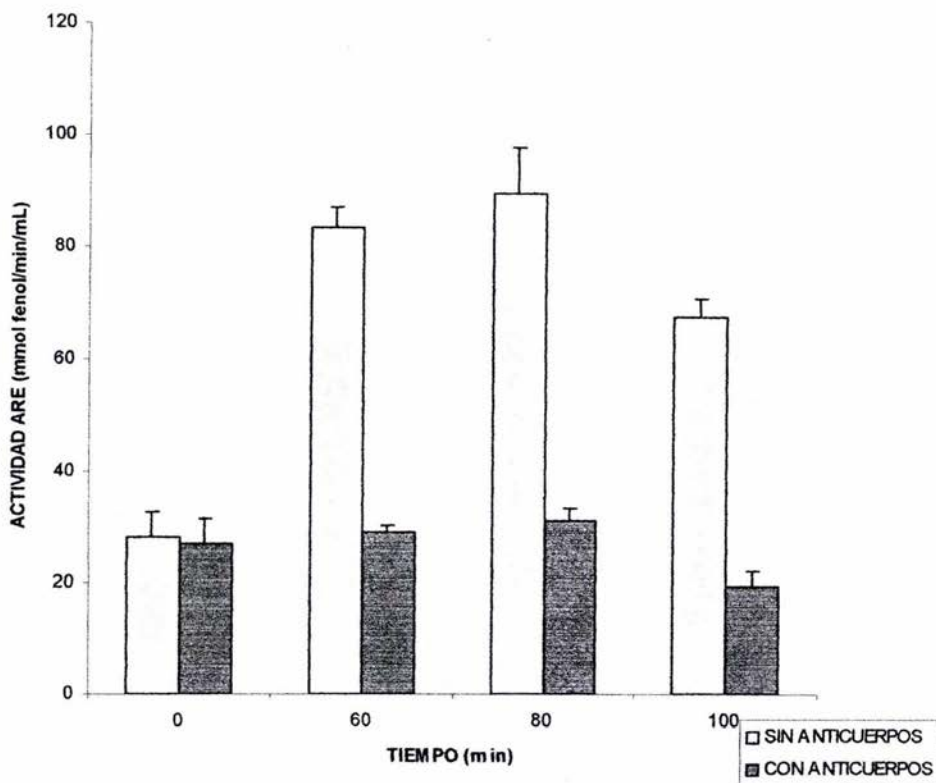
**Gráfico 5.** Análisis de correlación de Pearson según los datos presentados en el gráfico 1 Vs los datos presentados en el gráfico 3. El coeficiente de correlación de Pearson entre ambas técnicas es de 0.536 con una  $p < 0.001$ . Si bien la correlación no es buena, observamos en el gráfico que los datos presentan una tendencia similar en cada una de las dos técnicas.

Con el fin de determinar que el incremento en la captación de PON por medio de las mediciones de su actividad fuera debido a las HDL de origen humano infundidas, realizamos los mismos estudios de actividad enzimática con PON en una serie de muestras que fueron tratadas previamente con anticuerpos anti HDL humanas. Se emplearon las muestras de los tiempos que presentaron mayor actividad y los resultados son representados en el gráfico 6. Resultados similares se obtuvieron en las cinéticas ARE (Gráfico 7) y en la integración de las áreas en los geles de poliacrilamida de gradiente 4 – 30% (Gráfico 8).

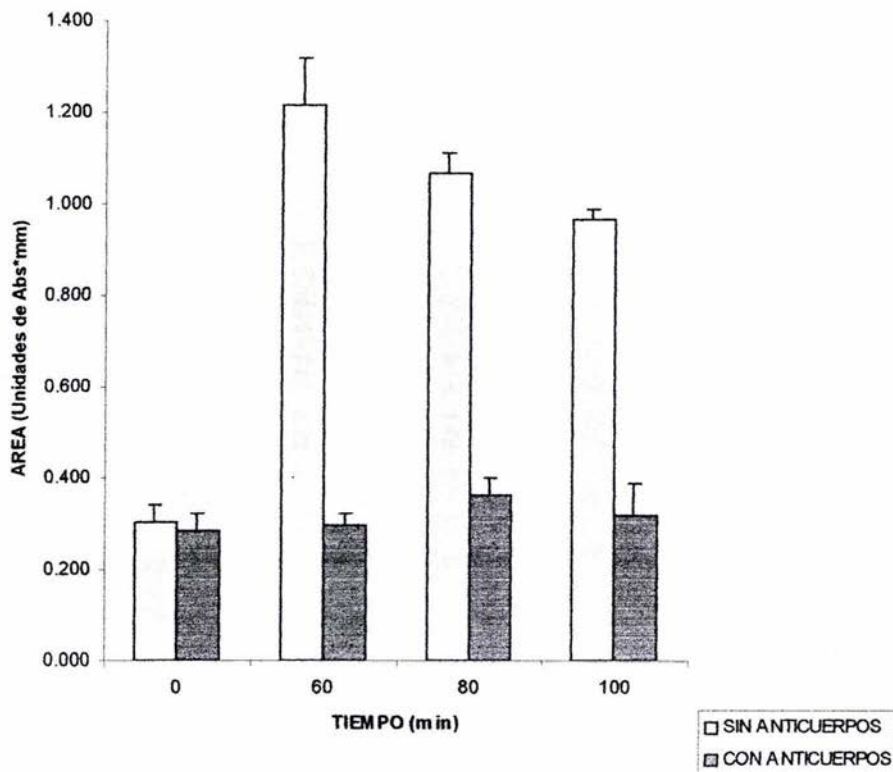
Los resultados de estos experimentos demuestran que el efecto de los anticuerpos anti-HDL humanas inhiben específicamente a las HDL humanas infundidas; generando una disminución en la actividad de las muestras que contenían anticuerpos. Con lo que demostramos que las HDL humanas infundidas son responsables del aumento en la actividad PON medida tanto en las cinéticas enzimáticas como en la actividad en gel.



**Gráfico 6.** Efecto de los anticuerpos anti-HDL humanas sobre la actividad PON en el plasma de las ratas. Se agregaron 100  $\mu$ L de anticuerpos anti-HDL humanas a las muestras de los tiempos con mayor actividad (60, 80 y 100 minutos) y se siguió el mismo protocolo de determinación para la actividad PON después de incubar a 37°C por una hora y centrifugar a 2500 RPM por 20 minutos. El tiempo cero es tomado como control. Los datos se muestran como media  $\pm$  ER (n=11). \*p<0.05 vs el mismo tiempo con anticuerpos.



**Gráfico 7.** Efecto de los anticuerpos anti-HDL humanas sobre la actividad ARE en el plasma de las ratas. Se agregaron 100  $\mu$ L de anticuerpos anti-HDL humanas a las muestras de los tiempos con mayor actividad (60, 80 y 100 minutos) y se siguió el mismo protocolo de determinación para la actividad ARE después de incubar a 37°C por una hora y centrifugar a 2500 RPM por 20 minutos, corrigiendo los resultados por la dilución. Los datos del tiempo cero son tomados como control. Los datos se muestran como media  $\pm$  ER (n=11). \*p<0.05 vs el mismo tiempo con anticuerpos.

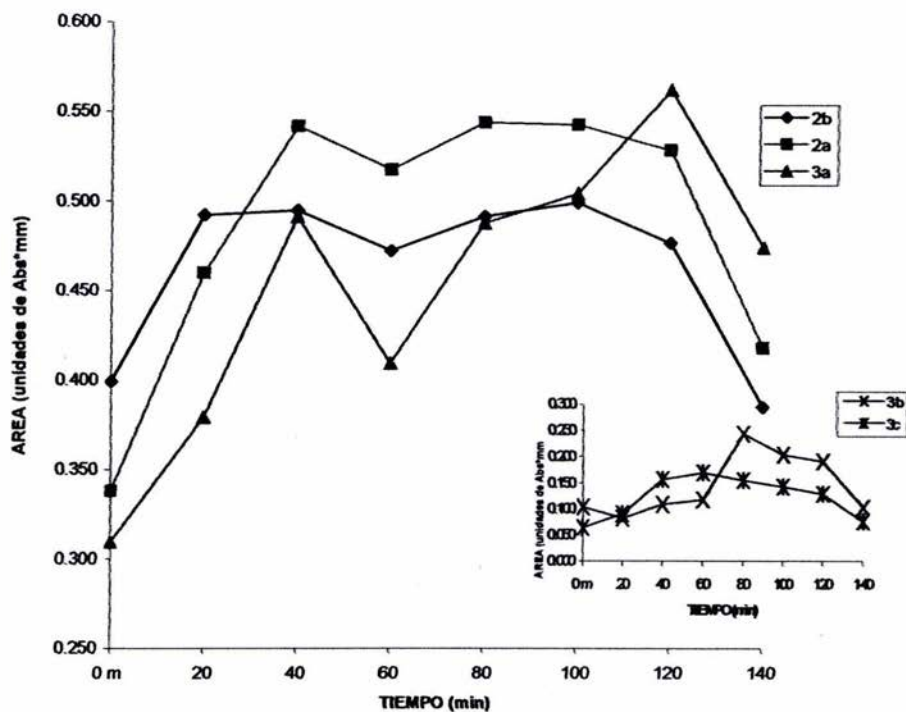


**Gráfico 8.** Efecto de los anticuerpos anti-HDL humanas en las áreas equivalentes a la cantidad de paraoxonasa presente en las muestras. Se muestran las actividades reveladas en PAGE de las mismas muestras presentadas en el gráfico 6. Se realizaron los geles tal como se realizaron para las muestras sin anticuerpos, agregando 100  $\mu$ L de anticuerpos a cada una de las muestras, corrigiendo los resultados por la dilución. Se tomó el tiempo cero como control. Se presentan como media $\pm$ (n=11). \*p<0.05 vs el correspondiente tiempo con anticuerpos.

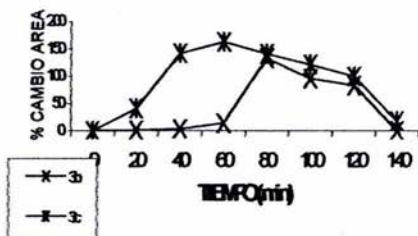
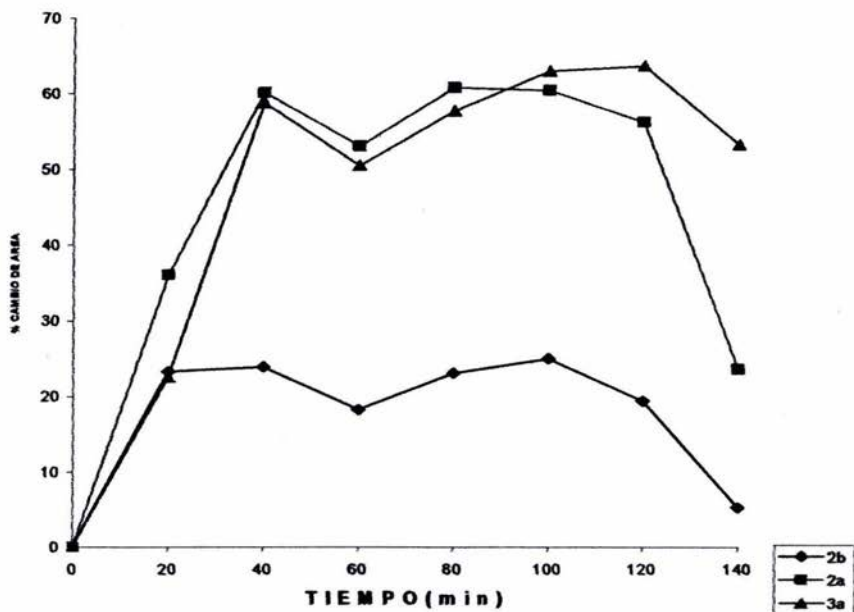
El abatimiento de la actividad PON en la cinética enzimática y la actividad revelada en gel resultó de 70 % y de 67 %, respectivamente. En el caso de la actividad ARE se encontraron resultados similares dando un porcentaje de abatimiento de la actividad del 62.5 %. Estos resultados nos permitieron demostrar que el comportamiento en ambos casos es el mismo.

Por último, con el objetivo de determinar la subfamilia que presenta una mayor captación de la PON y el comportamiento del resto de las subfamilias con el paso del tiempo se realizó el análisis densitométrico de las muestras en los geles de poliacrilamida en regiones ubicadas por medio de la distancia de migración en el gel correspondientes a los diferentes diámetros de partícula de cada una de las muestras, según se describe en la sección de métodos. Los resultados obtenidos del estudio de 11 ratas se resumen en el gráfico 9.





**Gráfico 9.** Comportamiento de las subfamilias de HDL en relación con la captación de la paraoxonasa. Se integraron las áreas de los geles de poliácridamida realizados (sin anticuerpos), siguiendo los tamaños en nm que se reportan en los antecedentes (Cuadro 2). Los datos se presentan como la media (n=11). En el recuadro inferior derecho se representan las subfamilias 3b y 3c, que representan menor proporción de la actividad PON.



**Gráfico 10.** Porcentaje de aumento relativo de las subfamilias de HDL en las muestras que se analizaron. Los datos se presentan como la media (n = 11). En el recuadro superior izquierdo se representan las subfamilias 3b y 3c, que presentan el mayor aumento relativo de la actividad PON asociada a las HDL infundidas con respecto a las otras tres subfamilias.

Nuestros resultados demuestran que el aumento del área equivalente a la PON asociada a las HDL se presenta con máximos a los tiempos de 60 y 80 minutos en las subfamilias más grandes (2b, 2a y 3a). La subfamilia 2a es la que mantiene un tiempo mayor los niveles altos de actividad PON, además de que nos indica que se presenta un decaimiento de la actividad PON a partir de los 120 minutos tanto en las subfamilias 2b y 2a. Sin embargo, en la subfamilia 3a a este tiempo aún se presenta un incremento y posteriormente a los 140 minutos comienza el decaimiento.

La actividad paraoxonasa asociada a las fracciones HDL3c y HDL 3b manifestó el incremento más notable (162 y 134 %, respectivamente) respecto a la actividad basal. Sin embargo, el comportamiento en el tiempo es diferente entre estas dos fracciones; mientras la fracción HDL 3c registró un incremento del 41% desde los primeros 20 minutos y alcanza su máximo a los 60 minutos después de la infusión de HDL, la fracción HDL3b aumenta súbitamente a los 80 minutos y decae inmediatamente después. Estos resultados sugieren una captación temprana de la paraoxonasa por parte de las HDL 3c y una remodelación de las HDL tardía en HDL3b.

## ***V. DISCUSIÓN***

**Faltan páginas**

**N° 53 a 56**

Tales resultados sugieren que los mejores aceptores naturales de paraoxonasa son las HDL pequeñas de tipo 3c, lo que se traduce en que esta es la subclase de HDL con la tensión de superficie apropiada para desorber la enzima de la membrana del hepatocito.

El metabolismo de las HDL implica una remodelación continua de estas lipoproteínas. Esta situación nos permite plantear que, una vez captada la paraoxonasa por las HDL pequeñas que funcionan como los aceptores primarios de la enzima, estas partículas aumentan de tamaño por efecto de la LCAT<sup>2</sup>, transformándose en partículas de mayor tamaño. Debido a que no hay un aporte continuo de HDL (infusión aguda), las partículas de mayor tamaño se acumulan en el plasma de rata que tiene una tendencia natural a formar HDL de tamaño medio a grande (12.9 nm)<sup>38</sup>. De esta manera se explica el aumento porcentual tan importante en la actividad PON asociada a las HDL pequeñas en los primeros tiempos después de la infusión de las HDL y por qué posteriormente la mayor parte de la actividad enzimática se encuentra asociada a las HDL de tamaño medio.

En resumen, nuestros resultados sugieren que, del total de partículas HDL humanas, los mejores aceptores primarios de la reserva de paraoxonasa son las HDL 2a, 3a y 3c, contrastando con las observaciones de otros grupos de investigación quienes proponen a las HDL de gran tamaño como los mejores aceptores de la enzima<sup>29</sup>. Esta aparente paradoja encuentra una explicación en el tipo de partículas empleadas en cada caso. Deakin y cols.<sup>29</sup>, utilizaron para sus experimentos HDL estructuradas únicamente con apo AI y fosfolípidos. Este tipo de complejos tienden a adoptar una estructura discoidal<sup>40</sup> y manifiestan características funcionales similares a las partículas pre  $\beta$ 1<sup>37</sup>. En consecuencia, las HDLr tienen tensiones de superficie diferentes a las HDL de forma esférica como las que utilizamos en el presente trabajo, que además contienen otro tipo de apolipoproteínas,



colesterol libre y esterificado, así como triglicéridos<sup>19, 20</sup>. Las diferencias estructurales justifican, a nuestro criterio, que no sean las HDL 2b (grandes) los mejores aceptores de paraoxonasa, como se esperaría en función de los reportes arriba descritos, sino las HDL pequeñas y medianas. Debido a que las HDL utilizadas en el presente trabajo son un mejor modelo de las estructuras que existen in vivo en comparación de las HDLr utilizadas por otros grupos, podemos afirmar que las HDL pequeñas y medianas son más funcionales en lo que corresponde a la capacidad de desorber paraoxonasa.

Utilizando como fundamento racional las propiedades de promover el eflujo de colesterol, antiinflamatorias<sup>24</sup>, antitrombóticas, profibrinolíticas<sup>12</sup> y antioxidantes (que se exploran en este trabajo) de las HDL, algunos autores han intentado el tratamiento de la etapa aguda del infarto de miocardio con HDLr. Este tipo de intervención tiene efectos agudos importantes, entre otros, disminuye la aterotrombosis<sup>27</sup>, evita la restenosis en stents coronarios<sup>39</sup> y contribuye a estabilizar las placas aterosclerosas<sup>12</sup>. De acuerdo a nuestros resultados, algunos de estos efectos benéficos obtenidos con la terapia con HDL, pueden tener su fundamento en un aumento en la cantidad de paraoxonasa que alcanza el sitio donde se desarrolla el ateroma. Creemos que sólo la paraoxonasa ligada a la HDL puede ser vectorizada al espacio subendotelial en donde tiene sus verdaderos efectos antiaterogénicos. En este sentido, demostramos que no existe una correlación importante entre la actividad plasmática de paraoxonasa y la cantidad de complejos HDL-PON, de tal suerte que la cantidad de complejos no necesariamente está representada por la actividad paraoxonasa medida en plasma.

Esta propuesta puede contribuir a conciliar algunas observaciones contradictorias acerca del papel protector de la paraoxonasa: mientras en algunos estudios se ha encontrado una importante relación entre el polimorfismo de la PON<sup>25</sup>, así como de su actividad<sup>25</sup>, con el

desarrollo del ateroma, otros estudios no encontraron tal relación. Si el complejo HDL-PON es el que posee el papel antiaterogénico, y si a mismas actividades plasmáticas de paraoxonasa la cantidad de complejos HDL-enzima es variable, entonces no necesariamente se puede poner de manifiesto la relación aterosclerosis-paraoxonasa. La cuantificación de los complejos como se ha realizado en este trabajo, en diferentes situaciones clínicas de riesgo de aterosclerosis, contribuirá a validar la importancia de la asociación enzima-lipoproteína.

Existen dos vertientes de opinión acerca del tipo de HDL que son más protectoras en términos de aterosclerosis. Mientras una de las tendencias de opinión, promueve a la fracción HDL2 como protectora, la otra propone que las partículas pequeñas HDL3 son la fracción protectora. La primera se fundamenta en los resultados de estudios epidemiológicos que demuestran que el C-HDL2 (las HDL grandes) tiene una relación inversa muy importante con el riesgo relativo de desarrollar aterosclerosis<sup>29</sup>, mientras que la segunda se apoya en las evidencias experimentales que demuestran que las HDL pequeñas son los mejores aceptores de colesterol. En este ámbito, el presente trabajo de investigación aporta más elementos a la segunda vertiente, ya que nuestros resultados ponen de manifiesto la capacidad para reclutar paraoxonasa que tienen las partículas HDL pequeñas. Por último, es muy probable que en el futuro no se siga estimando el número de partículas HDL que existen en plasma por medio de la cantidad de colesterol que contienen. En su lugar, probablemente se determine la funcionalidad de las HDL y en particular, el papel antioxidante de las HDL se podrá estimar a través de procedimientos similares a los desarrollados en el presente trabajo.

## **VI. CONCLUSIONES**

Nuestros datos apoyan la existencia de una reserva de paraoxonasa en el organismo de nuestro modelo animal que puede ser desorbida por la infusión aguda de HDL de origen humano.

El efecto máximo de la desorción, medido como actividad enzimática en plasma o actividad paraoxonasa asociada a las HDL plasmáticas, se observó a los 60-80 minutos después de la infusión de HDL.

Los incrementos de actividad paraoxonasa inducidos por la infusión aguda de HDL son transitorios y se mantienen durante aproximadamente 40 min.

La actividad paraoxonasa medida en plasma correlaciona pobremente con la actividad paraoxonasa asociada a las HDL, sugiriendo que existe una fracción circulante, libre o ligada a otras lipoproteínas y de cantidad variable.

Nuestros resultados sugieren que los primeros aceptores de paraoxonasa son las partículas HDL de tamaño pequeño tipo 3c. Sin embargo, la mayor cantidad de paraoxonasa ligada a las HDL se encuentra en las subclases 2a y 3a, probablemente por interconversión metabólica de los aceptores primarios a partículas de mayor tamaño.

## ***VII. BIBLIOGRAFÍA***

1. Ross R. (1993); *The pathogenesis of atherosclerosis; a perspective for the 1990's.* Nature 362: 801 – 809.
2. Luis AJ. (200); *Atherosclerosis.* Nature 407: 233 – 241.
3. Pober Js, Cotran RC. (1990); *Cytokines and endothelial cell biology.* Physiol Rev 70: 427 – 451.
4. Davies PF, Tripathi SC. (1993); *Mechanical stress mechanisms and the cell; and endothelial paradigm (Mini Review).* Cis Res 72: 239 – 244.
5. Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Juegens G. (1992); *The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL.* Free Radic Biol Med 13: 341 – 390.
6. Guadalajara BFJ. (1996); *Cardiología.* Ed. Médica Panamericana; México D.F; 801 – 824.
7. Morel DW, DiCorleto PE, Chisolm GM. (1984); *Endothelial and smooth muscle cells alter low-density lipoproteins in vitro by free radical oxidation.* Atherosclerosis 4: 357 – 364.
8. Parthasarathy S, Printz DJ, Boyd D, Joy L, Steinberg D. (1986); *Macrophage oxidation of low density lipoprotein generates a form recognized by the scavenger receptor.* Atherosclerosis 6: 505 –510.



9. Quinn MT, Parthasarathy S, Fong LG, Steinberg D. (1987); *Oxidatively modified low density lipoproteins; A potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherogenesis.* Proc Natl Acad Sci USA 84: 2995 – 2998.
10. Gotto AM, Ponnall HJ, Havel RJ. (1986); *Introduction to the plasma lipoproteins.* Methods Enzymol 128: 341.
11. Von Eckardstein A, Huang Y, Assman G. (1994); *Physiological role and clinical relevance of high density lipoproteins subclasses.* Current Opinion in Lipidology 5: 404 – 416.
12. Phillips MC, Rothblat GH. (1997); *HDL and cholesterol efflux.* Atherosclerosis 134: 114.
13. Parra HJ, Arveiler D, Evans AE, Cambou JP, Amouye P, Bingham A, McMaster D, Schaffer P, Douste-Blazy P, Luc G, et al. (1992); *A case-control study of lipoprotein particles in two populations at contrasting risk for coronary heart disease. The ECTIN study.* Atheroscler Thromb 12: 701 – 707.
14. Krieger M. (1998); *The “best” of cholesterol, the “worst” of cholesterol: a tale of two receptors.* Proc Natl Acad Sci USA 95: 4077 – 4080.
15. Tall AR. (1990); *Plasma high density lipoproteins. Metabolism and relationship to atherogenesis.* J. Clin. Invest. 86: 379 – 384.



16. Loy S, Simón R, Delgado R. (2002); *Vimang, un potencial protector de la peroxidación lipídica en lipoproteínas de baja densidad.* Rev. Cubana Invest Biomed 21 (3): 167 – 170.
17. Sánchez F. (2000), *Patología molecular de las HDL.* Ars Pharmaceutica 41:1: 59 –65.
18. Fernandez-Brito JE, Castillo JA, Taquechel N, Barriuso A, Vilaú F. (1999); *Aterosclerosis, colesterol y pared arterial: algunas reflexiones.* Rev Cubana Invest Biomed 18 (3): 169 – 175.
19. Pérez-Méndez O. y Huesca GC (2002); *El papel antiaterogénico de la paraoxonasa*  
*I.*Revista de Educación Bioquímica 21: 245 – 251.
20. Pérez-Méndez O, Luc G, Posadas-Romero C. (2000); *Concentraciones bajas de lipoproteínas de alta densidad (HDL) en plasma y enfermedad arterial coronaria.* Arch Inst Cardiol Mex 70: 312 – 321.
21. Aviram M, Roseblat M, Bisgaier LC, Newton SR, Primo –Parmo LS, y La Du NB (1998) *Paraoxonase inhibits high density lipoproteins oxidation and preserve its function.*  
*A possible peroxidative role for paraoxonase.* J. Clin. Invest 101: 1581 – 1590.
22. Furlong EG, Richter JR, Chapline C y Crabb WJ (1991) *Purification of rabbit and human serum paraoxonase.* Biochemistry 30: 10132 – 10140.

23. Deakin S, Leviev I, Gomaschi M, Calabresi L, Franceschini G y James RW (2002) 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 277: 4301 – 4308.
24. Durrington PN, Mackness B y Mackness MI (2001) Paraoxonase and atherosclerosis. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. Abril 2001: 473 – 480.
25. Eckerson WH, Wyte MC y La Du NB. (1983) The human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism. Am. J. Hum. Genet. 35:1126 – 1138.
26. Aviram M, Billecke S, Sorenson R, Bisgaier Ch. Newton R, Rosenblat M, Eroglu J, Hsu C, Dunlop C y La Du B. (1998) Paraoxonase active site required for protection against LDL oxidation involves its free sulfhydryl group and is different from that requires for its arylesterase/paraoxonase activities. Selective action of human paraoxonase allozymes Q and R. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 18: 1617 – 1624.
27. von Eckardstein A, Nofer NJ y Assmann G. (2000) High density lipoproteins and arteriosclerosis. Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. Enero 2001: 13 – 27.

28. Beltowski J, Wójcicki G y Marciniak A. (2002) Species and substrate-specific stimulation of human plasma paraoxonase 1 (PON1) activity by high chloride concentration. Acta Biochimica Polonica. 49: 927 – 936.
29. Newton RS, Krause BR. (2002); HDL therapy for the acute treatment of atherosclerosis. Atherosclerosis Supplements 3: 31- 38.
30. Josse D, Ebel Ch, Stroebel D, Fontaine A, Borges F (2002) Oligomeric states of the detergent-solubilized human serum paraoxonase (PON1). J. Biol. Chem. 277: 33386 – 33397.
31. Aviram M. (1999) Does paraoxonase play a role in susceptibility to cardiovascular disease?. Molecular Medicine Today. 5: 381 – 386.
32. Navarro RJ. (1999) Problemática de la aterosclerosis en México. Revista Mexicana de Cardiología. 10: 59 – 63.
33. Sorenson RC, Bisgaier CL, Aviram M, Hsu C, Billecke S, La Du BN. (1999); Human serum paraoxonase/arylesterase's retained hydrophobic N-terminal leader sequence associates with HDLs by binding phospholipids. Apolipoprotein A-I stabilizes activity. Arterioscler Thromb Vasc Biol 19: 2214 – 2225.
34. Torzewski J, Oldroyd R, Lachman P, Fitzimmons C, Proudfoot D, Bowyer D. (1996); Complement-induced release of lesion formation. Arterioscler Thromb Vasc Biol 16: 673 – 677.

35. Skinner E. R. (1994); High-density lipoprotein subclasses. *Current Opinion in Lipidology*; 5: 241 – 247.
36. Leviev I, Deakin S. And James R.W. (2001); Decreased stability of the M54 isoform of paraoxonase as a contributory factor to variations in human serum paraoxonase concentrations *J. Lipid Res.* 42: 538 – 535.
37. Muriel Bouly, David Masson, Barbara Gross, Xian-cheng Jiang, Catherine Fievet, Graciela Castro, Alan R. Tall, Jean-Charles Fruchart, Bart Staels, Laurent Lagrost, and Gérald Luc. (2001); Induction of the Phospholipid Transfer Protein Gene Accounts for the High Density Lipoprotein Enlargement in Mice Treated with Fenofibrate; *J. Biol. Chem.*; 276: 25841 - 25847.
38. Claudia Huesca-Gomez, Martha Franco, Gerald Luc, Luis F. Montao, Felipe Mass, Carlos Posadas-Romero and Oscar Perez-Mendez (2002); Chronic hypothyroidism induces abnormal structure of high-density lipoproteins and impaired kinetics of apolipoprotein A-I in the rat; 51 (4):443 – 450.
39. Kaul S, Rukshin V, Santos R, Azarbal B, Bisgaier CL, Johansson J, Tsang VT, Chyu KY, Cercek B, Mirocha J, Shah PK (2003): Intramural delivery of recombinant apolipoprotein A-I<sub>Milano</sub>/phospholipid complex (ETC-216) inhibits in-stent stenosis in porcine coronary arteries. *Circulation*; 107: 2551-2554.

40. Brasseur R, Pillot T, Lins L, Vandekerckhove J, Rosseneu M. (1997): Peptides in membranes: tipping the balance of membrane stability. Trends Biochem Sci. May;22(5):167-71.

ESTA TESIS NO SALI  
DE LA BIBLIOTECA

## **VIII. ANEXOS**

## ANEXO A

### ULTRACENTRIFUGACIÓN

Preparación de soluciones empleadas.

Todas las soluciones contienen 0.1g/L de EDTA pH 7.4

d= 1.063            KBr    94.26 g    +    1 litro de agua destilada

d= 1.210            KBr    337.36 g    +    1 litro de agua destilada

d= 1.250            KBr    409.84 g    +    1 litro de agua destilada

d= 1.340            KBr    584.27 g    +    1 litro de agua destilada

Pasar un plasma de una densidad **d1** a una densidad **d2** (**d1<d2**)

Por adición de KBr sólido (densidad del plasma 1.006)

$$\text{g KBr} = \frac{\text{Vol. inicial} (\text{d final} - \text{d inicial})}{1 - (\text{d final} \times 0.312)}$$

Pasar un plasma de densidad **d1** a una densidad **d2** (**d1<d2**)

$$\text{Vol. solución diluyente} = \frac{\text{Vol. solución} (\text{d deseada} - \text{d solución})}{\text{d sol diluyente} - \text{d deseada}}$$



**DENSIDAD**

Quilomicrones	$d < 0.96$		
VLDL	$0.960 < d < 1.006$	HDL3	$1.125 < d$
< 1.210			
IDL	$1.0060 < d < 1.019$	Lp (a)	$1.050 < d$
< 1.120			
LDL <sub>t</sub>	$1.019 < d < 1.063$	VHDL	$1.210 < d$
< 1.25			
HDL2	$1.063 < d < 1.125$	LPDS	$d > 1.250$

## ANEXO B

### DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS

#### (MÉTODOD DE LOWRY)

Solución A (preparar al momento de usar)

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1 volumen
Tartrato de Na y K	1 volumen
NaOH	2 volúmenes
SDS (Dodecil sulfato de sodio)	2 volúmenes
H <sub>2</sub> O (destilada)	2 volúmenes

#### CURVA PATRÓN

TUBO	1	2	3	4	5	6	Muestra	
Muestra (μL)	---	---	---	---	---	---	---	20
Estándar (μL)	---	20	40	60	80	100	---	---
H <sub>2</sub> O (μL)	100	80	60	40	20	---	---	80

#### VORTEX

Solución A (mL)	1	1	1	1	1	1	1	1
-----------------	---	---	---	---	---	---	---	---

INCUBAR 10 MINUTOS EN OSCURIDAD A T. Amb.

Reactivo de Folin	500	500	500	500	500	500	500	500
-------------------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

(1/6) (μL)

INCUBAR 30 MINUTOS EN OSCURIDAD A T. amb.

LEER A 750 nm.

## ANEXO C

### ELECTROFORESIS EN GEL NATIVO

#### TAMAÑOS DE HDL

	4%	30%
	5mL	5 mL
<b>TBE</b>	0.5mL	0.5mL
<b>SOL. B</b>	400 $\mu$ L	3 mL
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> destilada</b>	4.1mL	750 $\mu$ L
<b>GLICEROL</b>	---	750 $\mu$ L
<b>TEMED</b>	4 $\mu$ L	4 $\mu$ L
<b>SOL. D</b>	20 $\mu$ L	20 $\mu$ L

Depositar 20 $\mu$ g de proteina/ 1 $\mu$ L de buffer de muestra.

- 1) Migrar 15 min. a 20V( para concentrar las muestras)
- 2) Migrar 15 min. a 70V (para que entren las muestras al gel)
- 3) Migrar a 24 h a 140V

22h a 150V.

#### **Buffer de muestra**

Sacarosa 50%

Azul de bromofenol al 0.05%

Cbp 20 mL

**Buffer de corrida TRIS-BORATO**

Tris 0.09 M	10.9g	} cbp 1 litro
Ácido Bórico 0.08M	4.95g	
EDTA 3mM	1.12g	

pH 8.35

## ANEXO D

### DETERMINACIÓN DE PARAOXONASA EN MUESTRAS DE RATA

Se necesita muestra de suero para poder llevar a acabo la determinación.

#### BUFFERS

##### 1. PON

Buffer	Glicina-NaOH	50 mM	0.375g	100 mL	
	CaCl <sub>2</sub>	1.0 mM	0.011g	100mL	cbp 100 mL

pH = 10

##### 2. Buffer ARE

Buffer	Tris-HCl	20 mM	0.31512 g	
	CaCl <sub>2</sub>	0.9 mM	0.010 g	cbp 100 mL

pH= 8

#### PREPARACION DE LOS SUSTRATOS ( Prepararse al momento de realizar la determinación)

##### 1) Sustrato de paraoxonasa.

En 10 mL de buffer PON agregar 3 $\mu$ L de Dietil p-nitrofenil fosfato y dejar reposar 30 minutos.

##### 2) Sustrato de arilesterasa

En 10 mL de buffer ARE agregar 1.27  $\mu$ L de fenilacetato y dejar reposar 15 minutos.

#### DETERMINACION DE ACTIVIDADES

Para PON la muestra se trabaja sin dilución.

##### Actividad de paraoxonasa basal

Diluir 25 $\mu$ L de la muestra en 1 mL de sustrato PON

Mezclar y esperar 1 minuto

Seguir la cinética c/30 seg. por 3 minutos a 412 nm.

##### Actividad arilesterasa

Diluir a la  $\frac{1}{2}$  la muestras en buffer ARE.

Diluir 10 $\mu$ L de la muestra en 1 mL de sustrato ARE

Mezclar y esperar 1 minuto

Seguir la cinética c/30 seg. por 5 minutos a 270 nm.

### **CALCULOS DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA**

1) Actividad paraoxonasa ( nmol p-nitrofenol/min./mL suero)

$\epsilon$  paraoxón =  $18\,290\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

Actividad =  $(\Delta DO / \epsilon) \times 10^6 \times 50 \times \text{dilución}$

2) Actividad arilesterasa ( $\mu\text{mol}$  fenilacetato hidrolasa/min./mL suero)

$\epsilon$  fenilacetato =  $1310\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

Actividad =  $(\Delta DO / \epsilon) \times 10^3 \times 100 \times \text{dilución}$