



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Asociación de los SNPs 192 Q/R y 55 L/M del Gen
PON1 con el Perfil de Lípidos y la Concentración
de Ácido Úrico en Niños Eutróficos y Obesos.

TESIS

Que para obtener el título de

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGICO

P R E S E N T A

Hernández López Miguel Ángel

DIRECTOR DE TESIS

DRA. Rebeca García Macedo

ASESOR: QFB Patricia Vidal Millán.



**FES
ZARAGOZA**

México CDMX. Marzo, 2017



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.

Este trabajo fue realizado en la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social.

El trabajo de investigación fue apoyado por el Fondo de Investigación en Salud (FIS) FIS/IMSS/PROT/E15/1479.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México: Por arroparme en sus brazos durante mi desarrollo como profesionista y como ser humano.

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza: Por otorgarme los conocimientos y valores para poder terminar mis estudios universitarios.

A la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica del Hospital de Especialidades "DR. BERNARDO SEPULVEDA G." CMN S. XXI: Por brindarme el apoyo y las facilidades para desarrollar este trabajo en un ambiente lleno de calidez y compañerismo.

A la Dra. Rebeca García Macedo: Por creer en mí, darme su confianza, apoyo, así como las observaciones necesarias para la realización de este trabajo bajo su tutela y aprecio.

A la QFB Patricia Vidal Millán: Por ser de los mejores profesores que tuve durante la licenciatura y brindarme su apoyo y conocimientos académicos para lograr culminar de este trabajo.

A la M. en C. Martha Sánchez, al M. en C. Rafael Mondragón, al Dr. en C. Fernando Suarez y al D. en C. Miguel Klünder Klünder: Por brindarme su tiempo, experiencia, apoyo y conocimientos para poder terminar este trabajo.

Dedicatoria.

“Sé firme como una torre, cuya cúspide no se doblega jamás al embate de los tiempos”

-Dante Alighieri.

Este trabajo va dedicado a mis padres Miguel Ángel Hernández Arias y Lorena López Ramos por brindarme el cariño, amor y los recursos tanto económicos y morales para poder culminar esta gran meta. A mis hermanas Lorena Guadalupe Hernández López y Karla Madelyn Hernández López por darme su apoyo cuando era necesario en todos los sentidos, gracias por orientarme hacia un mejor futuro para mí. A mis sobrinos, mis tíos y a mis abuelos Gloria Ramos Aguilar, Maurilio López Cruz y muy especialmente a mi abuelo Abel Hernández Bonilla quien falleció antes de poder ver culminado este proyecto tan importante en mi vida. También a mis amigos Silvia Berenice Castellanos (kiki), Miguel Ángel Sandoval, Miguel Ángel Bandera, Raúl Barzalobre, Enrique León, Alejandro Fuerte, Silvia Ventura, Elizabeth, Miriam, Ángeles, Ema, David, Sergio, Saraí, Maricarmen, Osiris, la doctora Clara, la doctora Margarita y a todos los demás de mis amigos y compañeros del hospital que me apoyaron en mi estancia en el hospital durante la realización de este trabajo.

A todos ustedes mis más grandes agradecimientos, nunca me dejaron solo y con su cariño, apoyo y afecto juntos logramos esta meta.

Contenido	Página.
1 Índice de tablas y figuras	7
2 Abreviaturas	9
3 Resumen	10
4 Introducción	12
5 Marco teórico	
5.1 Obesidad infantil y Síndrome metabólico	13
5.2 Radicales libres y Estrés oxidativo	17
5.3 Sistemas antioxidantes	18
5.4 Enzima Paraoxanasa (PON1)	20
5.5 Estructura de la Paraoxonasa	21
5.6 Actividad de PON1	22
5.7 Sustratos de PON1	23
5.8 Efectos antiaterogénicos de la PON1	24
5.9 Aterosclerosis e Índice aterogénico	25
5.10 Moduladores de la actividad de PON1	26
5.11 Polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs)	27
5.12 Polimorfismos genéticos de PON1	29
5.13 Ácido úrico y su relación con la obesidad	30
5.14 ADN, alteraciones y métodos de extracción	34
5.15 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	37
5.15.1 PCR en tiempo real	39
5.16 Equilibrio Hardy-Weinberg	43
5.17 Electroforesis de Ácidos nucleicos	45
5.18 Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA)	45
6 Planteamiento del problema	47
7 Hipótesis	48
8 Objetivos	
8.1 General	48
8.2 Particular	48
9 Metodología	
9.1 Tipo de estudio	49
9.2 Universo de estudio	49
9.3 Criterios de inclusión	49

9.4	Criterios de no inclusión	49
9.5	Criterios de eliminación	49
9.6	Obtención de muestras para los estudios bioquímicos	49
9.7	Clasificación de niños Eutróficos y obesos	50
9.8	Definición del perfil bioquímico	50
9.9	Determinación de química sanguínea	50
9.10	Extracción de ADN genómico	51
9.11	Genotipificación de los polimorfismos del Gen PON1	51
9.12	Electroforesis en geles de agarosa	53
9.13	Cuantificación de LDLox por ELISA	54
9.14	Actividad Enzimática PON/ARE	55
9.15	Análisis estadístico	55
9.16	Aspectos Éticos	55
10	Resultados	
10.1	Parámetros antropométricos y bioquímicos en niños eutróficos y obesos	56
10.2	Ácido úrico, LDLox e índice aterogénico	57
10.3	Genotipificación de los polimorfismos del Gen PON1	57
10.4	Asociación entre los SNPs de PON1 con los parámetros físicos, bioquímicos y con las actividades enzimáticas	60
10.5	Asociación de los Genotipos de PON1 con las actividades enzimáticas	62
11	Discusión	65
12	Conclusiones	69
13	Perspectivas	70
14	Anexos	70
15	Referencias	71

1. Índice de Tablas	Página
Tabla 1. Clasificación de obesidad según IMC emitido por OMS	13
Tabla 2. Valores normales de ácido úrico en población mexicana	30
Tabla 3. Resultado de la búsqueda de SNPs en PON1	51
Tabla 4. Condiciones de PCR empleadas para el ensayo	53
Tabla 5. Procedimiento para realizar electroforesis en geles de agarosa	53
Tabla 6. Resultados de las mediciones físicas, químicas y antropométricas realizadas en los niños eutróficos y obesos	56
Tabla 7. Resultados de la cuantificación de Ácido Úrico, LDLox y su relación con la predisposición con aterosclerosis	57
Tabla 8. Frecuencias obtenidas para los SNP 192 Q/R y 55 L/M	57
Tabla 9. Frecuencia de alelos después de la discriminación alélica por PCR-RT	59
Tabla 10. Resultados de las mediciones físicas, químicas, enzimáticas y antropométricas realizadas en los niños eutróficos y obesos en relación con la presencia de los SNPs estudiados	61
Índice de Figuras	
Figura 1. Transformación estructural de una LDL nativa	20
Figura 2. Estructura general de PON1	21
Figura 3. Sitios activos de la PON1	22
Figura 4. Actividad arilesterasa de la Paraoxonasa	23
Figura 5. Participación de PON1 en el transporte de colesterol	23
Figura 6. Peroxidación de los fosfolípidos y su inactivación por sistema paraoxonasa	24
Figura 7. Formación de la placa de aterosclerosis y el efecto protector de PON	25
Figura 8. Moduladores de la actividad de PON1	27
Figura 9. Representación de un SNP	28
Figura 10. Polimorfismos genéticos de PON1	29
Figura 11. Vía para la degradación del AMP a Ácido Úrico	31
Figura 12. Degradación de nucleótidos y purinas de la dieta y consecuencias clínicas de hiperuricemia	32

Figura 13. Efecto antioxidante del ácido úrico en la oxidación de LDL inducida por Cu ²⁺	33
Figura 14. Efecto antioxidante y pro-oxidante del Ácido Úrico	33
Figura 15. Extracción de ADN con reactivo TriPure®	35
Figura 16. Extracción de ADN con QIAGEN FlexiGene® DNA AGF 3000	37
Figura 17. Ensayo de PCR de punto final	39
Figura 18. Ensayo de PCR en tiempo real con sondas fluorescentes	40
Figura 19. Productos específicos de amplificación por PCR	43
Figura 20. Representación gráfica del equilibrio de Hardy-Weinberg	44
Figura 21. Esquema de corrimiento electroforético de ácidos nucleicos en gel de agarosa	45
Figura 22. Equipo Instrumentation Laboratory 650	50
Figura 23. Equipo ABI Prism 7900HT utilizado para la PCR en tiempo real y la genotipificación del ensayo	52
Figura 24. Diagrama de preparación para corrimiento de polimorfismos por PCR-RT	52
Figura 25. Protocolo para cuantificación de LDLox	54
Figura 26. Corrimiento electroforético del SNP 192 Q/R	58
Figura 27. Corrimiento electroforético del SNP 55 L/M	59
Figura 28. Actividad Paraoxonasa con genotipo 192 Q/R en Eutróficos y Obesos.	62
Figura 29. Actividad Arilesterasa con genotipo 192 Q/R en Eutróficos y Obesos	63
Figura 30. Actividad Paraoxonasa con genotipo 55 L/M en Eutróficos y Obesos	63
Figura 31. Actividad Arilesterasa con genotipo 55 L/M en Eutróficos y Obesos	64

2. Abreviaturas.

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AMPK: Cinasa dependiente de AMP

Anti LDLox: Anticuerpos séricos contra LDL oxidada

Apo A-I: Apolipoproteínas A1

Apo E: Apolipoproteína E

Apo J: Apolipoprotína J

ATP: Adenosina trifosfato

CAT: Catalasa

DMAE: Degeneración Macular Asociada con la Edad

ECV: Enfermedad cardiovascular

ELISA: Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima, por sus siglas en inglés

ERO: Especie reactiva del oxígeno

FRET: Fluorescent Resonant Energy Transfer, por sus siglas en inglés

HDL: lipoproteínas de alta densidad

HOMA-IR: Homeostatic Model Assesment of Insuline Resistance. Por sus siglas en inglés

IA: Índice aterogénico

IM: Infarto de Miocardio

IMC: Índice de masa corporal

Kg: Kilogramos

KHK: Cetohehexocinasa

L: Aminoácido Leucina

LDL: Lipoproteínas de baja densidad

LDLox: Lipoproteínas de baja densidad oxidadas

M: Aminoácido Metionina

m²: Metro al cuadrado

MAPK: Cinasa regulada por mitógeno

NO: Óxido nítrico

OMS: Organización mundial de la salud

PCR-RT: Reacción de la polimerasa en cadena en tiempo real

PMN: Leucocitos polimorfonucleras

PON1: Paraoxonasa 1

Q: Aminoácido Glutamina

R: Aminoácido Arginina

RI: Resistencia la insulina

RIA: Radio inmuno ensayo

RL: Radicales libres

RNA: Ácido ribonucleico

RNA_m: Ácido ribonucleico mensajero

SM: Síndrome metabólico

SNP: Polimorfismos de un solo nucleótido

SOD: Superóxido dismutasa

3. Resumen.

ANTECEDENTES.

La paraoxonasa es una enzima que esta acoplada a HDL y es la encargada de regular los niveles de LDL séricos, asimismo, es capaz de modular su transformación en LDLox evitando así alteraciones metabólicas, tales como dislipidemias, ECV y estrés oxidativo que pueden conllevar a desarrollar aterosclerosis entre otras enfermedades. Esta enzima a lo largo del gen que la codifica presenta SNPs (192 Q/R y 55 L/M).

OBJETIVOS.

Determinar si los polimorfismos 192 Q/R y 55 L/M del gen PON1 se relacionan con las concentraciones séricas de triglicéridos, colesterol, HDL, LDL y ácido úrico, en una población de niños eutróficos y obesos mexicanos. Determinar la presencia de los polimorfismos 192 Q/R y 55 L/M del gen PON1 en los niños eutróficos y obesos y si en éstos dos grupos se presentan diferencias en las frecuencias alélicas de dichos polimorfismos. Evaluar el perfil bioquímico, incluido el ácido úrico en muestras sanguíneas de los niños eutróficos y obesos. Analizar si existe asociación entre los polimorfismos 192 Q/R y 55 L/M del gen PON1 y parámetros del perfil bioquímico en los individuos incluidos en el estudio.

MÉTODO.

Se llevó a cabo un estudio transversal, prospectivo y comparativo donde se realizó la medición de peso y talla a los niños para identificar los casos de peso saludable y obesidad. Se incluyeron 568 niños de ambos géneros de 6 a 12 años de edad que acudieron a las Unidades Deportivas del IMSS en la zona metropolitana de la Ciudad de México. Se les tomo muestra de sangre venosa para realizar su perfil bioquímico, cuantificación de LDLox además de los ensayos de genotipificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real con tecnología Taqman® para la determinación de los SNPs. El análisis bioquímico se llevó a cabo con el programa SPSS (SPSS Inc, Chicago III). Para los datos obtenidos de los SNPs se evaluó si existe equilibrio de Hardy-Weinberg con el programa Popgene v1.32 (University of Alberta, Canada)

RESULTADOS.

Para el SNP en posición 192 se presentó con mayor frecuencia el genotipo Q/R, con el 53.3% y 53.5% para eutróficos y obesos respectivamente. Mientras que para el SNP en posición 55, se obtuvo una mayor frecuencia del genotipo L/L, cuyo valor fue del 72.2% y 70.2% para eutróficos y obesos respectivamente. Las concentraciones séricas de ácido úrico de eutróficos y obesos fueron de 4.8 y 5.6 respectivamente. El valor medio de LDLox para eutróficos y obesos fue de 6.26 mg/dL y 8.56 mg/mL respectivamente. Los niveles de LDLox resultaron no tener relación con la presencia de los SNPs estudiados, el SNP 192 Q/R tuvo una $p=0.274$ para eutróficos y $p=0.670$ para obesos. Para el SNP 55 L/M se obtuvo una $p=0.224$ para eutróficos y $p=0.549$ para niños obesos.

CONCLUSIONES.

No se determinó asociación de los SNPs con las concentraciones séricas de triglicéridos, colesterol, HDL y LDL. Los niveles de ácido úrico no se asociaron con la presencia de los SNPs estudiados. Asimismo, los niveles de LDLox resultaron no tener relación con la presencia de los SNPs estudiados. Por lo cual es recomendable realizar más estudios, por ejemplo, el análisis del SNP -108 C/T del gen PON1 y dar seguimiento al niño con el fin de evaluar la asociación de los polimorfismos de la PON1 con la finalidad de contar con más datos que permitan determinar si se puede considerar a la PON1 como un bioindicador de la modulación del estrés oxidativo.

4. Introducción

La Paraoxonasa es una enzima dependiente de calcio de origen hepático que se encuentra asociada de manera directa a las lipoproteínas de alta densidad (HDL), esta enzima evita la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) evitando así desordenes metabólicos y enfermedades cardiovasculares en niños y adultos. Se ha establecido una relación entre la actividad de esta enzima con el sexo y la edad, siendo las mujeres quienes presentan una mayor actividad y los infantes quienes tienen menor actividad de esta enzima. (4-11,21-27)

Existen alteraciones (modificaciones) genéticas de carácter hereditario o fortuito por las cuales dicha enzima pueda estar alterada o muestre una actividad disminuida, el presente trabajo se enfoca en el estudio de los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) que resultan del intercambio de un aminoácido por otro, Dichos polimorfismos son el 192 Q/R (cambio de GLUTAMINA por ARGININA en posición 192), el 55 L/M (cambio de LEUCINA por METIONINA en posición 55) en la región promotora. el polimorfismo que se relaciona directamente con problemas cardiovasculares en niños es el 192 Q/R, debido a que se ha encontrado la presencia del alelo 192R (alterado) en la mayoría de los niños con sobrepeso y obesidad. (22-27)

La determinación de los polimorfismos existentes o no en niños con un peso normal y con sobrepeso se realizó mediante la extracción de ADN genómico utilizando un equipo robotizado, el ADN se amplificó mediante la reacción de la polimerasa en cadena (PCR en tiempo real) y se identificó los polimorfismos existentes con el uso de sondas Taqman®, las cuales se unieron de manera específica al gen con el polimorfismo y mediante la medición de la fluorescencia emitida durante dicho evento se comprueba la presencia o no del polimorfismo.

Los productos amplificados en la PCR fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 2% teñidos con Gel Red Nucleic Acid Stain® y observados en el transiluminador con luz UV.

Se efectuó el análisis estadístico y comparativo para demostrar si existe correlación entre la presencia de los polimorfismos y la obesidad en los niños.

Como último paso se efectuó el análisis estadístico y comparativo para demostrar si existe una correlación entre la presencia de dichos polimorfismos y el perfil de lípidos y también con las concentraciones de ácido úrico.

5.Marco teórico

5.1 Obesidad infantil y síndrome metabólico.

Desde hace más de 50 años a la obesidad se le ha considerado como una muestra de buen estado de salud, sobre todo en los primeros años de vida (infancia). En la actualidad, la obesidad es un importante problema de salud pública y social, ya que se sabe que tiene repercusiones en el individuo ya sea adulto o joven, tanto en el aspecto social como en el mental, y en el físico, causando daños a órganos y sistemas, sobre todo a nivel cardiovascular, digestivo y músculo esquelético.

La obesidad va en aumento debido al estilo de vida de la población, esto es debido a que la tecnología moderna reduce los esfuerzos físicos, también se debe a inadecuados hábitos de alimentación y el alto consumo de alimentos “chatarra” altos en carbohidratos, que no son nutritivos y solo son factores causantes de obesidad.

La obesidad es un trastorno complejo multifactorial en el que hay una cantidad anormal (en exceso) de tejido graso. Se desarrolla cuando la ingestión de alimentos es mayor que la que se utiliza para producir energía, por lo que el excedente es almacenado en forma de grasa abdominal o tejido adiposo. ⁽¹⁾

La saciedad es un mecanismo de regulación que controla el hambre y que nos hace dejar de comer cuando nuestro organismo ya no necesita más alimento. En individuos con sobrepeso o con obesidad este mecanismo no funciona adecuadamente. Por lo tanto, cuando la ingestión de energía sobrepasa el gasto energético de manera crónica se genera obesidad.

La clasificación de la obesidad según la Organización Mundial para la Salud (OMS) se muestra en la Tabla 1. ⁽²⁾

Categoría	IMC
Bajo peso	Menor a 18.5
Peso normal	De 18.5 a 24.9
Sobrepeso	De 25.0 a 29.9
Obesidad grado I	De 30.0 a 34.5
Obesidad grado II	De 35.0 a 39.9
Obesidad grado III	Mayor a 40.0

Tabla 1. Clasificación de obesidad según IMC emitido por OMS.

Crecimiento y desarrollo en etapa escolar.

- Después de los cuatro años de edad, la talla (altura) aumenta de 5 a 7 cm por año. A los 13 años se tiene una talla media de 1.50 m.
- De los dos a los seis años de edad, el aumento de peso es de 2 kg por año. De los seis a los ocho años es de 1 ½ Kg por año y después de los ocho años más de 2 Kg por año. ⁽³⁾

Obesidad y su interacción con síndrome metabólico.

Actualmente en los países industrializados las deficiencias nutricionales graves en la infancia y la adolescencia han desaparecido; sin embargo, en el curso de los últimos años se ha incrementado progresivamente la prevalencia de la obesidad infantil y juvenil, siendo el trastorno nutricional de mayor importancia hoy en día, especialmente si se tiene en cuenta que la mayoría de los adolescentes obesos lo seguirán siendo en la edad adulta, con el riesgo sobreañadido de una mayor morbimortalidad ⁽⁴⁾

La obesidad es un trastorno multifactorial en cuya etiopatogenia se encuentran factores genéticos, metabólicos, psicosociales y ambientales, la rapidez con que se está produciendo el incremento de su prevalencia parece estar más bien en relación con factores ambientales como hábitos alimentarios poco saludables, junto a una disminución de la actividad física en niños y adolescentes condicionada, en gran medida, por la televisión, sedentarismo, videojuegos y consumo de alimentos “chatarra”. En los últimos años la televisión y los video juegos son un factor ambiental fundamental que ha permitido un incremento de la prevalencia de la obesidad juvenil en nuestra sociedad, puesto que dedicar mucho tiempo a la televisión y video juegos también supone, en gran medida, dejar de hacer otras actividades de mayor gasto energético, como serían los juegos o el deporte, esto puede ser debido al reducido espacio de vivienda en la cual habita la familia o a la inseguridad del entorno. Provocando así un bajo interés en los infantes por desarrollarse en un ambiente de actividad física constante. ⁽⁵⁾

Por otra parte, la publicidad que se encuentra en los horarios y programas infantiles tiende a transformar los programas en espacios publicitarios, con el objetivo de estimular el deseo y la necesidad de consumir alimentos de alto contenido calórico. Actualmente, la televisión forma parte de todos los hogares y su uso está considerado como normal o rutinario, por lo cual, los jóvenes dedican gran parte del tiempo de ocio al uso de esta tecnología. Tal es la importancia de esta actividad en el desarrollo de la obesidad que un estudio realizado en el año 2008 por la Secretaria de Salud y Asistencia concluyó que un niño mexicano ve en promedio 61 anuncios publicitarios al día y 22 mil 265 mensajes al año, de los cuales el 42% está relacionado con el consumo de alimentos con bajo valor nutricional que favorecen la obesidad. ⁽⁶⁾

Genética de la obesidad infantil.

La genética de la obesidad se puede encontrar en tres formas bien delimitadas: Monogénica o mendeliana: es aquella en la cual la alteración es debida a una mutación en un solo gen.

Sindromática: es aquella que es causada por anomalías cromosómicas y la Común: es la causada por problemas multifactoriales como lo es el desbalance de ingesta y gasto de energía. Las dos primeras suceden con una prevalencia igual o menor a 0.01%. (7)

Para desarrollar el fenotipo de la obesidad es necesario el efecto combinado de la predisposición genética a este trastorno y la exposición a condiciones ambientales adversas. (8)

Los factores genéticos rigen la capacidad o facilidad de acumular energía en forma de grasa tisular provocando una alteración energética y por consiguiente a largo plazo el gasto energético en el individuo será inferior a la energía que ingiere en su dieta, este desbalance es mejor conocido como balance energético positivo.

La influencia genética se va a asociar a condiciones externas como los hábitos dietéticos y estilos de vida sedentarios, éstos últimos se encuentran íntimamente relacionados con la disponibilidad de alimentos en el hogar y en la institución educativa del niño, la estructura sociológica y cultural.

El método de diagnóstico para la obesidad más utilizado actualmente se basa en estándares internacionales de índice de masa corporal (IMC), calculado como peso (Kg) dividido por la talla al cuadrado (m^2). Estos estándares se desarrollaron para niños y adolescentes y corresponden con la clasificación de sobrepeso y obesidad para adultos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) donde el punto de corte para sobrepeso es de 25 de IMC y el de obesidad es de 30. (9)

Se ha establecido que si ambos padres son obesos el riesgo de obesidad para su descendencia será de 69 a 80 %; cuando solo uno de los padres es obeso será de 41 a 50 % y si ninguno de los 2 padres es obeso el riesgo para la descendencia será solo del 9 %, por lo cual no se puede asegurar que el niño con padres no obesos no desarrolle obesidad si están presentes en su entorno los factores ambientales de la obesidad. (10)

Consecuencias de la obesidad:

A corto plazo (para el niño o el adolescente)

- Dislipidemias, conjunto de enfermedades asintomáticas que se caracterizan por causa de concentraciones anormales de lipoproteínas sanguíneas, tales como las lipoproteínas de alta, baja y muy baja densidad y colesterol total. (11)
- Alteraciones psicológicas, la complicación más angustiante es el rechazo familiar y social del que son objeto los obesos; esto hace que su estado de ánimo decaiga y se depriman fácilmente y que a pesar de que aparentan alegría sufren de maltratos y acoso principalmente los niños en edad escolar.

- Aumento de los factores de riesgo de enfermedad cardiovascular, en las personas obesas aumenta el depósito de grasa en las arterias, lo que provoca estrechez en el calibre de las mismas con disminución de la presión sanguínea debido a un proceso en el cual está implicada la respuesta inmune e inflamación. A esta alteración se le conoce como aterosclerosis. ⁽¹²⁾
- Alteraciones respiratorias, en el individuo obeso el diafragma no realiza su movimiento adecuadamente y, por lo tanto, no hay una buena oxigenación, lo que ocasiona la fatiga fácil.
- Alteraciones en la glucemia normal tales como diabetes (tipo 1 y 2)
- Anormalidades ortopédicas debido al peso excedente que deben soportar las extremidades inferiores del individuo obeso.
- Enfermedad del hígado, principalmente esteatosis hepática no alcohólica.

A largo plazo (para el adulto que era obeso de niño o adolescente)

- Persistencia de la obesidad
- Aumento de los factores de riesgo cardiovascular, diabetes, cáncer, depresión, artritis
- Mortalidad prematura

La prevención es el tratamiento de elección de la obesidad, y esta puede prevenirse desde la infancia, aunque no se sabe a ciencia cierta si ello va evitar su presencia en la adolescencia o en la edad adulta, en algunos casos es necesario que el médico especialista prescriba tratamientos farmacológicos y si es necesario en casos graves se utiliza la cirugía para disminuir la absorción intestinal y así poder disminuir el peso en un lapso de tiempo seguro para el paciente obeso. ⁽⁸⁻¹²⁾

Síndrome metabólico (SM).

Se le denomina síndrome metabólico a todo el conjunto de alteraciones metabólicas y cardiovasculares que están relacionadas con factores como la resistencia a la insulina (RI) y la obesidad abdominal o visceral en todas las edades, y que su principal manifestación son alteraciones en el metabolismo de lípidos principalmente en bajas concentraciones de HDL (<60 mg/dL) y altas concentraciones de LDL (>100 mg/dL) y triglicéridos (>150 mg/dL), hipertensión arterial y alteraciones en el metabolismo de la glucosa. ⁽¹³⁾

El SM durante la infancia y la adolescencia está relacionado con la RI y la obesidad abdominal. Por lo cual en presencia de RI, la célula β -pancreática está obligada a incrementar la secreción de insulina, esta medida es necesaria para tratar de compensar esta situación, con lo cual se producirá un hiperinsulinismo, si el incremento de insulina es efectivo se regresará a la normo glucemia, pero si esto continua crónicamente este mecanismo regulador se irá alterando y por lo tanto fallando. ⁽¹⁴⁾

La cuantificación de la RI se puede realizar por diferentes métodos (indirectos) basados en la medida de los niveles de glucemia e insulina en ayunas o tras una sobrecarga oral de glucosa (curva de tolerancia) entre estos se deben destacar:

- a) El HOMA-IR (por sus siglas en inglés: Homeostatic Model Assesment of Insuline Resistance), el cual se obtiene con la insulina en ayunas ($\mu\text{U}/\text{mL}$) multiplicado por la glucosa en ayunas (mml/L) /405.
- b) La insulina en ayunas en la edad pediátrica, se considera hiperinsulinemia cuando los niveles de insulina basal son mayores a $10.5 \mu\text{U}/\text{mL}$ en niños pre púberes, y superiores a $15 \mu\text{U}/\text{mL}$ en niños púberes.

El índice HOMA es un método que puede reflejar la secreción de insulina y su sensibilidad hepática y periférica. Además, tiene una alta especificidad y sensibilidad al identificar a sujetos con resistencia a la insulina. ⁽¹⁵⁾

Valor Normal: $\text{HOMA} \leq 2.5$

Insulinorresistencia: $\text{HOMA} \geq 3,8$ ^(15,16)

En el individuo obeso hay una alta concentración de estrés oxidativo en las células esto debido a la formación excesiva de radicales libres ocasionados por la alteración metabólica, por lo cual la relación entre estos dos puntos es esencial para poder entender porque son alteradas las LDL con mayor facilidad en los obesos.

5.2 Radicales libres y estrés oxidativo.

El estrés oxidativo es una de las principales causas para desarrollar múltiples enfermedades como, la aterosclerosis, enfermedades cardiovasculares (ECV), enfermedades cognitivas como la enfermedad de Parkinson y enfermedad de Alzheimer. Un aspecto particular del estrés oxidativo es la formación de especies reactivas de oxígeno, entre estos se incluyen los radicales libres y los peróxidos, que poseen capacidad elevada para alterar las membranas celulares y provocar daño a las células que tienen contacto con ellos. El estrés oxidativo se produce cuando ocurre un desbalance entre los elementos antioxidantes y los pro oxidantes, a favor de estos últimos.

Se le considera radical libre (RL) o especie reactiva del oxígeno (ERO) a toda aquella molécula que en su estructura atómica presenta un electrón desapareado o impar en el orbital externo, dándole una configuración que genera una alta inestabilidad. ⁽¹⁷⁾ En la molécula de oxígeno se conocen las siguientes especies reactivas:

- O_2 Oxígeno singulete (forma energéticamente excitada del oxígeno molecular)
- H_2O_2 Peróxido de Hidrógeno.
- O_2^- Anión súper óxido.
- HO radical hidróxido.

El oxígeno es necesario para la vida, pero es la principal fuente de radicales libres (elementos pro oxidantes), que si no se neutralizados de forma adecuada por elementos antioxidantes pueden tener efectos dañinos sobre la función celular. Debido a esto se establece que si la concentración de elementos pro oxidantes supera la de elementos antioxidantes existirá "estrés oxidativo".⁽¹⁸⁻¹⁹⁾ Todos los seres vivos que utilizan oxígeno para la liberación de energía generan RL. Existen varias fuentes capaces de producirlos, dentro de ellas las mitocondrias constituyen las más importantes, aunque existen otras como los peroxisomas (organelos del citosol muy ricos en oxidasas y catalasas), los leucocitos polimorfonucleares (PMN) activados por diversas proteínas que actúan sobre ellos, ejemplo complemento, interleucinas, etc. Las reacciones de oxidación son esenciales para desarrollar adecuadamente procesos metabólicos celulares. Dichas reacciones involucran la transferencia de electrones, es decir, producirán RL. Esta situación es incompatible con la vida, a menos claro que existan mecanismos de defensa en la célula que neutralicen los RL. A estas defensas contra la oxidación se les denomina antioxidantes.

Fuentes biológicas de RL

La mitocondria (organelo celular encargada de suministrar la energía necesaria para la actividad celular sintetizando ATP a partir de glucosa, ácidos grasos y aminoácidos) constituye la fuente principal de RL. Este fenómeno se efectúa a nivel de la cadena de transporte de electrones, que es la última etapa de formación de protones de alta energía, y cuyo pasaje a través de la membrana interna mitocondrial genera un gradiente eléctrico que aporta la energía necesaria para formar el ATP o adenosina trifosfato.⁽¹⁸⁻¹⁹⁾

5.3 Sistemas antioxidantes.

Se le define como antioxidante a toda aquella sustancia o molécula que encontrándose en bajas concentraciones con respecto a las de una molécula oxidante retarda o previene la oxidación de dicho sustrato.⁽¹⁸⁾

Durante el mecanismo de acción de un antioxidante hay colisiones con el RL con lo cual le cede un electrón, lo que provocara que el antioxidante se transforme en un RL débil no tóxico y que en algunos casos especiales como la vitamina E, puede regenerarse a su forma primitiva por la acción de otros antioxidantes. Por otra parte, no todos los antioxidantes actúan de esta manera, los llamados enzimáticos catalizan o aceleran reacciones químicas que utilizan sustratos que a su vez reaccionan con los RL.⁽¹⁷⁻¹⁹⁾

De las numerosas clasificaciones existentes de los antioxidantes, es recomendable adoptar la que los divide en: exógenos y endógenos.⁽¹⁸⁾

Clasificación de los antioxidantes:

EXÓGENOS. Antioxidantes que ingresan a través de la ingesta alimentaria. Ejemplos:

- Vitamina E: Neutraliza el oxígeno singulete, captura radicales hidroxilo, captura anión superóxido y también neutraliza peróxidos.
- Vitamina C: Neutraliza el oxígeno singulete, captura radicales hidroxilo y regenera la forma oxidada de la vitamina E.

- Betacarotenos: Neutraliza el oxígeno singulete y actúa como agente protector en patologías tumorales.

ENDÓGENOS. Sintetizados por la misma célula.

Ejemplos:

COFACTOR

- Oligoelementos: Elementos que en pequeñas concentraciones constituyen parte del núcleo activo de las enzimas antioxidantes. Cobre, Cinc, Hierro, Manganeso, Selenio son los más representativos.

ENZIMAS

- Catalasa (CAT): Previene la reducción del peróxido de hidrógeno para formar el radical hidroxilo.
- Superóxido dismutasa (SOD): Eliminan el anión superóxido
- Glutación: Principal antioxidante de las células, es ubicuo (se encuentra en muchos lugares), ayuda protegiendo a células de las especies reactivas del oxígeno como radicales libres y los peróxidos.⁽¹⁷⁻¹⁹⁾
- Peroxidasa: Enzima que cataliza la oxidación de un amplio número de sustratos orgánicos e inorgánicos, utilizando el poder oxidante del peróxido de hidrógeno.

La PON1 reduce directamente el estrés oxidativo en los macrófagos y en el suero disminuyendo los niveles de LDL oxidada en el suero, la deficiencia de PON1 trae como resultado un aumento de las especies reactivas de oxígeno y estrés oxidativo no sólo en el suero, sino también en los macrófagos, un fenómeno clave durante el desarrollo de aterosclerosis y otras afecciones cardiovasculares.⁽¹⁶⁻¹⁸⁾

Las LDL son las más importantes transportadoras de colesterol y son susceptibles a las modificaciones oxidativas debido a la interacción con moléculas pro oxidantes, a consecuencia de esto la LDL nativa tiene una alteración estructural y es transformada a LDLox como lo muestra la Figura 1 (20-21).

Transformación estructural de una LDL nativa.



La LDLox no únicamente tiene propiedades proaterogénicas y proinflamatorias, también posee atribuciones inmunogénicas, provocando la generación de auto anticuerpos séricos contra LDLox (Anti LDLox).⁽²²⁾

Se conoce poco sobre las propiedades de la LDLox; sin embargo, gracias a la obtención de anticuerpos monoclonales específicos contra esta variante estructural de LDL ha permitido identificar su presencia en circulación mediante múltiples técnicas, siendo el inmunoensayo (ELISA) la técnica de elección para su detección y cuantificación.⁽²²⁻²³⁾

La alimentación tanto en adultos como en jóvenes es de vital importancia para proveer de antioxidantes a nuestro organismo, especialmente cuando las condiciones de vida del individuo han disminuido el potencial de sus sistemas de regulación oxidativa.⁽²⁴⁾

5.4 Enzima Paraoxonasa (PON1).

La PON1 (arildialquilfosfatasa) descrita en 1946 por A. Mazur, es una enzima dependiente de calcio con actividades de paraoxonasa (PON), arilesterasa (ARE) y lactonasa.

La PON1 es una enzima ligada directamente a las Apo A-I y Apo J de las HDL que junto a estas participa en la protección de las LDL ante la oxidación por estrés y radicales libres.

Se conoce como Paraoxonasa a un grupo de enzimas pertenecientes a una familia génica que en los mamíferos presenta tres miembros codificados los cuales son: PON1, PON2 y PON3. Esta familia génica parece haberse formado por la duplicación de un precursor común (probablemente PON2), ya que los 3 son muy parecidos (comparten aproximadamente 60% - 70% de la secuencia de los aminoácidos) y se encuentran localizados en posiciones adyacentes del cromosoma 7 (7q21.3) en la especie humana.⁽²⁵⁾

La PON1 es el miembro mejor caracterizado, estudiado y conocido de la familia, su nombre deriva de uno de los sustratos artificiales más utilizados para medir su actividad *In vitro*, el Paraoxón.

La PON1 presenta acción antioxidante exclusivamente vinculada a LDL, la PON2 también es capaz de proteger las partículas de LDL de la oxidación, a pesar de que esta enzima no se encuentra asociada a las HDL. La PON3 circula unida a las partículas de HDL y presenta una actividad PON y ARE muy débil, también se ha observado que la PON3 tiene una mayor capacidad que la PON1 para proteger a las LDL de la oxidación.

El mecanismo principal de protección que confiere la PON1 por el HDL parece ser en el transporte y remoción de excedentes de colesterol extra hepáticos de regreso al hígado (transporte reverso de colesterol) aunado al efecto protector que le da a la LDL nativa y así evitar su transformación a LDLox. ⁽²⁶⁾

5.5 Estructura de la PON.

La PON1 es una glicoproteína (proteína unida a un glúcido) de origen hepático compuesta por 354 aminoácidos y tiene un peso molecular de 43-44 kDa aproximadamente, Tiene una β -hélice de seis aspas y a su vez cada aspa contiene cuatro filamentos. En el túnel central de la enzima contiene dos iones calcio separados por 7.4 Å uno del otro.

El ion calcio presente en la sección central es considerado meramente estructural como lo muestra la Figura 2. ⁽²⁵⁻²⁷⁾

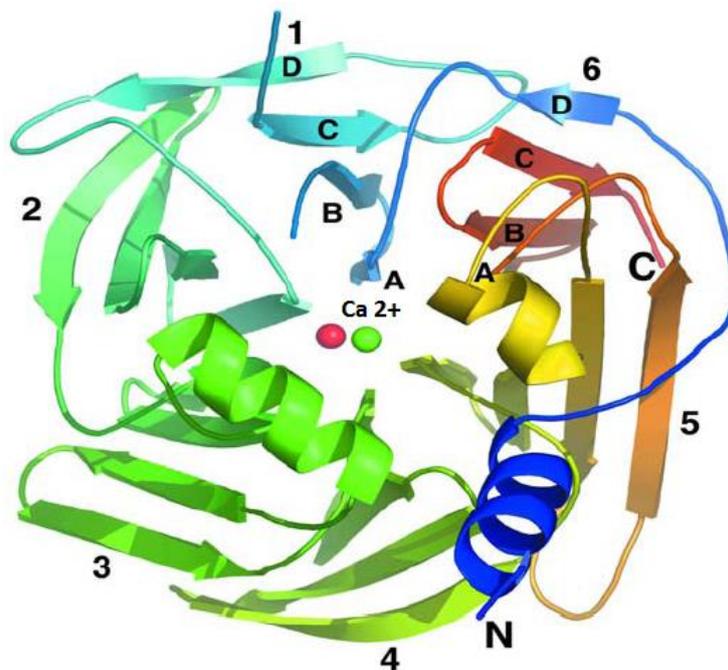


Figura 2. Estructura general de PON1. De 1 a 6 son aspas de la β -hélice. De A a D son filamentos de cada aspa con dos átomos de calcio en la parte central (rojo y verde) N es un grupo amida y C un grupo carbonilo.

La hoja beta está estabilizada por puentes de hidrógeno entre el grupo amida y el grupo carboxilo de un filamento además se mantiene unida por un puente disulfuro entre la cisteína 42 de la hebra 6D y la cisteína 353 de la hebra 6C, en

el interior del túnel central contiene 2 moléculas de calcio. ⁽²⁸⁾ El Ca^{2+} 1 es mejor denominado como calcio catalítico, mientras que el ion Ca^{2+} 2 es estructural. ⁽²⁵⁻²⁷⁾

Estructuralmente la PON1 presenta dos sitios activos funcionales, uno para efectuar las actividades de PON/APE, mientras que el segundo sitio activo sería el encargado de la protección contra la oxidación de las LDL como lo muestra la Figura 3. ⁽²⁹⁻³⁰⁾

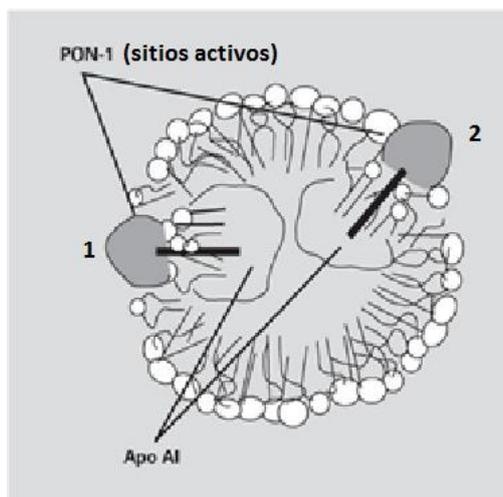


Figura 3. Sitios activos de la PON1 acoplada a la molécula de HDL. Tomada y modificada de Canales et al, 2003.

Los genes que codifican a la PON3 y PON1 se expresan y sintetizan exclusivamente en el hígado mientras que PON2 se expresa en cerebro, hígado, riñón y testículo. PON1 y PON3 son secretadas por las células hepáticas y viajan unidas a las HDL durante la remoción de colesterol extra hepático (transporte reverso de colesterol), aunque en suero humano predomina PON1 también se encuentran cantidades considerables de esta enzima en el plasma. ⁽³¹⁻³²⁾

5.6 Actividad de PON1.

La PON1 presenta múltiples actividades, principalmente:

- Paraoxonasa (PON): Esta actividad permite hidrolizar compuestos organofosforados por ejemplo el paraoxón, soman, sarin, etc.
- Arilesterasa (ARE): Con esta actividad la PON1 es capaz de hidrolizar ésteres aromáticos como el acetato de fenilo.
- Lactonasa: PON1 es capaz de hidrolizar lactonas aromáticas y alifáticas además de catalizar la reacción reversa de lactonización de ácidos hidroxycarboxílicos.

5.7 Sustratos de PON1.

Hoy en día no se ha podido determinar con exactitud cuál es el sustrato biológico principal de PON1. Posiblemente esta enzima funja varios papeles con más de un sustrato a nivel intra o extra celular.

En ausencia de un reconocido sustrato biológico para PON1, su actividad se mide a través de la degradación de sustratos sintéticos como paraoxón y fenil acetato. (Figura 4). Estudios más recientes han mostrado que la actividad de arilesterasa (hidrólisis del fenil acetato) es la que mejor refleja la actividad antioxidante de PON1 (Figura 5).⁽³³⁾

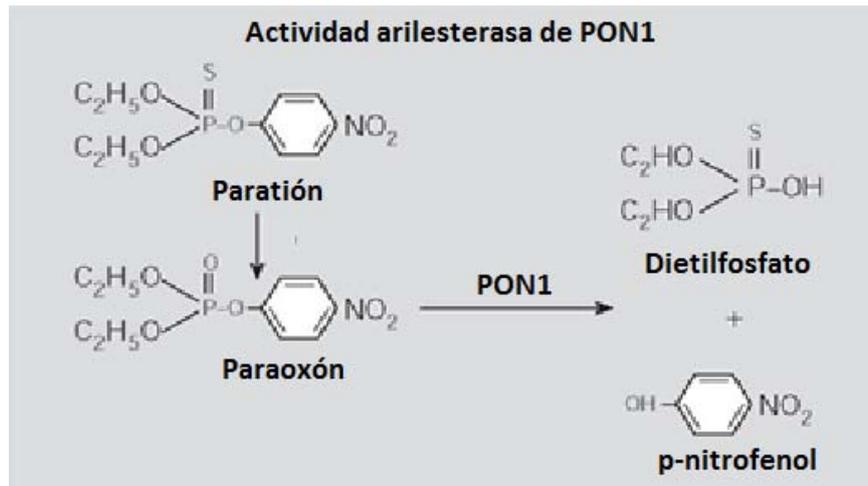


Figura 4. Actividad paraoxonasa en la degradación de Paraoxon formando P-nitrofenol y dietilfosfato. Tomada y modificada de Canales et al, 2003.

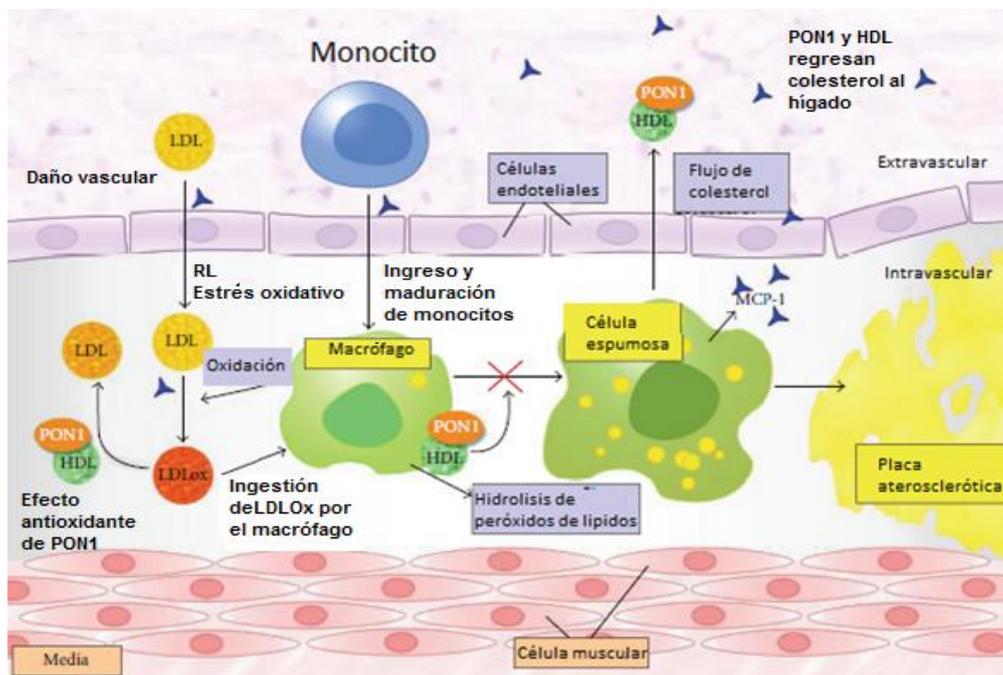


Figura 5. Esquema representativo de la formación de una placa de aterosclerosis y el efecto protector que otorga la PON a la LDL de la oxidación. PON1: Paraoxonasa 1, HDL: Lipoproteína de alta densidad, LDL: Lipoproteína de baja densidad, LDLox: Lipoproteína de baja densidad oxidada. Tomada y modificada de Camps J, et al. 2012.

5.8 Efectos antiaterogénicos de la PON1.

PON1 es capaz de proteger de la acumulación de lipoperóxidos sobre las LDL *in vitro* e *in vivo*.⁽²⁵⁻³⁰⁾ Mediante la hidrólisis de los lipoperóxidos en las LDL oxidadas (LDLox), PON1 las despoja de sus propiedades aterogénicas, ya que sólo las LDLox se unen de manera específica a receptores scavenger CD36 (basureros) de los macrófagos, mientras que las LDL nativas aún son capaces de ser reconocidas por los receptores de LDL normales. PON1 protege a LDL y HDL de la oxidación preservando su participación en el transporte del colesterol hacia el hígado (Figura 6).⁽³⁶⁻³⁷⁾

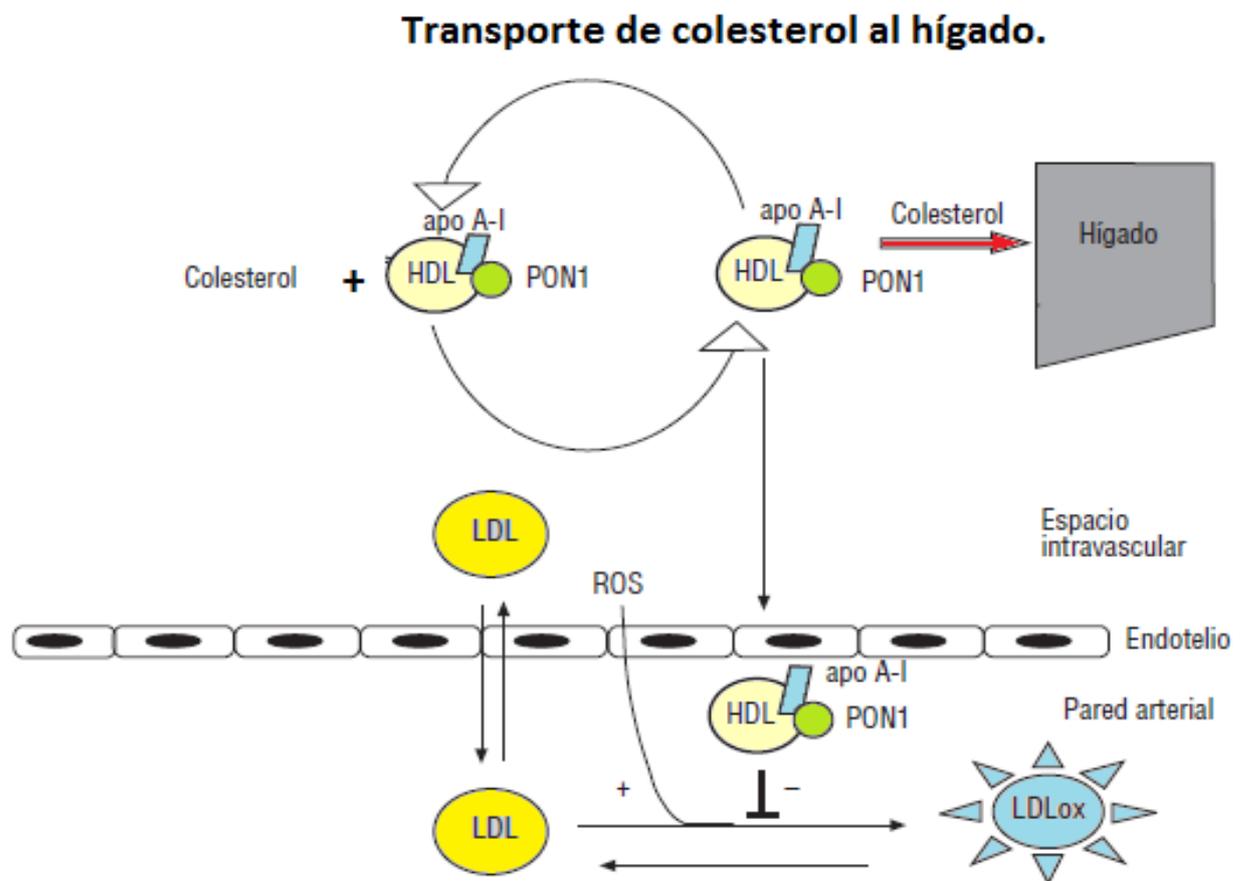


Figura 6. Esquema de la participación de PON1 acoplada a HDL durante el transporte de colesterol hacia el hígado. Tomada y modificada de Tomás M et al. 2004.

Los mecanismos por los cuales PON1 evita la oxidación de LDL incluyen la hidrólisis de los peróxidos de fosfolípidos y de los hidroperóxidos de ésteres de colesterol (actividad de esterasa) Figura 7. La unión de PON1 con HDL es capaz de sintetizar lisofosfatidilcolina (lecitina), que inhibe la biosíntesis del colesterol y además estimula la unión de HDL a los macrófagos para promover la salida del colesterol de estas células, reduciendo así las concentraciones intracelulares de colesterol y las complicaciones que se producen por un exceso de lípidos en el macrófago.⁽²⁵⁻³⁴⁾

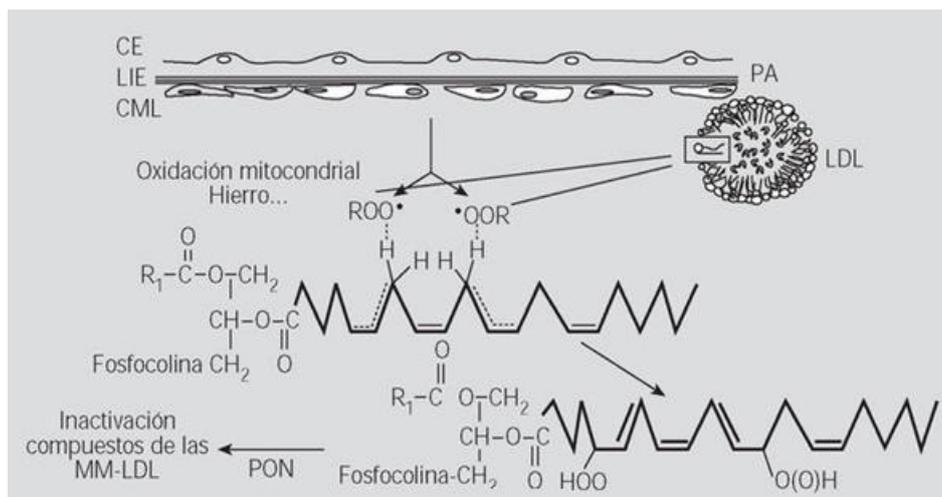


Figura 7. Esquema de la peroxidación de los fosfolípidos de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y su inactivación por los sistemas paraoxonasa CE: células endoteliales; LIE: lámina interna elástica, CML: células musculares lisas, PA: pared arterial, MM-LDL: LDL minimamente oxidadas. Tomada y modificada de Canales et al, 2003.

5.9 Aterosclerosis e Índice aterogénico (IA).

La etiopatogenia de aterosclerosis, que comienza en la infancia, se relaciona con niveles de colesterol total alterados, principalmente con un aumento de la LDL y una disminución de HDL. ^(38,39) En esta patología existe una acumulación de lípidos en la íntima arterial causada por algún daño vascular (Presión arterial alta, fumar, RL, EO etc), al migrar del torrente sanguíneo al interior de la íntima arterial las LDL sufren una alteración estructural transformándose en LDLox las cuales despiertan una respuesta inmune (es en este punto donde la PON1 evita la formación de LDLox). Al haberse activado la respuesta inmune, del torrente sanguíneo son liberados monocitos hacia el daño vascular provocando así su transformación en macrófagos activados o células espumosas (Foam cells, por sus siglas en inglés), una vez transformados los macrófagos comienzan a fagocitar cúmulos de LDLox y al no poseer los receptores adecuados para dicha lipoproteína no son capaces de eliminarlas provocando inflamación y también una cápsula de tejido fibroso (células del tejido muscular liso) entre la placa de ateroma y la arteria. Conforme avanza la placa de ateroma, se produce un estrechamiento o estenosis de la arteria, inicialmente parcial, hasta evolucionar a una completa obstrucción como lo muestra la Figura 5.

La Obesidad infantil se ha asociado con un perfil lipídico anormal similar a la observada en los adultos, lo que podría contribuir a un alto riesgo cardiovascular, por lo cual identificar y controlar la obesidad en la infancia es un objetivo importante en la prevención de la enfermedad en la edad adulta.

Un punto importante en la prevención del aterosclerosis es conocer el nivel de riesgo que se tiene a padecer dicha enfermedad, por lo cual se han establecido mundialmente índices con los cuales, a través de los niveles de colesterol total, HDL, LDL y triglicéridos se puede conocer dicho riesgo a desarrollar aterosclerosis en adultos y niños.

Uno de estos parámetros es la determinación del índice aterogénico (IA) ⁽⁴⁰⁾, el cual se calcula con la siguiente fórmula:

$$IA = [(Colesterol\ total - HDL-C) / HDL-C]^{(41)}$$

El perfil aterogénico se puede determinar de diferentes maneras no solo con el uso de HDL y colesterol total, también mediante el uso de las subpoblaciones de lipoproteínas como lo muestra la siguiente fórmula.

IA=Log(TRIG/HDL) y ApoB/ApoA1 ratio. ⁽⁴²⁾ ApoB/ApoA1 tiene un mayor valor predictivo que las concentraciones de los parámetros lipídicos individuales y pueden ser utilizados como biomarcadores de riesgo en el caso de concentraciones relativamente normales de lípidos plasmáticos.

5.10 Moduladores de la actividad de PON1.

Numerosos son los factores que interfieren en la actividad de PON1, los más importantes se deben a los polimorfismos del gen que codifica a la enzima, sin embargo, también existen ciertas contribuciones de otros factores de modulación de la actividad de PON1, dentro de estos se pueden resaltar: ^(33,43)

- Edad: La actividad de PON1 varía con la edad (más baja en niños), alcanza su mayor nivel en adultos jóvenes y declina en adultos mayores y en mujeres después de la menopausia.
- Género: Las mujeres tienen mayores concentraciones de PON que los hombres.
- Nivel de estrés oxidativo: Concentraciones altas de radicales libres afectan la actividad de PON1 en suero.
- Fosfolípidos oxidados en LDL y HDL: Los fosfolípidos oxidados en las partículas de LDL y HDL reducen la actividad de PON1, siendo la isoforma PON1R del polimorfismo 192 Q/R más sensible a la oxidación que la isoforma PON1Q.
- Consumo de alcohol: El consumo moderado de alcohol causa un incremento del 395% de la actividad de PON1, mientras que el suero de los alcohólicos recurrentes presenta 45% menos de actividad que los no alcohólicos. por lo tanto, el consumo frecuente de alcohol inhibirá la actividad y expresión de la PON1, independientemente de sus polimorfismos (Figura 8).
- Tabaquismo y la actividad física del individuo: La actividad de PON1 es menor en fumadores que en no fumadores y ex fumadores como consecuencia del mayor estrés oxidativo y de la modificación en la actividad de la enzima. Las partículas de LDL de los fumadores son más susceptibles a la oxidación. ⁽⁴³⁾

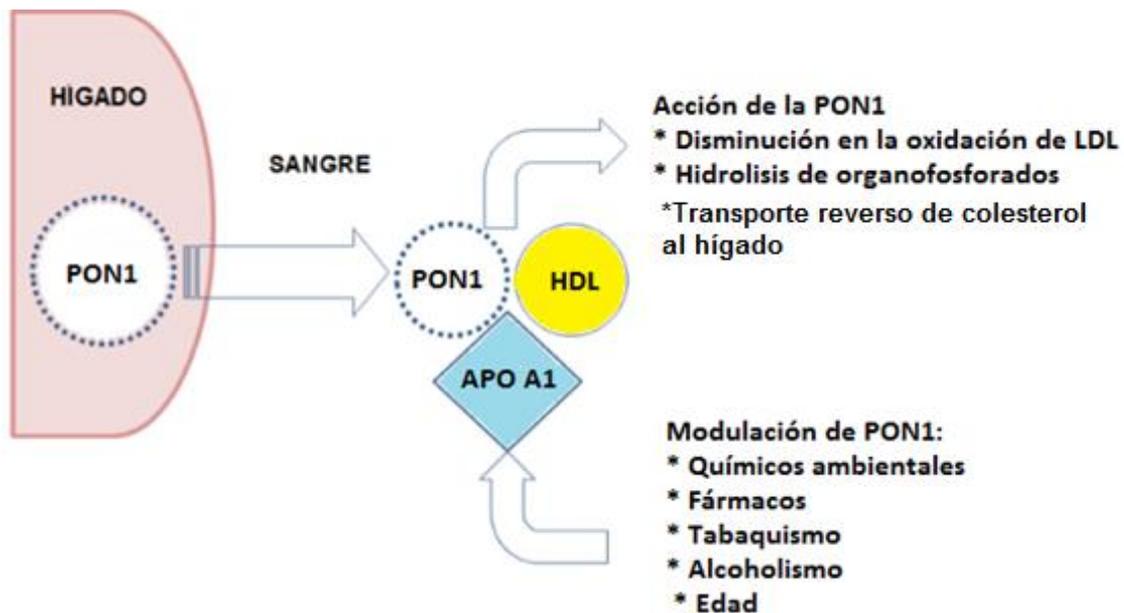


Figura 8. Efectos biológicos causados por PON1 y los moduladores de la actividad de PON1. Tomada y modificada de Lucio G Costa et al., 2005

5.11 Polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs).

A lo largo de todo el genoma existen alteraciones de la secuencia de nucleótidos que lo componen, entre las principales alteraciones en el genoma se encuentran los polimorfismos, deleciones, translocaciones entre otros. Los polimorfismos genéticos son variaciones del genoma que ocurre por el intercambio de un cierto nucleótido en uno o varios individuos, estas alteraciones son transmitidas a la descendencia, por lo cual adquieren una frecuencia importante en la población tras múltiples generaciones. ⁽⁴⁴⁾

Un polimorfismo se caracteriza porque diferentes individuos presentan distintos nucleótidos o variantes en una posición concreta del genoma, que se denomina locus. A cada posible variación resultante se le denomina alelo. Dentro de estos alelos existen algunos que se expresan con mayor frecuencia y se les conoce como alelo ancestral, mientras que el alelo con menor frecuencia es denominado alelo variante. ⁽⁴⁴⁻⁴⁵⁾

Dichos polimorfismos son la base de la evolución y los que se logran consolidar, bien pueden proporcionar ventajas a los individuos, aunque también pueden contribuir a causar enfermedades.

Los polimorfismos más frecuentes son cambios de una única base. (Figura 9). A éstas variaciones se les llama polimorfismos de un único nucleótido o single nucleotide polymorphism (SNP) por sus siglas en inglés. ⁽⁴⁴⁾

Como consecuencia del cambio de una única base se puede producir un cambio de aminoácido sintetizado y por consecuencia la síntesis de una proteína equivocada y ello puede resultar en una modificación de su actividad o función.

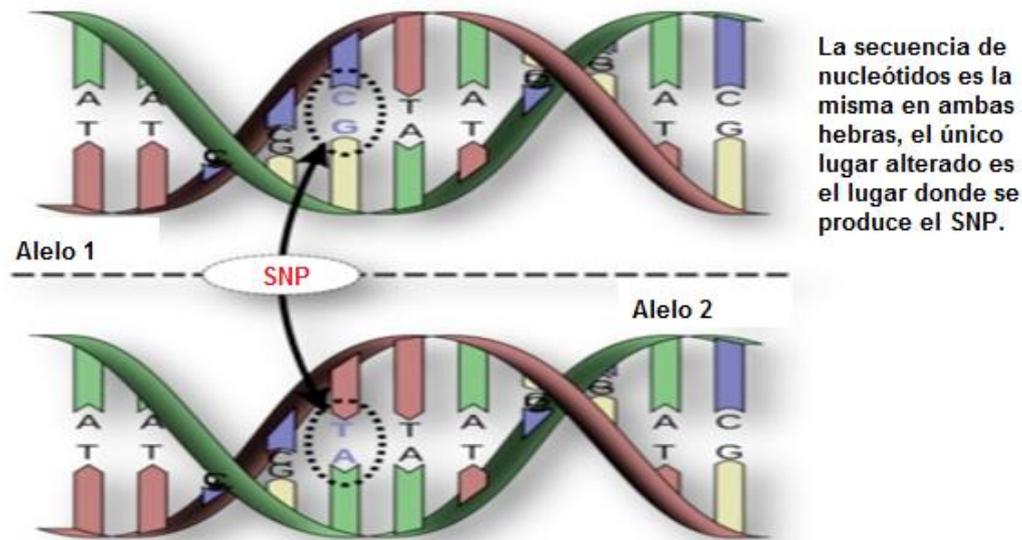


Figura 9. En la imagen se esquematiza el concepto de SNP. <http://www.viagenefertility.com/Available-PGD-Technologies.php>

Los polimorfismos son básicamente mutaciones, las mutaciones, como sabemos son sucesos que suceden generalmente al azar de manera fortuita y éstas mutaciones podrán tener o no impacto sobre la estructura final del organismo que las sufre. Algunas mutaciones se consideran silenciosas ya que no causan un cambio evidente en el fenotipo y otras significativas que, si causan cambios evidentes en el fenotipo, ambas se pueden revelar por métodos de biología molecular. ⁽⁴⁴⁻⁴⁵⁾

La diferencia entre un polimorfismo y un monomorfismo es muy importante de resaltar, ya que en el monomorfismo hay una ausencia o falta de variación en la población dada, es decir, esa población no presentará variación del genoma. Existen muchos tipos de polimorfismos ya identificados y los más importantes son:

- Polimorfismos en regiones codificantes o exones: El polimorfismo genético se puede presentar en regiones codificantes, lo cual da lugar a mutaciones generalmente visibles en la proteína correspondiente esto debido a que las regiones exónicas o codificantes siempre resultaran en la síntesis de una cierta proteína ya que estas secuencias no son eliminadas durante el fenómeno conocido como “splicing” en el cual se cortan las regiones exónicas de las intrónicas por el espliciosoma durante la maduración del ARNm
- Polimorfismos en regiones no codificantes o intrones: Cuando el polimorfismo genético se presenta en regiones no codificantes, éste puede ser invisible al nivel del fenotipo, es decir no se expresará debido al fenómeno del “splicing” anteriormente mencionado. ⁽⁴⁴⁻⁴⁶⁾

Ejemplo de un polimorfismo:

En el gen que codifica para la apolipoproteína E (ApoE) se han encontrado varios polimorfismos con el cambio de una única base. Uno de ellos, denominado ApoE ϵ -4, es resultado del cambio del aminoácido cisteína de la

posición 112 por una arginina. Esta variante se asocia con la enfermedad de Alzheimer. ⁽⁴⁷⁾

Aunque exista una mutación o un alelo alterado no implica que el portador va a sufrir o desarrollará la enfermedad correspondiente, algunas patologías son de etiología multifactorial, y la sola presencia de un alelo deletéreo no condiciona al individuo, como un ejemplo tenemos la diabetes, como sabemos la diabetes es una enfermedad que es causada por altos niveles de glucosa, una dieta alta en carbohidratos y aunado a esto si el paciente obeso tiene en su familia parientes diabéticos es muy probable que desarrolle diabetes por todos los factores de riesgo ya mencionados, no únicamente por su alteración genética.

5.12 Polimorfismos genéticos de la PON1.

El gen que codifica la enzima PON1 está situado en el brazo largo del cromosoma 7 (7q21.3) sitio conocido por ser altamente polimórfico y se localiza entre los pares de bases 94.571.639 y 94.598.495. A lo largo de este gen se conocen 5 SNPs bien establecidos, los más importantes en la región codificante son el 192 Q/R y el 55 L/M como lo muestra la siguiente Figura 10.

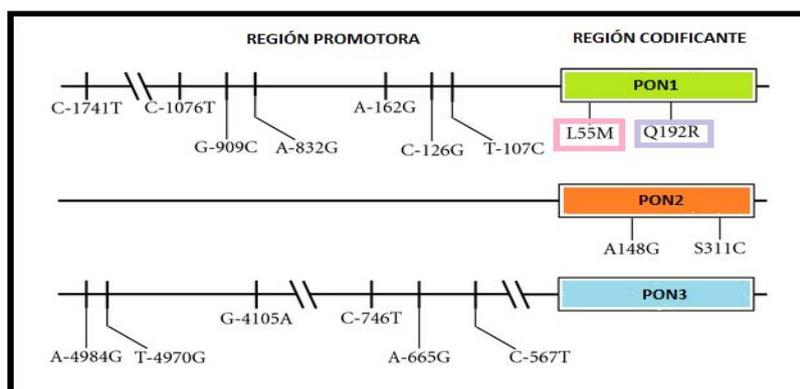


Figura 10. Representación de los polimorfismos de un solo nucleótido más prevalentes para PON1, PON2 y PON3 en regiones codificantes y promotoras. Tomada y modificada de Pérez et al. 2009.

Con la clonación del gen que codifica esta enzima se permitió la identificar más de 200 SNPs a lo largo de las regiones de PON1. La atención se centró en SNPs de la región codificante en las posiciones 192 y 55 y en la región promotora la posición -108. ⁽³³⁾

PON1 192	GLUTAMINA	⇒	ARGININA
PON1 55	LEUCINA	⇒	METIONINA
PON1 -108	CISTEÍNA	⇒	TREONINA

Principales polimorfismos en la PON1.

Para este polimorfismo (192 Q/R) se han encontrado tres genotipos claramente identificados el QQ, QR y el RR. El alelo 192R es considerado el alelo de riesgo para desarrollar obesidad y alteraciones metabólicas, además de resistencia a la insulina debido a que causa baja actividad de PON1. ^(30-33,48)

El alelo Q (Glutamina) del polimorfismo en posición 192 está más relacionado con un bajo riesgo de desórdenes cardiovasculares mientras que el alelo R (Arginina) del mismo polimorfismo provee un mayor riesgo de desórdenes cardiovasculares, ya que altera la capacidad de la PON1 para proteger a las LDL de la oxidación por estrés oxidativo, RL y etc. ^(30-33, 48)

La sustitución de Leucina (L) por Metionina (M) en la posición 55 del polimorfismo está relacionada con concentraciones séricas y plasmáticas de PON1 variables. El alelo M proporciona concentraciones séricas y plasmáticas de PON1 más bajas, mientras que el alelo L favorece concentraciones más altas de PON1.

Existen otros polimorfismos fuera de la región promotora como la sustitución -108 C/T (Cisteína por Treonina en posición menos 108) la cual parece tener una gran influencia sobre las concentraciones plasmáticas de la enzima PON1. El alelo C-108C determina niveles de PON1 que son el doble de los que provee el alelo C-108T. ⁽³⁰⁾

5.13 Ácido Úrico y su relación con la obesidad.

Es bien conocido que el ácido úrico (AU) es el producto final del metabolismo de las purinas encontradas en la dieta de los humanos. Los nucleótidos Adenina y Guanina son encontrados en el organismo como componentes del ácido ribonucleico (ARN) y ácido desoxirribonucleico (ADN) además de encontrarse directamente en la dieta rica en cárnicos. ⁽⁴⁹⁾

El ácido úrico es un ácido orgánico con un pKa de 5.75 y se encuentra principalmente como urato monosódico y en las concentraciones mostradas en la tabla 2. ⁽⁵⁰⁾

Valores normales de ácido úrico en sangre	
Ideal en niños	Menor a 5 mg/dL
Mujeres	Máximo 5.5 mg/dL
Hombres	Máximo 6.5 mg/dL

Tabla 2. Valores normales de ácido úrico en la población mexicana según la encuesta nacional de salud y nutrición 2012.

Metabolismo del Ácido Úrico.

Diariamente eliminamos cerca de 700-750 mg de ácido úrico, de los cuales dos terceras partes son eliminadas por vía renal y una tercera parte a través de las heces. Todo exceso de esta cantidad permite su acumulación en diferentes

lugares en el organismo principalmente articulaciones. Los humanos no disponemos de uricasa, única enzima que degrada directamente el ácido úrico.

Básicamente es formado por la degradación de urato a alantoina por la acción de la enzima uricasa, la consecuencia de la inactivación de la uricasa es la aparición de altos niveles de uratos en humanos y esto se debe a que tienen propiedades anti y pro-oxidantes. Se ha establecido que el consumo de fructosa en cantidades excesivas se correlaciona con el desarrollo de la diabetes, la obesidad y el síndrome metabólico. El aumento en la producción de ácido úrico no solo se ve reflejado como resultado del catabolismo de nucleótidos sino también del catabolismo de la fructosa que está relacionado con la actividad de cetohexocinasa (KHK). En el mecanismo interviene la KHK que rápidamente transfiere un grupo fosfato del nucleosido trifosfato (ATP) y fosforila a la fructosa hasta fructosa-1-fosfato con marcada disminución de ATP, ⁽⁵¹⁾ como lo muestra la Figura 11.

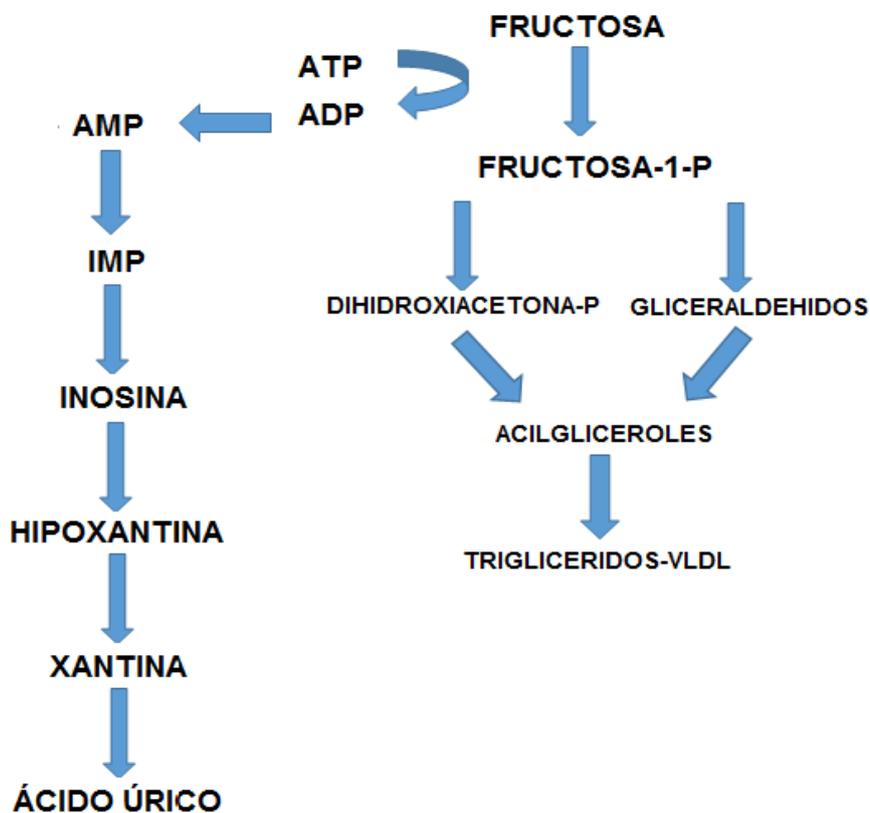


Figura 11. Vía para la degradación del AMP a ácido úrico durante la fosforilación de la fructosa en fructosa 1-fosfato. A alta concentración de fructosa, fructosa 1-fosfato se acumula con el consiguiente agotamiento de ATP y fosfato inorgánico (Pi). ATP: Adenosina trifosfato, ADP: Adenosina difosfato, AMP: Adenosina monofosfato, IMP: inosin monofosfato

Existen errores congénitos del metabolismo que pueden ocasionar elevaciones en las concentraciones séricas de ácido úrico. Durante la infancia no es posible detectarlo por técnicas de laboratorio, ni clínica, entonces es bueno conocer los antecedentes familiares para relacionarlos con la presencia de hiperuricemia en niños. ⁽⁵²⁻⁵⁴⁾

Sin embargo, se ha demostrado por métodos in vitro que, dependiendo de su microambiente químico, el ácido úrico puede actuar como agente pro oxidante. Por ejemplo, aunque el ácido úrico puede proteger las partículas de LDL nativas contra la oxidación inducida por Cu^{2+} , así mismo aumenta la oxidación de LDL ya oxidadas que contienen productos de la peroxidación de lípidos, es por esto que el ácido úrico con su efecto dual puede actuar como anti o pro oxidante dependiendo su microambiente como se muestra en la Figura 13. (50,54-55)

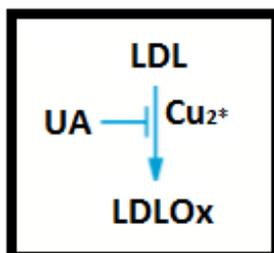


Figura 13. El ácido úrico puede evitar la oxidación de LDL inducida por Cu^{2+} , una reacción que puede proteger contra el desarrollo de aterosclerosis. UA: Ácido Úrico, LDL: Lipoproteína de baja densidad, LDLOx: Lipoproteína de baja densidad oxidada. Tomada y modificada de So A. 2010.

Cuando el ácido úrico se oxida por medio del peroxinitrito se producen los radicales de urato que pueden propagar el estado pro oxidante, pero en el plasma estos se inactivan rápidamente por la reacción con ácido ascórbico (Figura 14). (45,49)

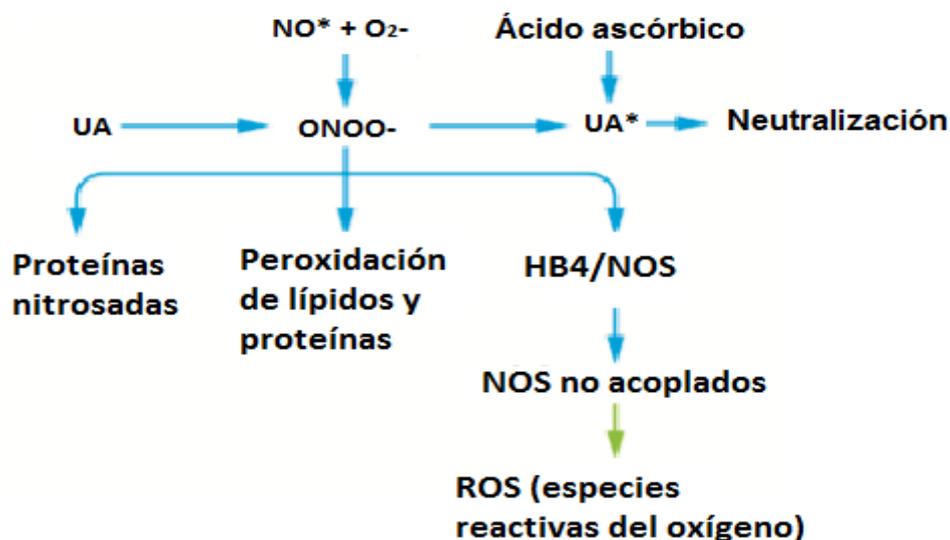


Figura 14. Efecto antioxidante y pro oxidante del ácido úrico. El peroxinitrito (ONOO^-) se produce a partir de la reacción de óxido nítrico ($\text{NO} \bullet$) con anión superóxido (O_2^-). El peroxinitrito puede inducir la nitrosación de proteínas y lípidos, la peroxidación de proteínas y el bloqueo de tetrahydrobiopterina (HB4), un cofactor necesario para la actividad de especies reactivas del nitrógeno (NOS). En ausencia de HB4, NOS produce especies reactivas del oxígeno (ROS). El ácido úrico (UA) es capaz de inactivar directamente al peroxinitrito mediante una reacción que genera radicales de ácido úrico ($\text{AU} \bullet$) y, estos pueden ser eliminados rápidamente por el ácido ascórbico en plasma. Tomada y modificada de So A. 2010.

Los uratos pueden reaccionar directamente con el óxido nítrico (NO) en condiciones aeróbicas para generar un producto de ácido úrico nitrosado inestable que puede transferir NO a otras moléculas tales como glutatión. ⁽⁵⁴⁻⁵⁵⁾

Otra de las acciones pro oxidante del urato se ha descrito durante la diferenciación adipogénica. Cuando se inducen estas células a diferenciarse en adipocitos, la adición de ácido úrico en concentraciones fisiológicas aumenta aún más la producción de ROS. ⁽⁵⁶⁾

Este efecto en los adipocitos puede participar en la inducción de la inflamación y la resistencia a la insulina del tejido adiposo observada en la obesidad. ^(50,54-57)

FUNDAMENTOS DE LA METODOLOGÍA

5.14 ADN, alteraciones y métodos de extracción.

La tarea de conservar la integridad del genoma humano es de suma importancia, ya que el ADN almacena la información necesaria para que cada célula del cuerpo funcione adecuadamente y sin alteraciones. Después del descubrimiento de la estructura del ADN por Watson y Crick se pensó que, dada su importancia, esta molécula era muy estable, sin embargo, actualmente se sabe que la estructura del ADN es intrínseca y peligrosamente inestable por lo cual puede sufrir alteraciones como son mutaciones (SNPs), deleciones, translocaciones y etc. Estas alteraciones se mantienen controladas solo gracias a la acción constante de un grupo de mecanismos complejos de reparación. ⁽⁵⁸⁾

Se ha estimado que la molécula de ADN de un individuo está formada por 3 billones de bases (A, T, G, C), y puede sufrir más de 30 mil eventos potencialmente dañinos por día. ⁽⁵⁸⁻⁵⁹⁾ El daño puede deberse a errores en procesos celulares normales, como los que surgen durante la síntesis de ADN.

Cada vez que una célula se divide se crea una copia exacta a la original por el proceso denominado replicación, en el cual por cada 10,000 pares de bases sintetizadas hay una posibilidad de que se cometa un error en el proceso. ⁽⁶⁰⁾

Otros factores importantes son los causados por los productos del metabolismo de las células, como la generación de especies reactivas del oxígeno. ^(50,54-57)

Después de que ocurre un daño al ADN, se modifican varias proteínas y enzimas no solo en cantidad sino también de manera estructural y funcionalidad. ⁽⁶⁰⁾

El ADN para su extracción requiere ser separado de los componentes de membrana, proteínas residuales y polisacáridos. Para evitar la degradación del ADN es necesario utilizar material libre de DNAsas (enzimas capaces de degradar al ADN) y manipulación cuidadosa.

El método clásico para la proteólisis utiliza proteinasa K y el fenol cloroformo para separación del ADN de las proteínas, lípidos e hidratos de carbono. ⁽⁶¹⁾

FUNDAMENTO DE LA EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO:

Se basa en la digestión de proteínas mediante la proteinasa K y la diferencia de polaridad de los ácidos nucleicos, proteínas, lipoproteínas y polisacáridos; además de la solubilidad de los ácidos nucleicos en solución acuosa. ⁽⁶¹⁾

En la correcta extracción de ADN se deben evitar los factores que favorezcan la degradación del material genético para evitar malas determinaciones y así tener un resultado erróneo.

Los factores que se deben considerar para evitar la degradación del ADN son:

- 1) Temperatura, es el factor que más condiciona la preservación del material genético. debido a que, a bajas temperaturas, se produce una ralentización de las reacciones químicas responsables de la degradación orgánica y las temperaturas elevadas puede favorecer la deshidratación parcial del ADN, deteniendo los procesos de hidrólisis. ⁽⁶¹⁻⁶²⁾
- 2) Humedad, con la acción disolvente de la humedad, se favorece la penetración de las sustancias orgánicas y esto incrementa la posibilidad de que el extracto de ADN presente moléculas inhibitoras.
- 3) pH, un pH neutro o ligeramente alcalino favorece la conservación del material genético. ⁽⁶¹⁻⁶²⁾

Métodos de extracción de ADN.

Extracción mediante disolventes orgánicos (Fenol: cloroformo)

Las muestras son digeridas con proteinasa K y un detergente como Triton X-100 o SDS, que rompe las membranas celulares. El digerido es mezclado con una solución de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:25:1), paso que es repetido hasta eliminar la coloración.

De la fase anterior de fenolización se descarta la fase orgánica. Dependiendo del protocolo aplicado, para eliminar las trazas de fenol, se puede añadir una solución de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). La fase acuosa, que contiene el ADN se trasvasa a un tubo limpio. A partir de este punto, el protocolo estándar incluye una fase de precipitación con acetato de amonio y etanol absoluto frío, pero los últimos protocolos desarrollados introducen la concentración en pequeños volúmenes usando sistemas de filtración por centrifugación.

Método de aislamiento usando el reactivo de TriPure®. ⁽⁶³⁾

Durante cada paso en el procedimiento de lisis-homogenización de la muestra el reactivo de aislamiento TriPure® rompe células y desnaturaliza nucleasas endógenas. Después el cloroformo es agregado para la extracción, la mezcla es centrifugada y separada en 3 fases mostradas en la Figura 15

- Una fase incolora o fase acuosa, fracción superior conteniendo al ARN
- Una interfase blanca conteniendo al ADN y proteínas
- Una fase roja, fase orgánica, fracción inferior conteniendo al ADN

El ADN se separa por precipitación a partir de la fase acuosa. ⁽⁶³⁾



Figura 15. Las diferentes fases de la mezcla son fácilmente identificadas con el colorante rojo contenido en el reactivo TriPure® y así facilita la identificación de los ácidos nucleicos y proteínas.

https://lifescience.roche.com/wcsstore/RASCatalogAssetStore/Articles/NAPI_Manual_page_156-163.pdf

Para determinar la pureza del ADN y ARN aislado se debe seguir el siguiente criterio:

- A_{260}/A_{280} de ARN = 1.81 - 2
- A_{260}/A_{280} de ADN = 1.6 - 1.8 ⁽⁶³⁾

Beneficios de la extracción de ADN con reactivo TriPure®

- Ahorro de tiempo en el ensayo, el aislamiento de ARN se lleva a cabo en 1 hora.
- Fácil de realizar, el colorante rojo ayuda a identificar las diferentes fases.
- Simplifica los protocolos de aislamiento, un solo reactivo puede ser usado para el aislamiento de ADN libre de ARN, ARN libre de ADN y proteínas

Separación en columnas QIAamp DNA Blood Midi/ Kit, Qiagen, Alemania Flexigene® DNA AGF3000

El buffer de lisis es agregado a la muestra (sangre, medio de cultivo o cultivo bacteriano) para romper las membranas celulares y nuclear. Por centrifugación se obtiene un botón (pellet) este botón se resuspende y se incuba en buffer de desnaturalización con una sal caotrópica y proteasa QIAGEN®. Este paso remueve eficientemente la contaminación por proteínas. El ADN es precipitado por la adición de isopropanol y recuperado por centrifugación, se lava el ADN obtenido con etanol al 70%, posteriormente es secado y resuspendido en buffer de hidratación. ⁽⁶⁴⁻⁶⁵⁾ La Figura 16 resume la metodología empleada en esta extracción de ADN.

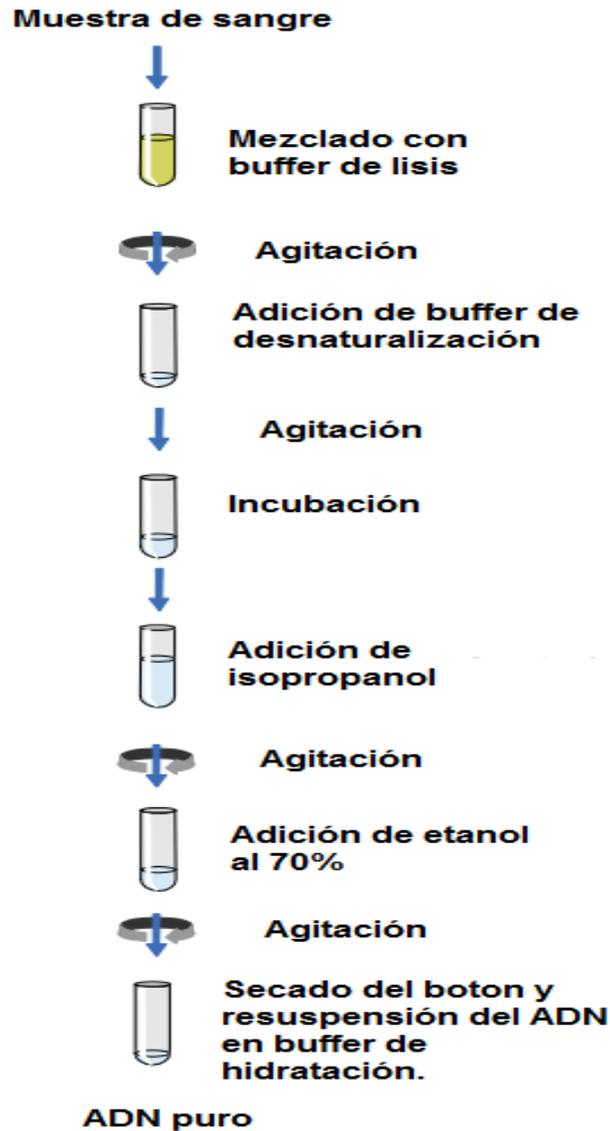


Figura 16. Metodología de la extracción de ADN con el kit FlexiGene © DNA AGF 3000. De QIAGEN. <https://www.qiagen.com/mx/?redirect=%2fliterature%2frender.aspx%3fid%3d269>

5.15 Reacción de la polimerasa en cadena (PCR).

La reacción de la polimerasa en cadena, cuyas iniciales en inglés son PCR ("polymerase chain reaction"), es una técnica revolucionaria que fue desarrollada por Mullis y Faloona a mediados de 1985. ⁽⁶⁶⁻⁶⁷⁾ Con esta técnica se pueden producir en el laboratorio múltiples copias de un fragmento de ADN específico como templete iniciador, esta técnica se basa en la capacidad de la enzima ADN polimerasa de fabricar una cadena de ADN complementaria a otra ya existente. ⁽⁶⁷⁾

Básicamente, la PCR emula in vitro el proceso de síntesis de ADN que tiene lugar en la naturaleza, amplificando fragmentos de ácidos nucleicos de forma exponencial en horas. El proceso se lleva a cabo de forma cíclica en un equipo llamado termociclador el cual en forma cíclica cambia la temperatura de la reacción, y cada uno de los ciclos consta de tres fases. ⁽⁶⁶⁻⁶⁸⁾ En la primera fase o fase de desnaturalización, éste se calienta a 95-98° C durante 30-90

segundos, debido a la sensibilidad del ADN a temperaturas elevadas se logran romper los puentes de hidrógeno que mantienen unidas las dos hebras del ADN y éstas se separan. A continuación, en la fase de acoplamiento los iniciadores o cebadores, que son moléculas de ADN monocatenario, previamente diseñadas, se unen al lugar complementario de la hebra del ADN diana, desnaturalizado previamente. ⁽⁶⁶⁻⁶⁸⁾ Esta fase tiene lugar a una temperatura entre 45 y 65° C durante 30-90 segundos y requiere forzosamente de los iniciadores porque todas las polimerasas necesitan un fragmento de cadena de ADN que les indique dónde comenzar a incorporar nucleótidos libres contenidos en la mezcla de reacción (dNTPs). ⁽⁶⁶⁻⁶⁹⁾

Finalmente, una vez acoplados los iniciadores al ADN diana, la ADN polimerasa comienza a actuar incorporando los dNTPs presentes en la mezcla y sintetizando así una copia idéntica de cada una de las dos hebras del ADN diana (Figura 17). Esta última fase del proceso tiene lugar a 70-75° C durante 30-180 segundos. Este proceso se repite n veces, de tal manera que en condiciones ideales se obtendrían 2^n (n=número de ciclos) copias de la región adyacente a la zona complementaria a los iniciadores.

EJEMPLO: Si se tiene una amplificación después de 30 ciclos se obtendrán 2^{30} lo que es lo mismo a 1,073,741,824 copias.

Sus únicos requerimientos son que existan nucleótidos en el medio (dNTPS) que son la materia base para fabricar el ADN (los nucleótidos de adenina, timina, citosina y guanina), una pequeña cadena de ADN que pueda unirse a la molécula que queremos copiar para que sirva como iniciador, cebador o "primer", ⁽⁶⁶⁾ enzima polimerasa termoestable tal como Taq polimerasa y soluciones amortiguadoras (Buffers) que contengan ion magnesio el cual es necesario para la actividad de la enzima polimerasa. Estos reactivos se mezclan en un tubo pequeño con un volumen final de 10 a 50 μL . ⁽⁶⁷⁻⁶⁸⁾

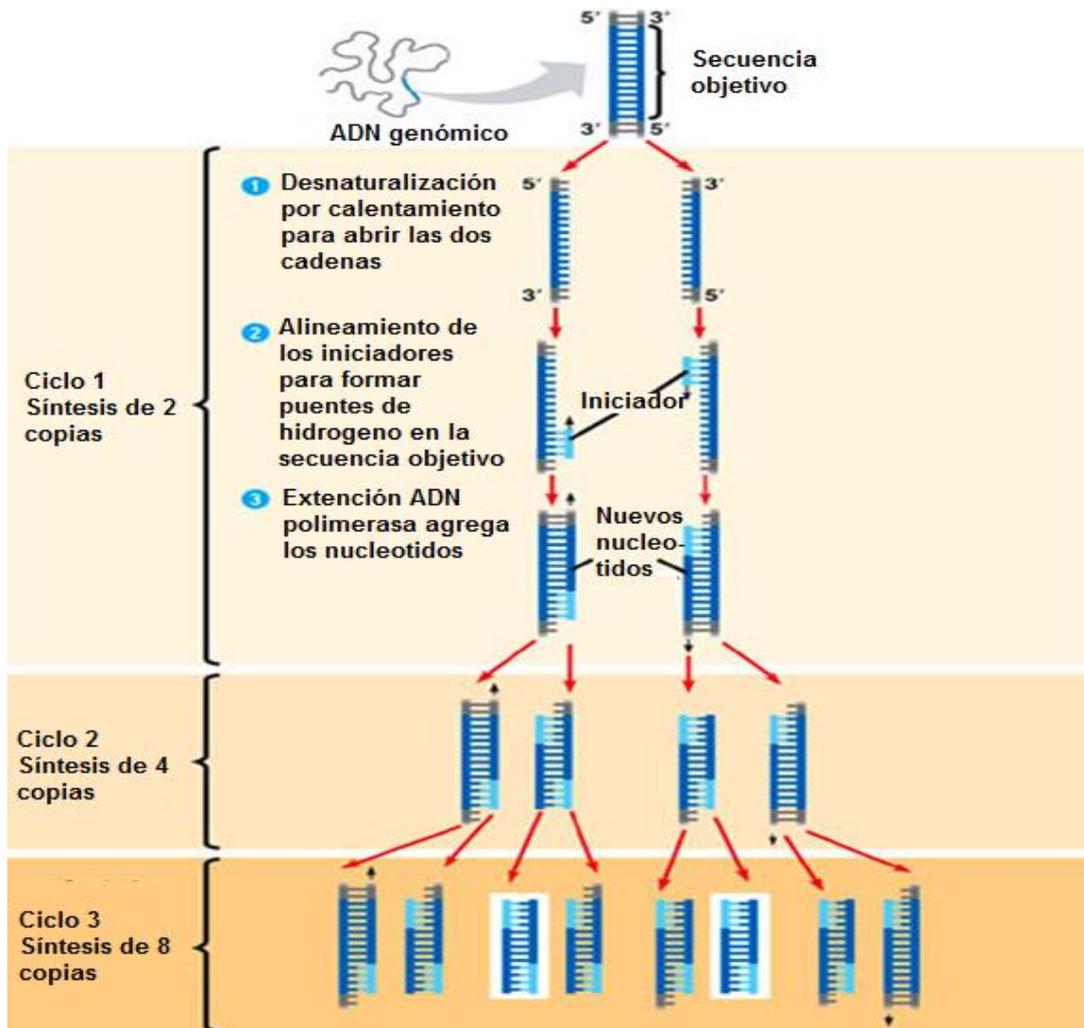


Figura 17. Forma en la que el ADN es amplificado con el Método de PCR a partir de ADN genómico. <http://mediosantropologicos2.blogspot.mx/2012/03/adn-antiguo-y-su-estudio-en-el-campo-de.html?view=classic>

DESVENTAJAS DE LA PCR:

- Técnica no cuantitativa solo cualitativa.
- Alta probabilidad de obtener falsos positivos por contaminación (primer dimers)
- Se debe tener un gran cuidado con el manejo de temperaturas para que el cebador (primer) se una al ADN en la localización correcta.

Para resolver el problema de la cuantificación en la PCR común (PCR DE PUNTO FINAL) se han generado variaciones sobre el esquema inicial de la PCR, dando lugar a lo que se conoce como PCR cuantitativa o PCR en tiempo real. Recordando que la PCR DE PUNTO FINAL solo permite identificar, mientras que la PCR EN TIEMPO REAL cuantifica e identifica. ⁽⁶⁹⁾

5.15.1 PCR en tiempo real o PCR cuantitativa.

Un punto clave en la PCR cuantitativa es la posibilidad de detectar en tiempo real la amplificación de nuestro genoma de interés. Para llevar a cabo esta detección existen varios métodos, casi todos basados en la utilización de otro

fragmento de ADN (sonda) complementario a una parte intermedia del ADN que queremos amplificar. (69-71)

En 1991 surgió el primer trabajo introduciendo el uso de la actividad 5'-3' exonucleasa de la enzima Taq polimerasa, utilizando una sonda marcada con fosforo radiactivo para cuantificar secuencias específicas de VIH. (70-72)

Esta sonda constituida por una secuencia de 13 a 18 nucleótidos lleva adherida una molécula fluorescente en el extremo 5' mejor conocida como "reportero" y otra molécula que inhibe esta fluorescencia en el extremo 3' mejor conocido como "quencher" o apagador, de tal manera que cuando estas dos moléculas se encuentran unidas en una misma secuencia de ADN y a una distancia determinada, toda la energía emitida en forma de fluorescencia por el reportero, es absorbida por el apagador mediante el fenómeno de FRET (Fluorescent Resonant Energy Transfer, por sus siglas en inglés). (73-74)

De tal forma que sólo cuando la sonda es "rota" o desplazada de su sitio mediante la actividad exonucleasa del ADN polimerasa, la molécula fluorescente se libera de la acción del "quencher" y emite fluorescencia al ser iluminada con un láser que la excite, como lo muestra la Figura 18. (74) La cuantificación de la fluorescencia emitida durante cada ciclo de la PCR será proporcional a la cantidad de ADN que se está amplificando

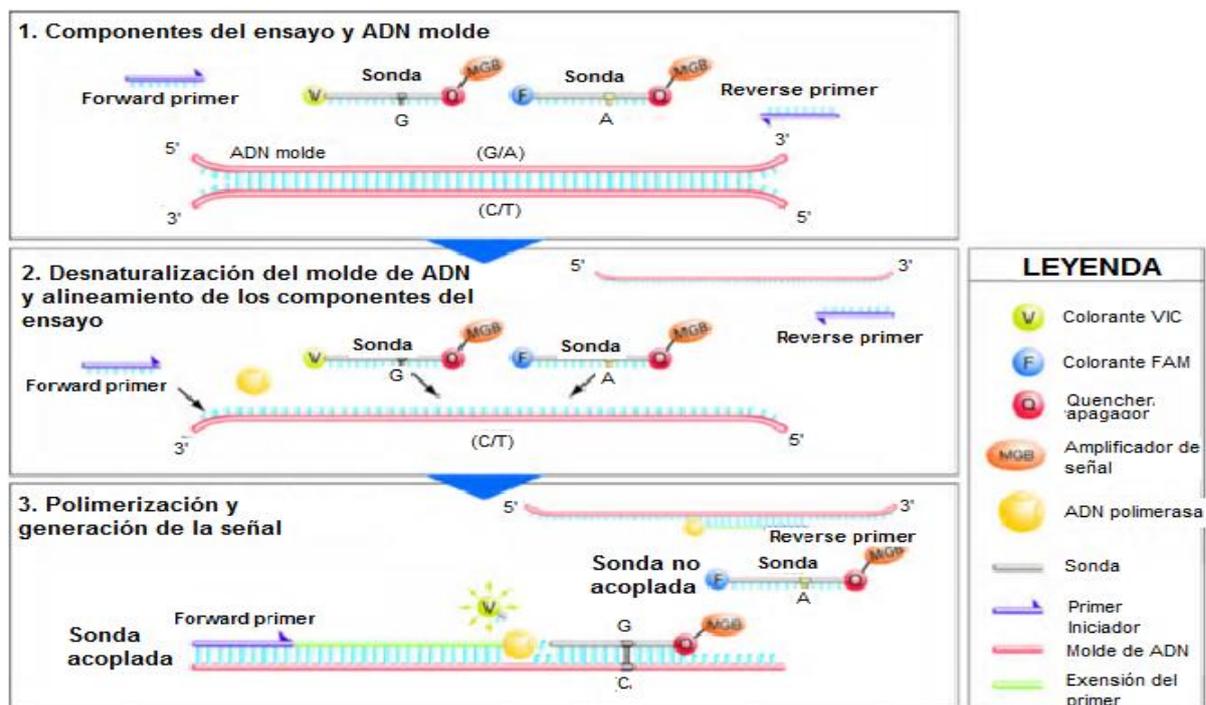


Figura 18. Ensayo de PCR en tiempo real mediante la tecnología Taqman®, se utiliza una sonda que se une a una región específica del ADN, que al ser separada por la ADN polimerasa durante la amplificación, emite fluorescencia. Se observa como solo la sonda marcada con colorante VIC es degradada ya que es específica para ese alelo, mientras que la sonda marcada con colorante FAM no se une, esto debido a que no es específica para la secuencia de nucleótidos en la cadena de ADN molde. De esta forma, un aumento en la señal de fluorescencia de los reporteros indicará homocigocidad para el nucleótido dimórfico que reporta la fluorescencia específica. Si se observa fluorescencia de ambos reporteros esto indicará heterocigocidad.

https://www.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_039282.pdf

Consideraciones para realizar un ensayo de PCR en tiempo real:

- Tipo de muestra: sangre, plasma, suero, esputo, orina, LCR, etc.
- Procesamiento de la muestra recogida en tubos con EDTA, citrato, heparina.
- Cantidad mínima de muestra a manejar
- Presencia o ausencia de inhibidores de la amplificación ⁽⁷⁴⁻⁷⁵⁾
- Características de los ácidos nucleicos, ARN versus ADN, Doble cadena versus cadena sencilla.

VENTAJAS:

- Alta sensibilidad y especificidad.
- Permite cuantificar el producto exponencial de una amplificación de ADN
- Puede generar amplicones pequeños (desde 60 pb).
- El proceso completo se realiza en el termociclador lo cual disminuye la posibilidad de contaminación y aumenta el rendimiento

DESVENTAJAS:

- Se debe utilizar ADN como secuencia diana
- Puede haber presencia de Primer-dimers

Los productos de PCR, una vez sintetizados, pueden ser analizados de diferentes formas. El método más sencillo es la visualización de fragmentos de ADN mediante gel de electroforesis, utilizando geles de agarosa o acrilamida. Otros métodos de detección incluyen hibridación con sondas radiactivas o marcadores fluorescentes (Taqman y SYBR) ⁽⁷²⁻⁷⁵⁾

Marcadores Fluorescentes para detección en PCR en tiempo real.

Los primeros ensayos efectuados en tiempo real fueron reportados por Higuchi en 1993, utilizando bromuro de etidio como agente intercalante, utilizando un termociclador modificado que permitía irradiar las muestras con luz ultravioleta y detectar fluorescencia mediante una cámara de video. Con esta técnica se efectuaron los primeros ensayos de tiempo real, sin embargo, existían muchas desventajas como: la baja sensibilidad del bromuro de etidio, el riesgo a la salud que implica trabajar con este reactivo, etc. ⁽⁷⁶⁾

Las características que los agentes detectores o reporteros deben cumplir son: Primero que la fluorescencia generada sea directamente proporcional al número de copias obtenidas en cada ciclo de PCR y segundo, que esta molécula fluorescente no inhiba la PCR o disminuya la eficiencia de la amplificación.

Existen dos clases principales de marcadores fluorescentes para la PCR en tiempo real: específicos y genéricos.

- A) **ESPECÍFICOS:** Emplean sondas de ácidos nucleicos que se unen a amplicones específicos (producto de PCR).

La mayoría de estas sondas usan el fenómeno FRET para emitir las señales luminosas que se van a medir en el termociclador a medida que se obtenga el producto de la PCR. ⁽⁷¹⁻⁷⁶⁾

VENTAJAS:

- Detección de fluorescencia fácil
- Permite identificar genotipos y polimorfismos

DESVENTAJAS:

- Diseño de sondas específicas
- Costosos y laboriosos de diseñar

B) GENÉRICOS: La detección genérica se basa en la utilización de colorantes que se incorporan a todas las secuencias de doble cadena de ADN en una reacción de PCR. Una vez que el colorante se une al ácido nucleico formado en la reacción y al ser excitado mediante una fuente luminosa (rayo láser), emite una señal fluorescente que se procesa en tiempo real. ⁽⁷⁴⁾ Los más utilizados son los colorantes SYBR[®] Green y SYBR[®] Gold ⁽⁷³⁻⁷⁴⁾

VENTAJAS:

- Económicos
- Distribuidos fácilmente
- No necesita un diseño especial

DESVENTAJAS:

- No puede identificar genotipos ni polimorfismos
- Requiere de mucho tiempo para el analista
- Gasto alto de reactivos para optimizar la técnica

La principal limitación de estos marcadores es que, al unirse al total de ácidos nucleicos en la reacción de la PCR, emiten una señal luminosa tanto para productos específicos como para aquellos que no lo son (primer-dimers) como lo muestra la Figura 19.

Para hacer frente a esta situación se debe realizar un análisis de los resultados en la curva de fusión (Melting Curve). Este análisis permite que los productos no específicos puedan ser discriminados de los amplicones específicos ⁽⁶⁷⁻⁶⁹⁾

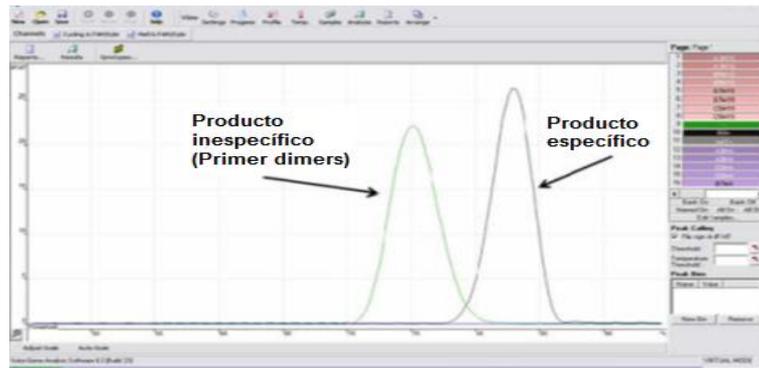


Figura 19. Análisis de la curva de fusión. Los picos de las curvas muestran que los productos específicos de la PCR en tiempo real tienen una temperatura de fusión mayor a la de productos inespecíficos. <http://www.sigmaaldrich.com/technicaldocuments/articles/biology/assay-optimization-and-validation.html>

5.16 Equilibrio HARDY-WEINBERG.

El equilibrio de Hardy-Weinberg, es también conocido como equilibrio panmítico, fue estudiado a principios del siglo 20 por diferentes autores, pero fueron Hardy, un matemático y Weinberg, un físico quienes lo establecieron.

Este modelo se utiliza para calcular las frecuencias genotípicas a partir de las frecuencias alélicas. ⁽⁷⁷⁻⁷⁸⁾

El equilibrio de Hardy-Weinberg es un modelo teórico para genética de poblaciones y se basa en las siguientes hipótesis:

1. La población es panmítica, todos los individuos tienen la misma probabilidad de aparearse y el apareamiento es al azar (panmixia).
2. La población es suficientemente grande o infinita (para minimizar las diferencias existentes entre los individuos).
3. La población no está sometida a migración, mutación o selección (no hay pérdida ni ganancia de alelos).
4. Las frecuencias génicas y genotípicas se mantienen constantes de generación en generación. ⁽⁷⁷⁻⁷⁹⁾

Bajo estas circunstancias las poblaciones genéticas se mantienen en equilibrio.

Se considera que:

p es la frecuencia del alelo A1, $0 \leq p \leq 1$.

q es la frecuencia del alelo A2, $0 \leq q \leq 1$ y $p + q = 1$.

Proponiendo la siguiente ecuación: $(p + q)^2 = p^2 + 2pq + q^2 = 1$

Donde:

p^2 = frecuencia del genotipo A1 es HOMOCIGOTO al alelo 1
 $2pq$ = frecuencia del genotipo A1 y A2 es HETEROCIGOTO al alelo 1 y 2
 q^2 = frecuencia del genotipo A2 es HOMOCIGOTO al alelo 2. (Figura 20)

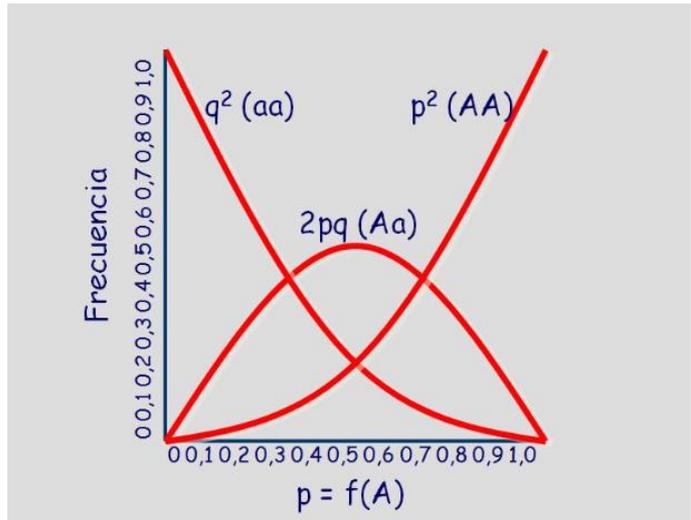


Figura 20. Gráfica con la cual se comprueba el equilibrio de Hardy–Weinberg para los homocigotos al alelo A, heterocigotos al alelo Aa y los homocigotos al alelo a. <http://bioinformatica.uab.es/base/base3.asp?sitio=geneticapoblaciones&anar=concep&item=Hardy-Weinberg>

Para un gen autosómico, dialélico (Alelos A1 y A2) Consideremos:

Las frecuencias de los genotipo F(G) llamadas D, H, y R con $0 \leq [D,H,R] \leq 1$ y $D + H + R = 1$

Las frecuencias de los alelos F(A) llamadas p, y q con $0 \leq [p,q] \leq 1$ y $p+q = 1$.

Genotipos	A1 A1	A1 A2	A2 A2
Numero de sujetos	DN	HN	RN
Frecuencias	D	H	N

Frecuencias alélicas F(A)	$A1 D + H/2 = p$	
	$A2 R + H/2 = q$	con $p+q=1$

OBSERVACIONES:

- Las frecuencias genotípicas F(G) pueden utilizarse para calcular frecuencias alélicas F(A).

5.17 Electroforesis de ácidos nucleicos.

El principio básico de la electroforesis consiste en la migración de las moléculas a través de un gel u otro tipo de matriz de naturaleza porosa (agarosa, poliacrilamida), en el cual, por acción de un campo eléctrico, serán separadas de acuerdo a su carga, tamaño y peso molecular. Para controlar el avance de la separación de las moléculas en la matriz y establecer un patrón de fragmentos, las moléculas deberán ser teñidas con diferentes colorantes. Estos pasos facilitan la visualización de las moléculas a manera de simples bandas las cuales serán posteriormente analizadas e interpretadas.

La electroforesis en gel de agarosa o poliacrilamida es el método estándar para separar, identificar y purificar fragmentos de ADN. La técnica es simple, rápida de desarrollar y capaz de separar fragmentos de ADN que no son capaces de separar por otros métodos. La técnica puede localizar fragmentos de ADN con la presencia de bajas concentraciones de un colorante fluorescente intercalado en la secuencia y estos pueden ser detectados iluminando el gel con luz ultravioleta. ⁽⁸⁰⁾

Los gels de agarosa y poliacrilamida pueden ser de muchas formas y tamaños según el propósito del ensayo, los gels de poliacrilamida son más efectivos para separar pequeños fragmentos de ADN (5-500 pb) pero son más difíciles de elaborar, mientras que, la agarosa sirve para separar grandes fragmentos de ADN (200 pb-5000 pb). La Figura 21 muestra los componentes necesarios para el corrimiento del gel de agarosa.

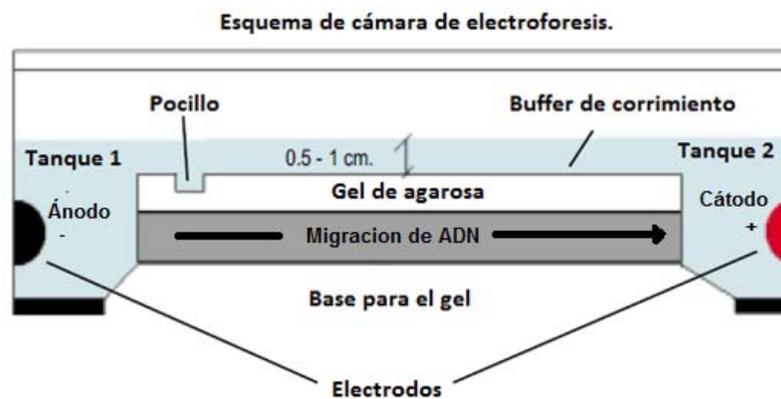


Figura 21. Esquema de corrimiento de ácidos nucleicos en gel de agarosa.

5.18 Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA)

Es una técnica de laboratorio para la identificación y cuantificación de antígenos específicos o anticuerpos en células lisadas, suero u otras matrices biológicas. Además, por su fácil estandarización, manejo y variedad de antígenos disponibles, ha desplazado notablemente a otras técnicas como el radioinmunoensayo. En este simple ensayo, llamado ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay, por sus

siglas en inglés) una fase sólida sirve de soporte, un ejemplo es el poliestireno que es utilizado para capturar los antígenos analizados, cuando este se ha unido al anticuerpo ligado a una enzima provocará que al agregar un sustrato degradable por la enzima encontrada en el anticuerpo se desarrolle un producto colorido.

El producto colorido resultante puede ser medido directamente del plato que actúa como soporte. El incremento en la densidad óptica durante la reacción es directamente proporcional a la concentración de la muestra. Con ayuda de una curva estándar puede determinarse la concentración original de la muestra. La alta sensibilidad y especificidad de la técnica ELISA es comparable con la técnica de Radioinmunoensayo (RIA) a excepción de que ELISA no utiliza isótopos radiactivos.

Existen variaciones para la técnica de ELISA como son: ELISA en sándwich, ELISA directa, ELISA indirecta y ELISA de competitividad. El más utilizado en el laboratorio de diagnóstico de autoinmunidad es el ELISA indirecto, el cual se fundamenta en el reconocimiento de los anticuerpos específicos presentes en las muestras de los pacientes, mediante un anticuerpo dirigido contra la región Fc humana de cualquier isotipo (IgG, IgA o IgM).⁽⁸¹⁾ Los anticuerpos anti-Fc están unidos a enzimas como la peroxidasa o la fosfatasa alcalina. En este trabajo se utilizó una ELISA en Sándwich con anticuerpos contra LDLox-CML como anticuerpo primario y Anti APOB-100 como anticuerpo secundario.⁽⁸²⁾

6. Planteamiento del problema

Actualmente a nivel mundial hay una gran cantidad de síndromes metabólicos encontrados en la población infantil y adolescente, esto provoca problemas de sobrepeso y obesidad en diferentes grados. Dichos desórdenes pueden ser provocados por una serie de factores de riesgo como el sedentarismo, una mala alimentación o una predisposición genética. Las variantes polimórficas en genes asociados con la respuesta antioxidante han explicado parcialmente las diferencias en la evolución de las enfermedades, la respuesta a fármacos e inclusive la remisión de las mismas. Uno de los genes más promisorios es PON1, cuyos polimorfismos han sido reportados en una diversidad de enfermedades (diabetes, cáncer y aterosclerosis, entre otras).

Existen escasos estudios en niños que relacionen los polimorfismos de la enzima Paraoxonasa (192 Q/R y 55 L/M) con dislipidemia y ácido úrico que se encuentran alterados en la obesidad. Por lo cual, en el presente trabajo se estudió la relación entre dichos polimorfismos y los desórdenes metabólicos en niños mexicanos.

7. Hipótesis

Se espera encontrar que los polimorfismos 192 Q/R y 55 L/M predispongan a los niños a presentar diversas alteraciones metabólicas, como la obesidad, además se espera que estos polimorfismos se asocien con alteraciones en el perfil bioquímico y con malos hábitos alimenticios, comparados con los niños portadores de los genotipos complementarios.

8. Objetivos

General:

- Determinar si los polimorfismos 192 Q/R y 55 L/M del gen PON1 se relacionan con las concentraciones séricas de triglicéridos, colesterol, HDL-C, LDL-C y ácido úrico, en una población de niños eutróficos y obesos mexicanos.

Particulares:

- Determinar la presencia de los polimorfismos 192 Q/R y 55 L/M del gen PON1 en los niños eutróficos y obesos y si en éstos dos grupos se presentan diferencias en las frecuencias alélicas de dichos polimorfismos.
- Evaluar el perfil bioquímico, incluido el ácido úrico en muestras sanguíneas de los niños eutróficos y obesos.
- Analizar si existe asociación entre los polimorfismos 192 Q/R y 55 L/M del gen PON1 y parámetros del perfil bioquímico.

9. Metodología.

Diseño experimental

9.1 Tipo de estudio:

Estudio transversal, se realizó la medición de peso y talla a los niños para identificar los casos de peso saludable y obesidad. Prospectivo, comparativo.

9.2 Universo de estudio:

Se incluyeron niños de ambos géneros de 6 a 12 años de edad que acudan a las Unidades Deportivas del IMSS en la zona metropolitana de la Ciudad de México.

9.3 Criterios de inclusión:

Niños clínicamente sanos, de ambos sexos, con edades de 6 a 12 años, que acudan a realizar deporte en las unidades deportivas del IMSS, previo llenado de los cuestionarios auto aplicables y firma de la Carta de Consentimiento Informado (CCI) por parte de los padres autorizando tanto la medición como la inclusión de sus hijos en el estudio, y la carta de asentimiento por parte de los niños con 8 o más años de edad.

9.4 Criterios de no inclusión:

Niños que al momento del estudio se encuentren con:

- 1) Alguna enfermedad infecciosa aguda
- 2) Que presenten alguna enfermedad crónica como alergias y enfermedades autoinmunes
- 3) Que estén participando en un programa de reducción de peso, con o sin tratamiento farmacológico.

9.5 Criterios de eliminación:

Niños que no acepten participar en el estudio.

9.6 Obtención de muestras para los estudios bioquímicos:

A los participantes se les tomaron muestras de sangre venosa (15 mL) por venopunción, con previo ayuno de 12 horas. La muestra se preservó en refrigeración hasta la separación del suero por centrifugación a 3,500 x g por 10 minutos, el cual se utilizó para las determinaciones bioquímicas. El suero se congeló a -70°C, hasta su análisis. El paquete globular obtenido de la centrifugación de sangre colectada en un tubo con EDTA, se destinó para la extracción del ADN para su genotipificación.

9.7 Clasificación de niños eutróficos y obesos.

La definición ideal de obesidad se basa tanto en el porcentaje de grasa corporal, como en el índice de masa corporal o IMC, éste último se calcula mediante la fórmula. $IMC = \text{peso corporal (Kg)} / \text{estatura (m}^2\text{)}$, que es utilizado como un método estandarizado. Se clasificó a los niños de acuerdo a su percentil de IMC de acuerdo a la referencia de los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés) 2000 (Atlanta, GA) ⁽⁸³⁻⁸⁴⁾

El estatus eutrófico se considera si IMC está entre los percentiles (Pc) 25 y 75 y estatus obeso cuando el $IMC > 95$ Pc. Serán excluidos del estudio los niños con sobrepeso (IMC entre 75Pc y 95Pc) y con bajo peso ($IMC < 25$ Pc). ⁽⁸³⁻⁸⁵⁾

9.8 Definición del perfil bioquímico.

Se considera que los siguientes parámetros se encuentran alterados si: Los triglicéridos \geq del percentil 90 de acuerdo a edad y sexo. El colesterol-HDL $<$ del percentil 10 para edad y sexo de acuerdo al panel de expertos para el diagnóstico de dislipidemias en niños; glucemia de ayuno ≥ 100 mg/dL. La resistencia a la insulina se calcula de acuerdo al método de HOMA-IR (Homeostasis Model Assessment: $\text{glucosa en ayuno mg/dL} \times \text{insulina en ayuno } \mu\text{U/ml} / 405$). Se considera resistencia a la insulina a partir del punto de corte de 3.4 para HOMA-IR, el cual corresponde al percentil 90 en una población de niños sanos.

9.9 Determinación de parámetros bioquímicos.

La determinación de valores séricos de colesterol, HDL, LDL, triglicéridos y ácido úrico se realizó con el equipo Instrumentation laboratory IL650 (Instrumentation Laboratory SpA, España) Figura 22. Utilizando los reactivos necesarios para la determinación y los multicalibradores (REFERRIL G) y los controles (SeraChem control 1 y 2) suministradas por el proveedor del equipo.



Figura 22. Equipo Instrumentation Laboratory 650.

9. 10 Extracción de ADN genómico de muestras de sangre total.

El aislamiento del ADN se realizó a partir de las células mononucleares de sangre periférica por el método basado en la separación en columnas (QIAamp DNA Blood Midi/ Kit, Qiagen, Alemania).⁽⁶⁴⁾ La integridad, pureza y concentración se evaluó por espectrofotometría a 260/280 nm (ver página 36-37) y fraccionamiento electroforético en geles de agarosa al 2.0 % teñidos con Gel Red Nucleic Acid Stain® (Life Technologies, USA).

9. 11 Genotipificación de los polimorfismos del gen PON1.

La determinación de las frecuencias de los polimorfismos 192 Q/R y 55 L/M de PON1 se realizó usando sondas TaqMan® fluorescentes que detectan el alelo 1 (ancestral) o el alelo 2 (variante) por medio de PCR en tiempo real,⁽⁶⁹⁻⁷⁴⁾ utilizando la tecnología de Applied Biosystems Inc (Foster City, CA, USA) (www.appliedbiosystems.com), con el equipo ABI Prism 7900HT (Figura 23 y 24), las sondas se diseñaron por Applied Biosystems. Empleando el banco de secuencias GenBank⁽⁸⁵⁾ se logró la identificación exacta del punto en el cual se encuentran los SNPs como lo muestra la Tabla 3.

POLIMORFISMO	PON-1 POSICION 192	PON-1 POSICION 55
Código del polimorfismo	rs662	rs854560
Exón	6	3
Cambio de base	CAA por CGA	TTG por ATG
Cambio de aminoácido	Glutamina por Arginina	Leucina por Metionina

Tabla 3. Resultado de la búsqueda de los polimorfismos de interés en GenBank.

Los datos se analizaron por medio del software del equipo para obtener la frecuencia de homocigotos para cada alelo 1 o 2 y de heterocigotos. Para los datos obtenidos de SNPs se evaluó si existe equilibrio de Hardy–Weinberg con el programa Popgene v1.32 (University of Alberta, Canada).



Figura 23. ABI Prism 7900HT utilizado para la PCR en tiempo real y la genotipificación del ensayo.
http://cgs.hku.hk/portal/files/CGS/Genomics/Realtime-PCR/7900ht_hardware.jpg

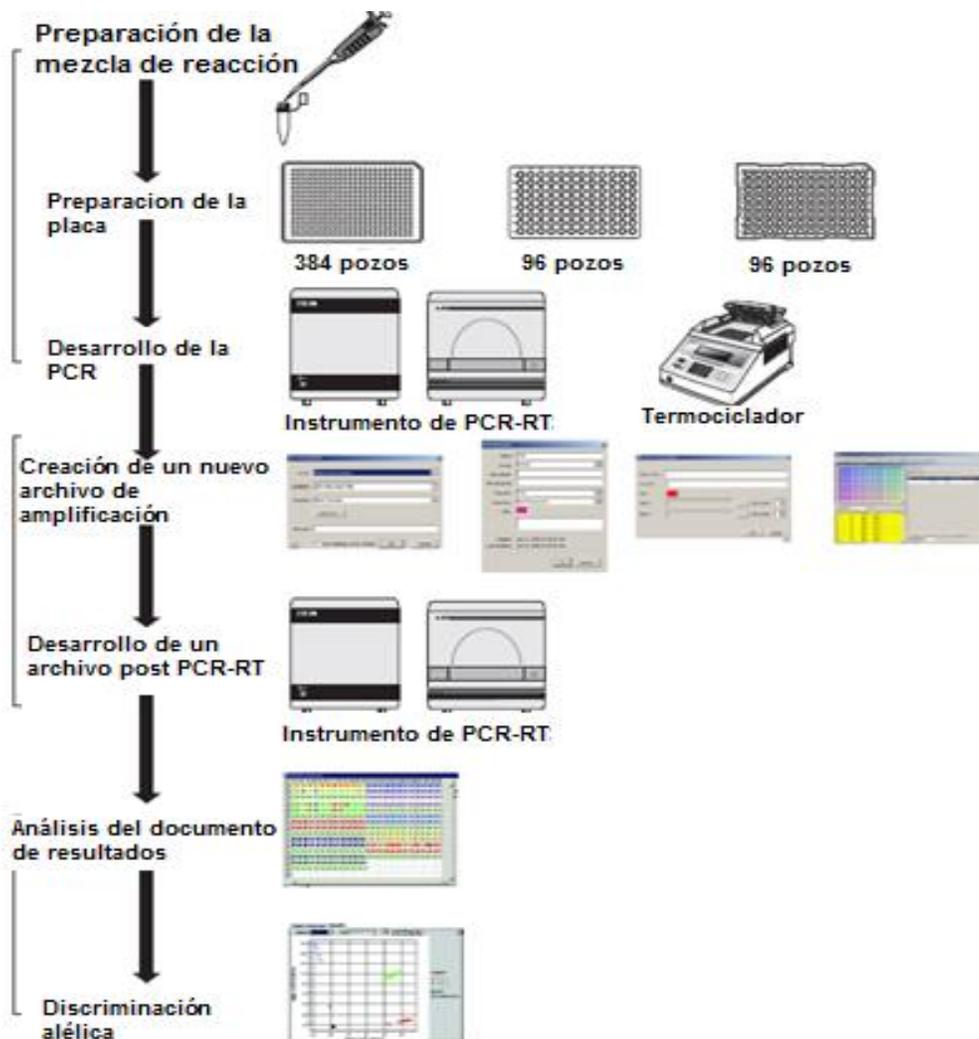


Figura 24. Diagrama de preparación de la muestra, carga de la placa de reacción con Master mix, sonda Taqman® y ADN molde para la amplificación de ADN y análisis del producto de PCR mediante software proporcionado por APPLIED BIOSYSTEMS
https://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_039282.pdf

Condiciones de PCR.

Paso	Temperatura °C	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización Inicial	95	10 min	1
Desnaturalización	95	15 seg	40
Alineamiento	60	30 seg	
Extensión	72	30 seg	

Tabla 4. Condiciones de PCR empleadas para la amplificación del ensayo.

9.12 Electroforesis en geles de agarosa.

Etapa	Descripción
1	Obtención de material de amplificación por PCR-RT
2	Preparación del gel de agarosa al 2% con reactivo de tinción (300 mg de agarosa en 30 mL de TBE 1X + 1µL de Gel Stain Rain®)
3	Preparación de las muestras con buffer de carga (1µL de ADN + 1µL buffer)
4	Carga de las muestras con el buffer de carga en el gel de agarosa al 2%.
5	Corrida del gel a 65 volts por 45 minutos
6	Visualización del gel con transiluminador Gel Doc 2000 de BIORAD y análisis de resultados.

Tabla 5. Procedimiento para realizar Electroforesis en geles de agarosa.

9.13 Cuantificación de LDLox por ELISA con el kit OxiSelect™ Human Oxidized LDL ELISA CML-LDL Quantitation. CELL BIOLABS, INC.

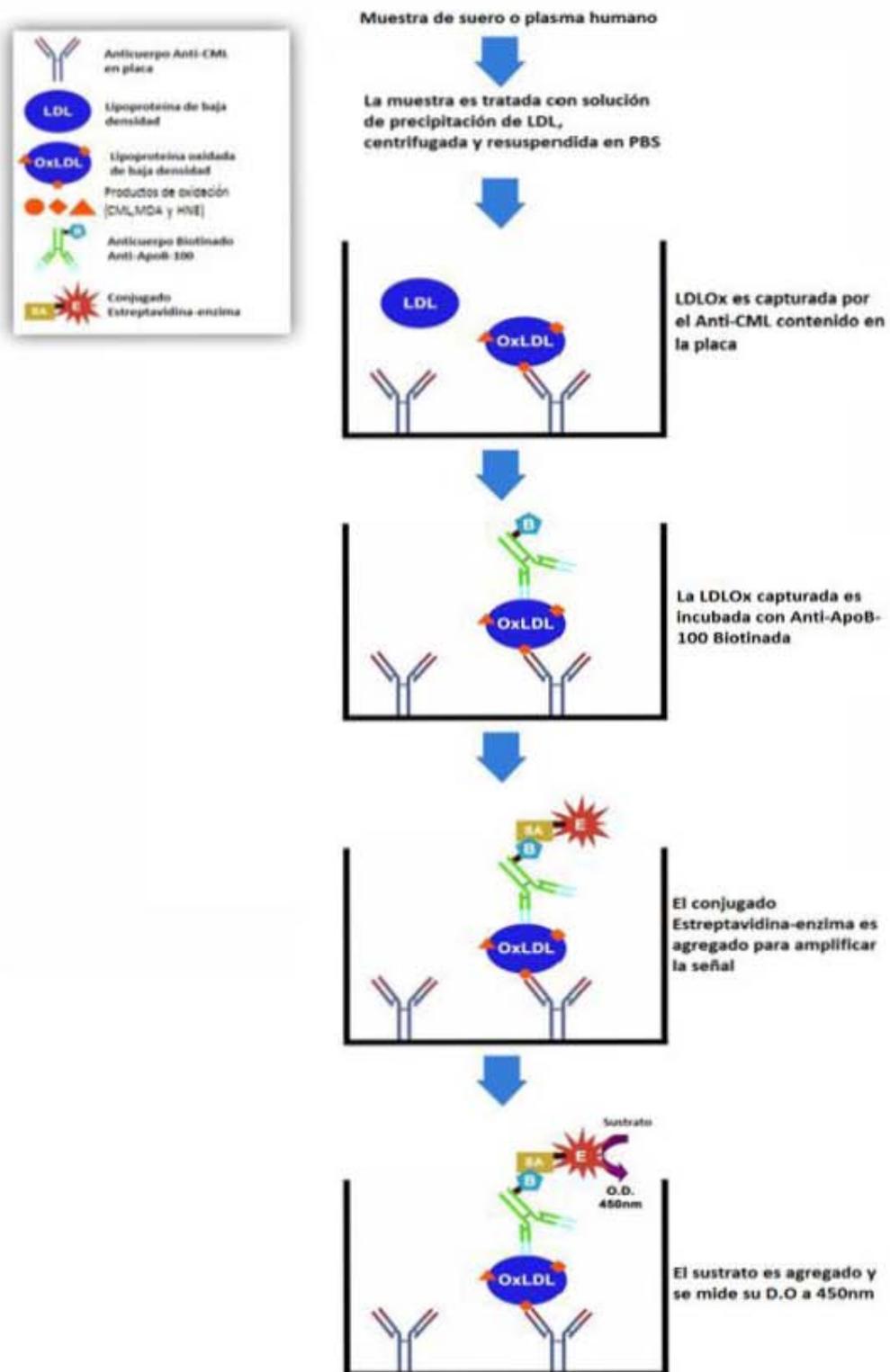


Figura 25. Protocolo para cuantificación de LDLox proporcionado por el proveedor.

9.14 Actividad Enzimática PON/ARE.

La actividad enzimática de PON y ARE fue realizada por el proyecto de titulación denominado “Asociación de la actividad enzimática de Paraoxonasa (1) y Arilesterasa (ARE) con el perfil de lípidos y con la resistencia a la insulina en niños eutróficos y obesos” del alumno Bandera Maqueda Miguel Ángel. UNAM FES Cuautitlan.

9.15 Análisis estadístico.

Análisis exploratorio. Se efectuó un análisis exploratorio con todas las variables a fin de identificar la naturaleza de su distribución. Aquellas variables continuas que no tuvieron una distribución normal fueron sometidas a distintas transformaciones hasta obtenerse una distribución normal, si no fue posible se analizaron con métodos no paramétricos.

Para los datos obtenidos de los SNPs se evaluó si existe equilibrio de Hardy-Weinberg con el programa Popgene v1.32 (University of Alberta, Canada).

Se compararon los resultados de las mediciones bioquímicas entre los sujetos según su condición nutricional (eutrófico y obeso), usando pruebas “t” de Student y análisis de varianza de dos vías (o equivalentes no paramétricos, Mann-Whitney o Kruskal-Wallis). Se estimó la correlación entre el IMC y el perímetro de la cintura con los datos de laboratorio (perfil bioquímico y actividad de paraoxonasa/arilesterasa) por el coeficiente de correlación de Pearson.

Análisis multivariado. Se realizó un análisis multivariado incluyendo a las variables confusoras (edad y género) mediante un modelo de regresión logística no condicional, para variables dependientes discretas, y un modelo de regresión lineal para las variables dependientes continuas. En el modelo se integraron los resultados del perfil bioquímico, estado de estrés oxidativo, LDLox, actividad de paraoxonasa/arilesterasa, presión arterial, IMC y perímetro de la cintura. Todos estos análisis se llevaron a cabo con el programa SPSS (SPSS Inc, Chicago Ill)

9.16 Aspectos éticos.

En la elaboración de este protocolo se han considerado los aspectos éticos plasmados en la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud (Diario Oficial de la Federación el 07 de febrero de 1984), así como los lineamientos de la Declaración de Helsinki ⁽⁸⁶⁾ y Tokio de la Asociación Médica Mundial sobre Principios Éticos para las Investigaciones Médicas en Seres Humanos y cumple con los requisitos de ética estipulados en las diferentes instancias nacionales (Ley Nacional de Salud) ⁽⁸⁷⁾ y las Normas de las Buenas Prácticas Clínicas propuestos por la Comisión Nacional de Investigación del IMSS. ⁽⁸⁸⁾

10. Resultados.

10.1. Parámetros antropométricos y bioquímicos en niños eutróficos y obesos.

En la Tabla 6 se pueden observar los resultados obtenidos durante el análisis de las variables antropométricas en las cuales solo se observa un incremento notable en el IMC de niños obesos, mientras que glucosa y presiones sanguíneas no fueron muy diferentes entre eutróficos y obesos. Aunque el valor de Insulina es mayor en obesos no se observó un alto nivel de glucosa por lo cual se sospecharía del comienzo de insulinoresistencia en el niño obeso.

Con respecto a los parámetros bioquímicos se observa que tanto en triglicéridos, colesterol total y LDL-C se encuentran aumentados en los niños con obesidad y por esto mismo se nota un claro decremento de los niveles de HDL-C.

Características	Eutrófico	Obeso	Valor p
	n=258	n=230	
	Media ± DS	Media ± DS	
Edad (años)	8.8 ± 1.8	9.0 ± 1.8	0.008
Variables Antropométricas			
Peso (kg)	29.4 ± 7.4	48.1 ± 12.8	<0.001
Altura (m)	1.3 ± 0.1	1.4 ± 0.1	<0.001
IMC (Z score)	0.1 ± 0.6	2.1 ± 0.3	<0.001
WC (cm)	58.4 ± 5.8	78.7 ± 9.3	<0.001
Presión Sanguínea (mmHg)			
Sistólica	94.2 ± 9.7	102.3 ± 11.2	<0.001
Diastólica	64.3 ± 8.5	68.3 ± 9.2	<0.001
Factores Metabólicos (mg/dL)			
Glucosa	79.0 ± 8.8	82.8 ± 9.3	<0.001
Insulina(μU/mL)	5.2 ± 4.1	11.9 ± 9.8	<0.001
Triglicéridos	72.3 ± 28.5	119.4 ± 61.7	<0.001
Colesterol Total	142.6 ± 29.4	158.9 ± 34.5	<0.001
HDL-C	50.9 ± 11.4	44.3 ± 11.3	<0.001
LDL-C	91.9 ± 21.9	108.9 ± 28.1	<0.001

Tabla 6. Resultados de las mediciones físicas, químicas y antropométricas realizadas en los niños eutróficos y obesos del ensayo. Los sujetos se clasificaron como eutróficos u obesos utilizando el IMC de acuerdo con la referencia CDC 2000 y usando el paquete EPIINFO 3.3.2.

10.2. Ácido Úrico, LDLox e índice aterogénico (IA).

La Tabla 7 muestra las concentraciones séricas de ácido úrico para niños eutróficos y obesos obtenidas en el estudio, además del índice aterogénico el cual, con base en las concentraciones de triglicéridos y de HDL ayuda a realizar una predicción a desarrollar con mayor probabilidad padecimientos como la aterosclerosis en los niños siendo un valor igual o menor 4 como el adecuado.

Características	Eutrófico	Obesos
Ácido úrico (mg/dL)	4.8 +/- 1.0	5.6 +/- 1.1
LDLox (mg/dL)	6.26	8.56
Índice aterogénico*	0.152	0.43

Tabla 7. Resultados de la cuantificación de Ácido Úrico y su relación con la predisposición con aterosclerosis. *Índice aterogénico: Log Triglicéridos / HDL. ⁽³⁸⁻⁴²⁾

10.3. Genotipificación de los polimorfismos del Gen PON1.

La Tabla 8 muestra las frecuencias genotípicas para cada SNP en niños eutróficos y obesos obtenidas mediante discriminación alélica después de realizar PCR-RT con el uso de sondas Taqman® específicas para cada SNP:

Eutróficos						
SNP	192 Q/R			55 L/M		
Fenotipos	Q	QR	R	L	LM	M
Genotipos	QQ	QR	RR	LL	LM	MM
Frecuencia Genotípica	51	137	70	186	58	14
Número total	258			258		

Obesos						
SNP	192 Q/R			55 L/M		
Fenotipos	Q	QR	R	L	LM	M
Genotipos	QQ	QR	RR	LL	LM	MM
Frecuencia Genotípica	40	123	67	161	64	5
Número total	230			230		

Tabla 8. Frecuencias obtenidas para los SNP 192 Q/R y 55 L/M.

La Figura 26 y 27 muestran geles de agarosa al 2% teñidos con Gel Stain Rain realizados a las muestras de eutróficos y obesos después de haber realizado la PCR-RT, con la finalidad de comprobar que la amplificación y el resultado de discriminación alélica del equipo sean válidos.

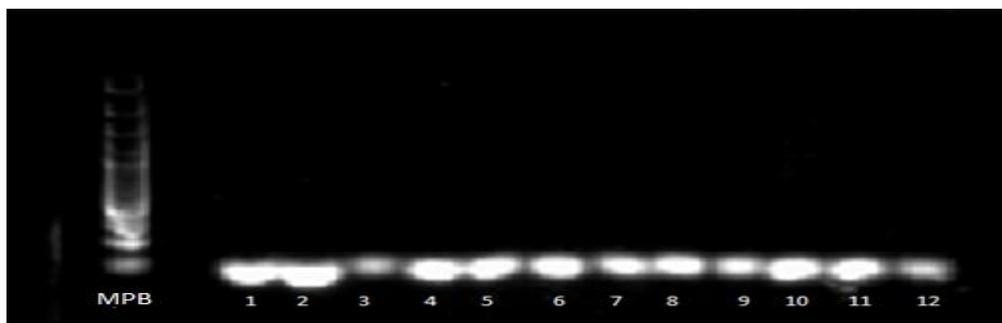


Figura 26. Corrimiento electroforético de productos de amplificación de PCR-RT para el polimorfismo Q192R de muestras de Controles y Casos con los tres alelos (QQ, QR y RR). De 1-6 Controles (1-2 QQ, 3-4 QR, 5-6 RR). De 7-12 Casos (7-8 QQ, 9-10 QR, 11-12 RR). MPB (Marcador de 100 Pb).

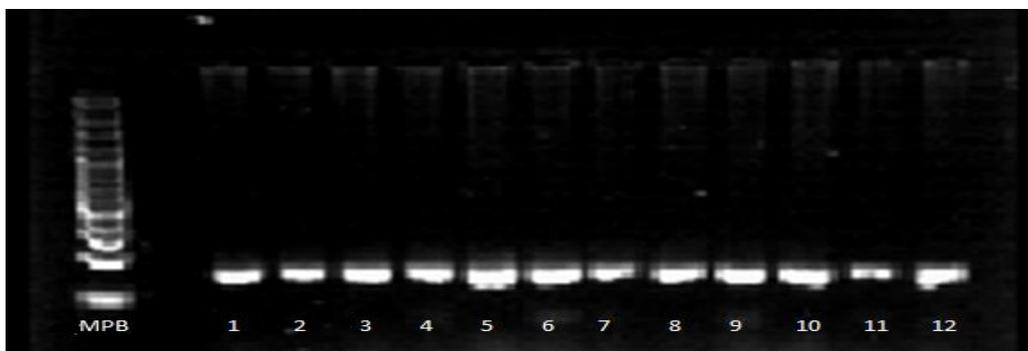


Figura 27. Corrimiento electroforético de productos de amplificación de PCR-RT para el polimorfismo L55M de muestras de Controles y Casos con los tres alelos (LL, LM y MM). De 1-6 Controles (1-2 LL, 3-4 LM, 5-6 MM). De 7-12 Casos (7-8 LL, 9-10 LM, 11-12 MM). MPB (Marcador de 100 Pb)

En la Tabla 9 se resumen los porcentajes de la frecuencia de genotipos y alelos después de haberse realizado la discriminación alélica para los dos SNP el 192 Q/R y el 55 L/M. Para el SNP 192 Q/R el genotipo de mayor frecuencia fue el heterocigoto (Q/R) con el 53.3% para eutróficos y para obesos 53.5% siendo casi idénticos y similares a los reportados para la población mexicana en otros estudios. En cuanto al SNP 55 L/M el genotipo de mayor frecuencia fue el homocigoto para el alelo ancestral (L/L) con un 72.2% y 70.2% para eutróficos y obesos respectivamente. Siendo congruente con lo ya reportado para la población mexicana.

Características	Eutrófico		Valor p
	n=258	Obeso	
	%	n=230	%
Genotipo 192 Q/R			
QQ	19.6	17.2	0.757
QR	53.3	53.5	
RR	27.1	29.3	
Alelo Q	46.3	43.9	0.484
Alelo R	53.7	56.1	
Genotipo 55 L/M			
LL	72.2	70.2	0.092
LM	22.3	27.8	
MM	5.5	2.0	
Alelo L	83.3	84.1	0.760
Alelo M	16.7	15.9	

Tabla 9. Frecuencia de alelos después de la discriminación alélica por PCR-RT. Las frecuencias alélicas y variables categóricas se compararon mediante la prueba chi-cuadrada. Asimismo, las frecuencias alélicas y genotípicas se analizaron mediante la prueba de equilibrio de Hardy-Weinberg.

10.4. Asociación entre los SNPs de PON1 con los parámetros físicos, bioquímicos y con las actividades enzimáticas.

La Tabla 10 muestra los resultados del perfil bioquímico y la actividad de PON y ARE en niños eutróficos y obesos con respecto a su SNP. En el apartado del SNP 192 Q/R los niveles de insulina están relacionados con el SNP en niños eutróficos ($p=0.041$). Colesterol Total y LDL-C para niños obesos resultaron tener relación con el SNP con una $p=0.033$ y 0.029 respectivamente. La actividad de ARE en eutróficos y obesos no resulto con relación al SNP, mientras que la actividad de PON si tuvo relación con el SNP con una $p<0.001$ para niños eutróficos y obesos. Es decir la actividad PON si depende de la presencia del SNP.

Para el SNP 55 L/M los valores de Triglicéridos y HDL-C en niños eutróficos tuvieron relación con el SNP con una $p=0.037$ y 0.019 respectivamente. La actividad de PON también mostro estar relacionada con la presencia del polimorfismo ($p=0.005$).

En cuanto a los niveles de LDLox no se encontró una relación de estos con la presencia de los SNPs. Para el SNP 192 Q/R en eutróficos se obtuvo $p=0.274$ y en obesos $p=0.670$, para el SNP 55 L/M de eutróficos se obtuvo un valor $p=0.224$ y en obesos $p=0.549$.

Para evaluar el efecto del genotipo sobre las variables clínicas, metabólicas y enzimas estudiadas se realizó un análisis de regresión lineal robusto mediante un modelo aditivo ajustado por edad y sexo y se presentan con intervalo de confianza al 95%. Para todos los análisis se consideró un valor de $p<0.05$ como estadísticamente significativo. Los datos se procesaron usando el programa STATA v.11 / SE (Stata Corporation, College Station, TX).

Características	Eutrófico		Obeso	
	n=258		n=258	
	CI 95%	p	CI 95%	p
Genotipo 192 Q/R				
Presión Sanguínea (mmHg)				
Sistólica	-1.7 ; 1.5	0.904	-1.4 ; 3.2	0.455
Diastólica	-0.3 ; 2.5	0.132	0.2 ; 3.8	0.033
Factores Metabólicos (mg/dL)				
Glucosa Rápida	-0.3 ; 2.9	0.115	-2.2 ; 1.7	0.813
Insulina (µU/mL)	0.0 ; 1.4	0.041	-0.6 ; 2.7	0.204
Triglicéridos	-3.6 ; 5.9	0.635	-7.0 ; 13.4	0.536
Colesterol Total	-7.4 ; 3.3	0.459	0.6 ; 14.3	0.033
HDL	-0.5 ; 3.6	0.140	-1.0 ; 3.6	0.251
LDL	-5.2 ; 2.8	0.554	0.7 ; 12.2	0.029
Ácido Úrico	-0.3 ; 0.0	0.076	-0.3 ; 0.2	0.724
LDLox	-0.3 1.1	0.274	-0.5 0.8	0.670
Actividad Enzimática				
Ariesterasa (nmol/min/mL)	-0.8 ; 0.2	0.302	-0.4 ; 0.8	0.554
Paraoxonasa (nmol/min/mL)	76.3 ; 108.8	<0.001	79.7 ; 120.0	<0.001
Genotipo 55 L/M				
Presión Sanguínea (mmHg)				
Sistólica	-3.1 ; 0.7	0.225	-5.2 ; 0.8	0.146
Diastólica	-3.6 ; -0.3	0.022	-1.4 ; 3.4	0.412
Factores Metabólicos (mg/dL)				
Glucosa Rápida	-3.1 ; 0.6	0.181	-2.2 ; 2.9	0.792
Insulina (µU/mL)	-0.9 ; 0.8	0.982	-2.8 ; 1.5	0.557
Triglicéridos	11.5 ; -0.4	0.037	17.9 ; 9.0	0.513
Colesterol Total	-8.5 ; 4.2	0.504	10.8 ; 7.7	0.745
HDL	-5.2 ; -0.5	0.019	-3.4 ; 2.7	0.815
LDL	-4.2 ; 5.3	0.810	10.7 ; 4.7	0.445
Ácido Úrico	-0.1 ; 0.4	0.135	-0.5 ; 0.2	0.389
LDLox	-0.3 1.3	0.224	-0.6 1.1	0.549
Actividad Enzimática				
Ariesterasa (nmol/min/mL)	0.0 ; 1.2	0.052	-1.0 ; 0.6	0.599
Paraoxonasa (nmol/min/mL)	59.5 ; -10.6	0.005	49.4 ; 17.5	0.348

Tabla 10. Parámetros físicos, antropométricos, bioquímicos, y enzimáticos de los niños eutróficos y obesos y su relación con la presencia de los SNPs estudiados.

10.5 Asociación de los Genotipos de PON1 con las actividades enzimáticas.

En la Figura 28 A se observa que la actividad de PON en niños eutróficos sí está relacionada con la presencia del SNP 192 Q/R ($p=0.001$) y esta actividad fue mayor en aquellos que tenían el genotipo RR. En los niños obesos la actividad PON también fue mayor en los portadores del genotipo RR y dicha actividad sí está relacionada con la presencia del SNP ($p=0.001$) como se observa en la Figura 28 B.

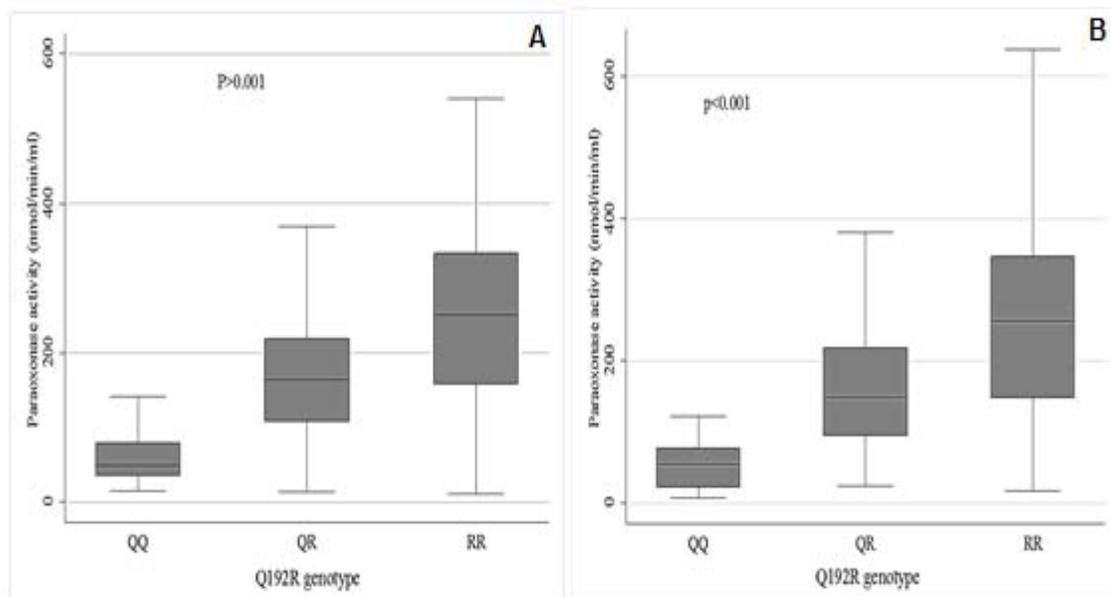


Figura 28. Asociación de la actividad Paraoxonasa con genotipo 192 Q/R en eutróficos (A) y obesos (B).

Para la actividad de ARE en niños eutróficos la mayor actividad se registró en el genotipo QQ y esta actividad no está relacionada a la presencia del SNP ($p=0.615$), para los niños obesos la actividad de ARE fue mayor en los portadores del genotipo QR, aunque esta actividad estuvo cercana a la del genotipo RR. La actividad de ARE en los niños obesos no está asociada con la presencia del SNP ($p=0.730$). (Figura 29)

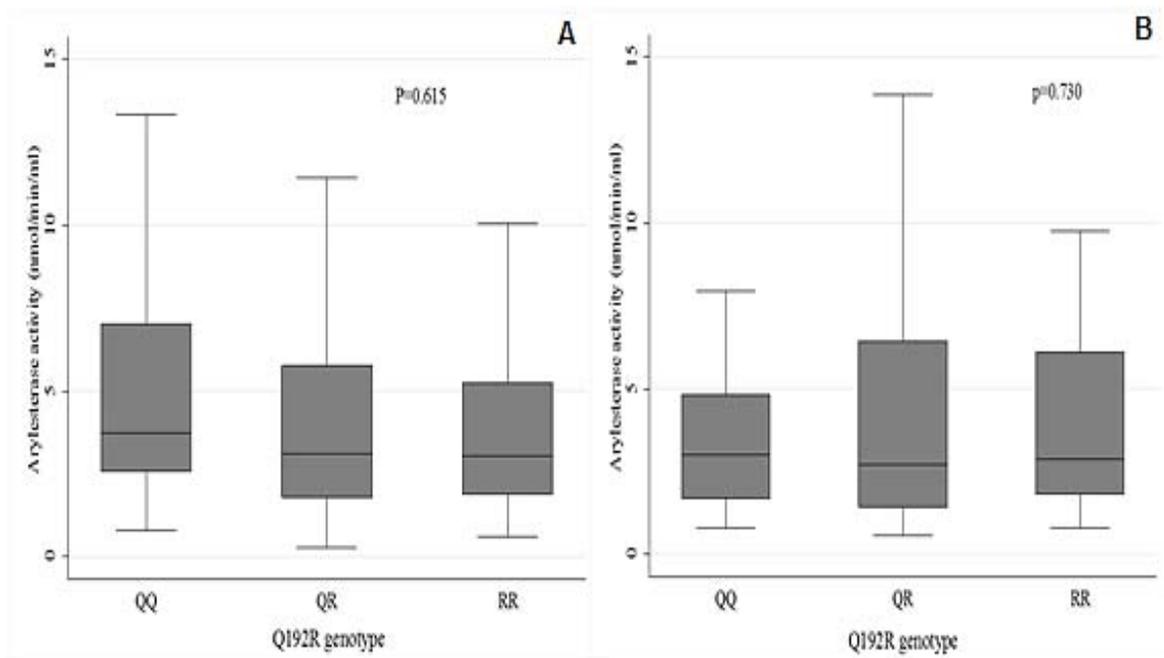


Figura 29. Asociación de la actividad Arilesterasa con genotipo 192 Q/R en eutróficos (A) y obesos (B)

La actividad de PON en niños eutróficos sí está relacionada con la presencia del SNP 55 L/M ($p=0.004$) y el genotipo LL del SNP se asocia con mayor actividad de la enzima, en niños obesos no se encontró relación entre la actividad de PON y la presencia del SNP ($p=0.140$), de igual manera la mayor actividad fue el alelo LL (Figura 30).

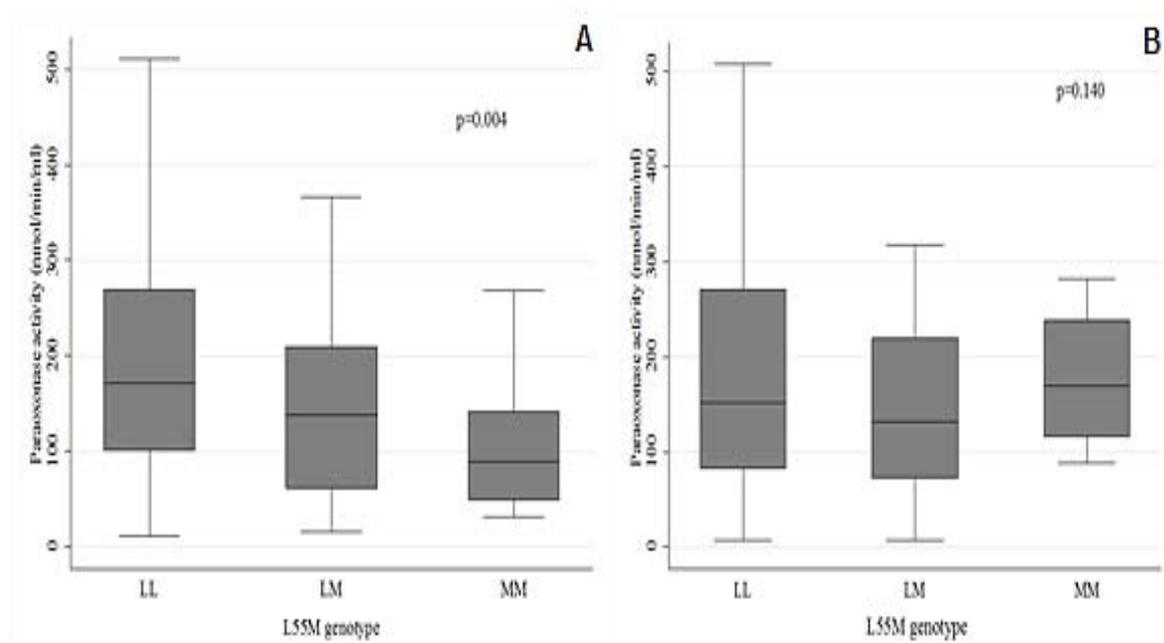


Figura 30. Asociación de la actividad Paraoxonasa con genotipo 55 L/M en eutróficos (A) y obesos (B)

Con respecto a la actividad de ARE y el SNP 55 L/M, en niños eutróficos el genotipo MM se asoció significativamente con la mayor actividad de ARE ($p=0.042$). En la actividad de ARE en los niños obesos se determinó que el genotipo asociado con una actividad más alta fue también el MM, aunque se pudo observar que estos niveles de actividad no estaban relacionados con la presencia del SNP ($p=0.332$) (Figura 31)

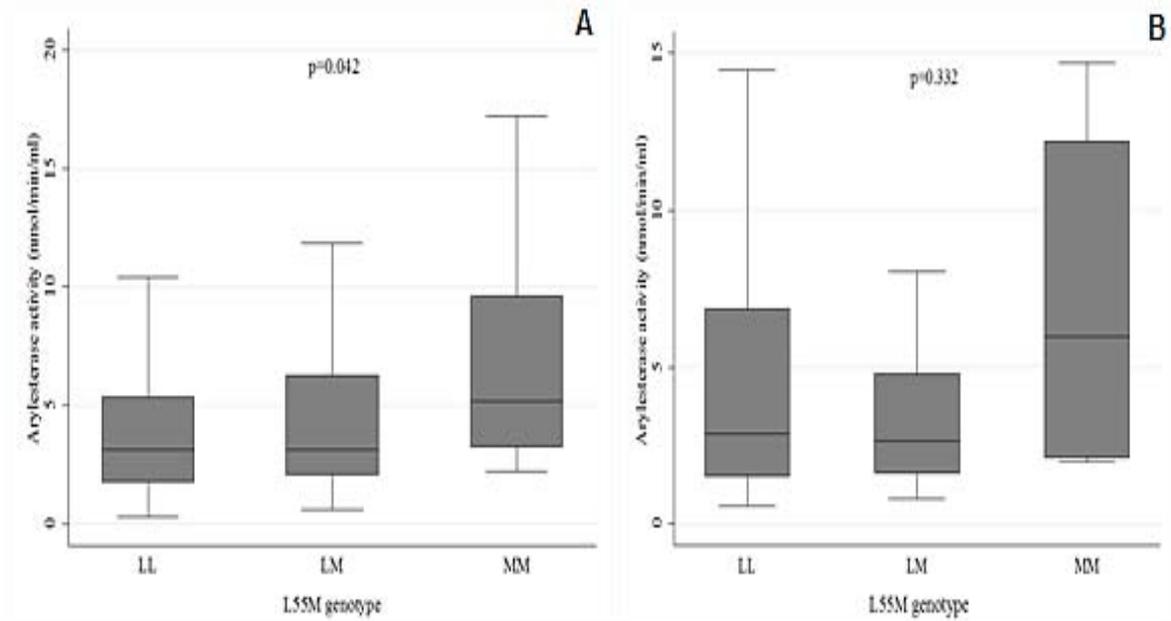


Figura 31. Asociación de la actividad Arilesterasa con genotipo 55 L/M en eutróficos (A) y obesos (B)

11. Discusión.

La Paraoxonasa es una enzima de gran importancia en la modulación del estrés oxidativo producido por especies reactivas del oxígeno (ERO) y otros radicales libres (RL) producidos por la misma respiración celular y otras afecciones tales como la obesidad. La PON1 es un antioxidante “natural” que ligado a las lipoproteínas de alta densidad (HDL) otorgan cierta protección a las lipoproteínas de baja densidad (LDL) a sufrir una alteración estructural por lo cual los receptores de macrófagos para LDL normal no son capaces de eliminarla y por consiguiente mediante la respuesta inmune llegar a desarrollar aterosclerosis (ver página 29). En estudios realizados anteriormente se ha logrado comprobar que la PON1 está directamente relacionada con el perfil de lípidos y con parámetros bioquímicos tales como el ácido úrico, triglicéridos y colesterol total. Esta enzima presenta polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) como lo son el SNP 192 Q/R, el cual se ha asociado con la actividad de la enzima y el 55 L/M, que puede interferir con sus concentraciones séricas.

En los parámetros antropométricos se encontró lo esperado que en controles fueran más bajos los valores de peso, IMC e insulina como se reporta en otros ensayos de este tipo. En cuanto a las mediciones bioquímicas como la glucosa, no se encontraron valores muy separados entre eutróficos y obesos siendo 79.0 mg/dL \pm 8.8 y 82.8 mg/dL \pm 9.3 respectivamente.

Otros parámetros bioquímicos como HDL-C y LDL-C, tuvieron diferencias entre los niños eutróficos y obesos, aunque se encuentran dentro de los valores normales. Los valores altos de insulina en niños obesos quizás pudieron ser debidos a que ya comienzan a presentar insulinoresistencia.

De acuerdo a Fridman O et al. 2011⁽²⁷⁾ y Guxens M et al 2008⁽³¹⁾, los alelos 55 LL y 192 Q/R son los de mayor frecuencia en los estudios de genotipificación, nosotros obtuvimos resultados similares, ya que el alelo 55 L/L se presentó con frecuencias de 72.2% y 70.2%, en niños eutróficos y obesos, respectivamente. Y que para el alelo 192 Q/R fueron de 53.3% y 53.5%, para niños eutróficos y obesos, respectivamente.

Con los valores de triglicéridos y HDL-C se realizó la determinación del Índice aterogénico el cual según Irurita M et al 2007⁽³⁸⁾ se puede considerar como un valor predictivo para desarrollar aterosclerosis en adultos, el cual preferentemente, debe ser \leq a 4. Para los niños de este estudio fue de 0.152 para eutróficos y 0.43 para obesos, por lo cual es probable que los niños obesos tengan un alto riesgo de sufrir aterosclerosis y otras enfermedades cardiovasculares como infarto agudo al miocardio en edades más avanzadas si no se toman medidas de prevención como se ha observado en la población estudiada por Guxens M et al 2008⁽³¹⁾.

En cuanto a los valores de ácido úrico encontrados si fueron diferentes a los reportados en otros estudios, como los de So A et al 2010⁽⁵⁰⁾, Kuzkaya et al 2003⁽⁵⁵⁾ y Santos CX 1999⁽⁵⁴⁾. Los cuales establecen que los niveles normales de ácido

úrico se encuentran entre 3.5 y 5.0 en adultos. Mientras que los obtenidos en nuestro estudio fueron de 4.8 mg/dL y 5.6 mg/dL para eutróficos y obesos, respectivamente, cabe mencionar que éstos son valores muy altos, tratándose de niños, esto puede ser ocasionado por el consumo de bebidas con alto contenido de fructosa en la dieta “normal” del niño. Ya que se ha reportado en la literatura que la fructosa puede ser metabolizada hasta ácido úrico mediante las hexocinasas provocando así un alza en la concentración sérica de ácido úrico (ver Figura 11).

Esto no necesariamente puede ser malo para el niño como lo demuestra en su estudio So A et al 2010 ⁽⁵⁰⁾. En el cual se comprueba que el ácido úrico puede tener un efecto “dual”, es decir, el ácido úrico puede actuar como un prooxidante y como un antioxidante dependiendo el microambiente químico. Por ejemplo, el ácido úrico puede proteger las partículas de LDL nativas contra la oxidación inducida por el Cu^{2+} , pero, por otro lado, también es capaz de aumentar la oxidación de las LDLox ya que éstas contienen productos de la peroxidación de lípidos (ver Figura 14).

Diversos investigadores han indicado que la actividad de la PON1 en poblaciones humanas, muestra una distribución polimórfica con una gran variabilidad interindividual y también se presentan diferencias en las frecuencias alélicas y genotípicas. Por lo cual, los resultados de dichos estudios resultan ser poco homogéneos, y dificultando el análisis de estos como lo describe Gamboa R et al. 2008 ⁽²⁹⁾.

En general, para poblaciones de origen caucásico predomina el alelo Q mientras que en poblaciones de origen asiático la mayoría de los estudios reportan al alelo R como predominante.

Bhattacharyya T et al 2008 ⁽⁸⁹⁾, demostraron que los polimorfismos que presenta la PON1 están involucrados en su actividad y en sus concentraciones séricas, así como en la modulación del estrés oxidativo. En su trabajo demuestran que los sujetos de estudio con genotipo 192 R/R tienen niveles más bajos de todos los índices de estrés oxidativo en comparación con los individuos con el genotipo 192 Q/Q. lo cual es algo que no se esperaría ya que como sabemos el alelo (R) es el de riesgo que predispondrá una alteración bioquímica y en este caso la actividad de PON sería baja.

Huen K et al 2013 ⁽³²⁾, Mackness B et al 2000 ⁽¹³⁾, Canales A et al. 2003 ⁽³⁰⁾, Andersen HR et al. 2012 ⁽²⁶⁾, Ferré et al. 2002 ⁽³⁶⁾ Mata C et al. 2013 ⁽⁴³⁾ concluyeron que los resultados de la actividad de PON proporcionan un apoyo importante para poder entender de una manera más sencilla como la variante PON1 192 Q/R modula gran parte del estrés oxidativo en humanos, además de que es el genotipo de mayor frecuencia para la población caucásica.

Los resultados de la actividad de PON y ARE y su asociación con los SNPs son similares a los reportados por Márquez LIDC et al. 2015 ⁽⁹⁰⁾ donde la actividad PON fue significativamente mayor en los individuos con el genotipo PON 55 LL.

Ramírez JR et al 2006 ⁽⁹¹⁾ en su ensayo describe que después de la discriminación alélica para el SNP 192 Q/R el genotipo de mayor frecuencia fue el heterocigoto (Q/R) con un 52.8%, similar al obtenido por nosotros, el cual fue de 53.3%.

Moura LM et al 2012. ⁽⁹²⁾ describen en su estudio que la actividad media de PON1 en la población estudiada fue de 230.8 ± 1.20 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$ para adultos con enfermedad cardiovascular (ECV) y 134.7 ± 6.48 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ para los sujetos control. Por otra parte, Rojas GAE et al 2005. ⁽⁹³⁾ en un estudio realizado en México con adultos, determino que la actividad PON promedio con respecto a los genotipos LL, LM y MM fueron: 145.3, 73.5 y 14.6 nmol/min/mL respectivamente; y con respecto a los genotipos QQ, QR y RR fueron: 54, 108.4 y 157 nmol/min/mL, respectivamente, los cuales son claramente diferentes a los encontrados en niños.

Los valores de actividad de PON obtenidos en el presente estudio fueron de 4.5 ± 3.9 y 4.2 ± 4.1 nmol/min/ml para niños eutróficos y obesos, respectivamente. Estos valores son bajos si los comparamos con los anteriormente mencionados, quizás, pueda ser debido a que se incluyó a niños no mayores de 11 años, los cuales se sabe que aún no tienen niveles altos de la enzima PON1 aunque esto puede ser asociado a procesos hormonales como la presencia de la hormona del crecimiento y a la falta de maduración hepática, ya que como lo menciona Bojórquez RMC et al 2014 ⁽⁹⁴⁾ en un niño "clínicamente" sano el hígado comienza a madurar al iniciar la pubertad, y como la PON1 es de origen hepático esto puede ser la causa de niveles bajos de la enzima PON1 y por consiguiente una baja en la actividad media de PON en adultos y niños.

Aunque existen pocos estudios que asocien la actividad de ARE con sus SNP, existen estudios como los de Martínez SMF et al 2011 ⁽⁹⁵⁾ donde evaluaron la relación entre la actividad de PON y sus SNPs 55 L/M y 192 Q/R en la población mexicana adulta con obesidad, la actividad de PON fue 177 (137.0–217.8) nmol/min/mL para controles y 172 (122.3–221.3) nmol/min/mL para obesos ($p=0.858$), la actividad de ARE fue de 70 (49.3–90.0) nmol/min/mL para eutróficos y 71.0 (47.8–94.8) nmol/min/mL ($p=0.964$) para obesos. Resultados similares fueron obtenidos por Tabur S et al. 2010. ⁽⁹⁶⁾ para las actividades de PON y ARE cuando se compararon los resultados de sujetos con peso normal y de obesos.

Estos resultados contrastan con los estudios de Ferretti et al 2005. ⁽⁹⁷⁾ en una población de mujeres obesas adultas y por Koncsos et al. 2010. ⁽⁹⁸⁾ en una población de niños eutróficos y obesos con niveles de leptina y adiponectina alterados, en los cuales se encontró que existían menores niveles de actividad de PON en los sujetos obesos siendo de 99.42 (83.33/152.05) U/L ($p<0.05$) y para controles de 84.80 (64.33/144.74) U/L ($p<0.05$).

Para ARE 115.20 (93.70/126.00) U/L ($p < 0.01$) en controles y en obesos fue 94.40 (82.20/108.70) U/L ($p < 0.01$).

Existen otros factores que podrían regular la actividad catalítica de la enzima PON1 en los niños: la edad y el modo general de vida, así como los factores nutricionales y farmacológicos. Además de la forma de recolección de la muestra para la determinación de la actividad de PON y ARE ya que existen estudios como los de Garelnabi M et al. 2015 ⁽⁹⁹⁾ que demuestran que el tipo de tubo colector de sangre, el anticoagulante, almacenamiento y el cuidado de la muestra puede afectar dichas actividades (PON y ARE).

Saruhan E et al. 2007 ⁽¹⁰⁰⁾ han informado que la edad no afectó los niveles de actividad sérica de PON1. Puesto que en los tres grupos de edad (niños, adultos y ancianos) con los cuales trabajo la actividad de la PON sérica y los niveles de colesterol HDL permanecieron sin cambios con la edad.

En contraste, Seres I et al. 2004 ⁽¹⁰¹⁾ que trabajó con tres grupos con diferencias de edad de más de 20 años, encontró diferencias asociadas con la edad en la actividad enzimática de PON1.

Por lo cual se recomienda realizar más estudios de este tipo en población infantil menores de 12 años, con un mayor número de casos y controles en diferentes poblaciones para contrastar los resultados y así poder evaluar la función de la enzima PON1 en la modulación del estrés oxidativo que sufren las personas obesas.

En cuanto a niveles de LDLox en niños eutróficos y obesos para el SNP 192 Q/R no resultó estar relacionado con la presencia del SNP con una $p = 0.274$ para eutróficos y $p = 0.670$ para obesos. Para el SNP 55 L/M tampoco se encontró una relación entre los niveles de LDLox y la presencia o no del polimorfismo con $p = 0.224$ para eutróficos y $p = 0.549$ para niños obesos.

Aunque existen muy pocos estudios que relacionen directamente a los polimorfismos de la PON y los niveles de LDLox, existen trabajos que las relacionan con otras patologías como lo describe en su trabajo AnandBabu et al. 2016 ⁽¹⁰²⁾ en el cual se estudiaron adultos con Degeneración Macular Asociada con la Edad (DMAE) la cual es una enfermedad multifactorial que causa discapacidad visual en la vejez principalmente por estrés oxidativo provocado por LDLox. Donde se encontró que los casos tenían niveles más altos de LDLox con respecto a los controles además de que no existía relación alguna con los polimorfismos de esta enzima (192 Q/R y 55 L/M).

Otro estudio que relaciona indirectamente a los SNPs de PON con LDLox es el descrito por Lakshmy et al 2010 ⁽¹⁰³⁾ el cual trabajo con pacientes adultos asiáticos hospitalizados con Infarto de Miocardio (IM) y su asociación con LDL oxidada circulante y estado antioxidante. Donde los pacientes con IM tuvieron LDL oxidada significativamente mayor 34.4 ± 16.9 mg/dL para casos y 30.6 ± 12.1

mg/dL para controles. También determino que no hay correlación del polimorfismo PON192 o 55 con LDL oxidada ($p < 0.05$), lo que sugiere que las presencias de otros factores antioxidantes pueden ser de igual importancia en la prevención de la oxidación de LDL.

12. Conclusiones.

Se realizó el estudio de la actividad enzimática PON y ARE de PON1, sus polimorfismos genéticos (192 Q/R y 55 L/M), el perfil de lípidos, concentraciones séricas de ácido úrico y LDLox en niños eutróficos y obesos de la Ciudad de México. La actividad enzimática de PON del SNP 55 L/M fue ligeramente mayor en eutróficos, mientras que para el SNP 192 Q/R la actividad de PON es ligeramente mayor en obesos. Para la actividad ARE en el SNP 55 L/M fue mayor en obesos y para el SNP 192 Q/R de ARE fue muy similar entre eutróficos y obesos.

Aunque no se encontró diferencia estadística significativa para los niveles de ácido úrico debidos a la presencia del SNP 55 L/M o 192 Q/R se pudo observar que niños obesos si tienen niveles más altos de ácido úrico predisponiendo un mayor riesgo a desarrollar aterosclerosis, como se demostró con el índice aterogénico.

Lo más relevante para la población de niños estudiada fue una frecuencia elevada de homocigotos para el polimorfismo en posición 55 y la presencia del alelo L fue de 83.3% y 84.1% para eutróficos y obesos respectivamente y para la posición 192 la mayor frecuencia fue de heterocigotos y la presencia del alelo R fue de 53.7% y 56.1% para eutróficos y obesos respectivamente. Lo cual corresponde con otros estudios realizados en el país para poblaciones infantiles.

Para el apartado de los niveles de LDLox no se encontró relación de estos con la presencia de los SNPs de PON1 tanto en niños eutróficos como obesos. Por lo cual se puede inferir que la actividad ni las concentraciones séricas de la PON están directamente asociadas con los niveles de LDLox, cabe destacar que en la literatura casi no existen estudios que trabajen con población infantil y mucho menos que sean de origen latinoamericano.

13. Perspectivas.

- Es recomendable realizar más estudios con el fin de evaluar la asociación de los polimorfismos de la PON1 (55 L/M y 192 Q/) y la actividad PON y ARE con la finalidad de contar con más datos que permitan determinar si se puede considerar a la PON1 como un bioindicador de la modulación del estrés oxidativo.
- Se deben realizar más estudios a nivel mundial en los cuales se incluyan principalmente poblaciones infantiles, ya que es importante tener un control en los niños que sufren obesidad y así poder evitar complicaciones cardiovasculares en su edad adulta.
- Se sugiere realizar estudios clínicos en los cuales se contemplen los niveles séricos de LDLox tanto en poblaciones infantiles como adultas. Esto con la finalidad de aumentar la información disponible sobre este biomarcador tanto de estrés oxidativo como de una mala actividad de la PON.

14. Anexos.

Lista de Equipos utilizados.

Cámara de electroforesis Marca LIFE TECHNOLOGIES Modelo HORIZON 58.
Fuente de poder para cámara de electroforesis Marca BIO-RAD Modelo Power Pack Basic.
Equipo de Química Sanguínea para determinación de Ácido Úrico Marca Instrumentations Laboratory Modelo IL650.
Equipo de PCR-RT Marca Applied Biosystems Modelo 7900 TH.
Trans iluminador de geles de electroforesis Marca BIO-RAD Modelo GelDoc 2000.
Lector para placas de ELISA Marca Thermo Scientific Modelo Multiskan FC 357.

Lista de Materiales y Reactivos utilizados.

Agarosa para gel de electroforesis Marca BIO-RAD Laboratories
Colorante de Ácidos nucleicos Marca Gel Stainain®
Reactivo para determinación de Ácido Úrico Marca Instrumentations laboratory IL Test URIC ACID LIQUID 10x50 mL
Reactivo para Multicalibración de equipo IL650 marca Instrumentations laboratory IL Test ReferrilG
Reactivo de control de valores altos y bajos de equipo IL650 Marca Instrumentations laboratory IL Test SeraChem Control level 1 y 2
Maxima Probe/ROX qPCR Master Mix (2X) para PCR-RT Marca Thermo Scientific.
Sonda Taqman para PCR-RT de SNP RS 662 y SNP RS854560 Marca Applied Biosystems.
Placa para PCR-RT de 96 pozos con film óptico Marca Applied Biosystems.
Kit para cuantificación de LDLox OxiSelect™ Human Oxidized LDL ELISA CML-LDL Quantitation. Marca CELL BIOLABS, INC.
Pipetas calibradas de 1, 10, 20, 50, 200, 300 y 1000 µL Marca Thermo Scientific Modelo Finnpiptette.
Puntas para pipetas de 1, 10, 20, 200 y 1000 µL con y sin filtro Marca AXYGEN

15. Referencias.

- 1) Zorrilla HE. Lípidos séricos en la clínica. 2ª. Edición. 1989
- 2) Organización Mundial de la Salud
- 3) West CE, Sullivan DR, Katan MB, Halferkamps IL, van der Torre HW. Boys from populations with high-carbohydrate intake have higher fasting triglyceride levels than boys from populations with high-fat intake. *Am. J. Epidemiol.* (1990) 131 (2): 271-282.
- 4) Bundred O, Kitchener D, Buchan I. Prevalence of overweight and obese children between 1989 and 1998: population based series of cross sectional studies. *Br Med J.* 2001; 332: 326-328
- 5) Willer WC, Sacks F, Trichopoulou A, Drescher G, Ferro-Luzzi A, Helsing E, et al. Mediterranean diet pyramid: a cultural model for healthy eating. *Am J Clin Nutr.*1995; 61 supl: 1.402-1.406
- 6) Ortega CR. Costos económicos de la obesidad infantil y sus consecuencias. *REV Med Inst Mex Seguro Soc.* 2014;52(supl 1):s8-s11
- 7) Peralta RJJ, Gómez Zamudio JH, Estrada Velasco B, Karam Araujo R, Cruz López M. Genética de la obesidad infantil. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.* 2014;52(supl 1):s78-s87
- 8) Achor MA, Bénitez CAN, Brac ES, Barslund SA. OBESIDAD INFANTIL. *Revista de Posgrado de la VIa Cátedra de Medicina.* 2007;(168):34-38.
- 9) Alegría TJA, García DML, Elosua R, Cruz M, Aradillas GC. Q192R Polymorphism of Paraoxonase 1 Gene Associated with Insulin Resistance in Mexican Children. *Arch Med Res.* 2015 Jan;46(1):78-83.
- 10) Durá TT, Sánchez VVF. Obesidad Infantil: ¿un problema de educación individual, familiar o social? *Acta Pediátrica Española.* 2005; 63:(204-207).
- 11) Gómez DRA, Wachter RNH. Obesidad infantil y dislipidemia. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.* 2014;52(supl 1):s102-s108
- 12) Strong JP. Distribución geográfica de la aterosclerosis. Prevalencia en distintas poblaciones humanas. *Ateroma.* 1989: (5)17-21)
- 13) Mackness B, Durrington PN, Abuashia B, Boulton AJM, Mackness MI. Low paraoxonase activity in type II diabetes mellitus complicated by retinopathy. *Clin Sci (Lond).* 2000 Mar;98(3):355-63.
- 14) Ortega CR, Trujillo X, Hurtado LEF, López BAL, Colunga RC, Barrera de León JC, Tlacuilo PJA. Classic and nontraditional components of metabolic syndrome in overweight children and adolescents. *Nutr. clín. diet. hosp.* 2015; 35(2):57-66
- 15) Martínez BA, Maldonado HJ, López AM. Métodos diagnósticos de la resistencia a la insulina en la población pediátrica. *Bol Med Hosp Inf Mex.* 2011;68(5):397-404.
- 16) Ascaso JF, Romero P, Real JT, Priego A, Valdecabres C, Carmena R. Insulin resistance quantification by fasting insulin plasma values and HOMA index in a non-diabetic population. *Med Clin (Barc).* 2001 Nov 3;117(14):530-3.
- 17) Rodríguez PJM, Menéndez LJR, Trujillo LY. Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Rev Cubana Med Milit* 2001;30(1):36-44
- 18) Mayor OR. Oxidative Stress and Antioxidant Defense System. *Rev. Inst. Med. Trop.*2010.;5(2):23-29.
- 19) Alzoughaibi MA. Concepts of oxidative stress and antioxidant defense in Crohn's disease. *World J Gastroenterol.* 2013 Oct 21; 19(39): 6540–6547.
- 20) Céspedes CT, Sánchez SD. Algunos aspectos sobre el estrés oxidativo, el estado antioxidante y la terapia de suplementación. *Rev Cubana Cardiol* 2000;14(1):55-60

- 21) Bellomo G, Maggi E, Poli M, Agosta FG, Bollati P, Finardi G. Autoantibodies against oxidatively modified low density lipoproteins in NIDDM, Diabetes 1995;44(1):60-6
- 22) Gounopoulos P, Merki E, Hansen LF, Choi SH, Tsimikas S. Antibodies to oxidized low density lipoprotein: epidemiological studies and potential clinical applications in cardiovascular disease. Minerva Cardioangiol 2007 Dec;55(6):821-37.
- 23) Ruíz HN, Espinoza ZM, González JC, Leal HU, Reigosa YA. Oxidized LDL and anti-oxidized LDL antibodies according uric acid levels in overweight women. Arch Cardiol Mex. 2011 Jul-Sep;81(3):188-96.
- 24) Setchell KD, Cassidy A. Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health. J Nutr. 1999 Mar;129(3):758S-767S.
- 25) Quispe HM, Quispe TSG. Paraoxonasa una enzima inducible: previene el riesgo de enfermedad cardiovascular. SCielo. 2011;9(1):24-30.
- 26) Andersen HR, Wohlfahrt-Veje C, Dalgard C, Christiansen L, Main KM, et al. Paraoxonase 1 polymorphism and prenatal pesticide exposure associated with adverse cardiovascular risk profiles at school age. May 2012;7 :5 PLoS ONE 7: e36830
- 27) Fridman O, Fuchs AG, Porcile R, Morales AV, Gariglio LO. Paraoxonasa: sus múltiples funciones y regulación farmacológica. Arch Cardiol Mex 2011;81(3):251-260
- 28) Watson AD, Berliner JA, Hama SY, La Du BN, Faull KF, Fogelman AM, Navab M. Protective Effect of High Density Lipoprotein Associated Paraoxonase. Inhibition of the Biological Activity of Minimally Oxidized Low Density Lipoprotein. J Clin Invest. 1995 Dec;96(6):2882-91.
- 29) Gamboa R, Regalado JC, Huesca GC, Posadas RC, Verdejo PJ, Vargas AG, Pérez MO. Low paraoxonase and arylesterase plasma activities in Mexican patients with coronary artery disease. Arch Cardiol Mex. 2008 Oct-Dec;78(4):360-8.
- 30) Canales A y Sánchez MFJ. Paraoxonase, something more than an enzyme?. Med Clin (Barc) 2003;121(14):537-48.
- 31) Guxens M, Tomás M, Elosua R, Aldasoro E, Segura A, et al. Association between paraoxonase-1 and paraoxonase-2 polymorphisms and the risk of acute myocardial infarction. Rev Esp Cardiol. 2008 Mar;61(3):269-75
- 32) Huen K, Harley K, Beckman K, Eskenazi B, Holland N. Associations of PON1 and Genetic Ancestry with Obesity in Early Childhood PLoS One. 2013 May 3;8(5):e62565.
- 33) Alegría TJA, García DML, Elosua R, Cruz M, Aradillas GC. Q192R Polymorphism of Paraoxonase 1 Gene Associated with Insulin Resistance in Mexican Children. Arch Med Res. 2015 Jan;46(1):78-83.
- 34) Carvajal CC. LDL OXIDADA Y LA ATEROSCLEROSIS. Med. leg. Costa Rica. 2015 Jan./Mar;32(1).
- 35) Lloyd LJ, Langley-Evans SC, McMullen S. Childhood obesity and risk of the adult metabolic syndrome: a systematic review. Int J Obes . 2012 Jan;36(1):1-11.
- 36) Ferré N, Tous M, Camps J, Joven J. Antibody anti-oxidized ldl titer is not related to serum paraoxonase activity and their genetic polymorphisms in normal subjects and patients with myocardial infarction. Clin Invest Arterioscl 2002;14(3):135-9
- 37) Tomás A, Latorre G, Sentí M, Marrugat J. Función antioxidante de las lipoproteínas de alta densidad: un nuevo paradigma en la arteriosclerosis. Rev Esp Cardiol 2004;57(6):557-69
- 38) Irurita M et al. Utilidad del índice aterogénico en la predicción de enfermedad coronaria prematura. Clin Invest Arterioscl. 2007;19(3):136-42

- 39) Mansour M, Nassef YE, Shady MA, Aziz AA, El Malt HA. Metabolic Syndrome and Cardiovascular Risk Factors in Obese Adolescent. *Open Access Maced J Med Sci*. 2016 Mar 15; 4(1):118-121.
- 40) Takasaki Y. Serum Lipid Levels and Factors Affecting Atherogenic Index in Japanese Children. *J Physiol Anthropol Appl Human Sci*, 2005 24: 511–515.
- 41) Risk NM, Yousef M. Association of lipid profile and waist circumference as cardiovascular risk factors for overweight and obesity among school children in Qatar. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy* 2012;5 425–432
- 42) Vrablík M, Dobiášová M, Zlatohlávek I, Urbanová Z, Češka R. Biomarkers of Cardiometabolic Risk in Obese/Overweight Children: Effect of Lifestyle Intervention. *Physiol. Res.* 2014 63: 743-752.
- 43) Mata C, Lares M, Hernández P. Enzyme paraoxonase 1 and Modulation of Oxidative Stress. *Síndrome Cardiometabólico*. 2013;3(1):6-10
- 44) Iniesta R, Guinóa E, Moreno V. Statistical analysis of genetic polymorphisms in epidemiological studies. *Gac Sanit.* 2005 Jul-Aug;19(4):333-41.
- 45) Checa CMA. Polimorfismos genéticos: Importancia y aplicaciones. *REV INST NAL ENF RESP MEX*. 2007;20(3): 213-221.
- 46) Ramírez BJ, Vargas AG, Tovilla ZC, Fragoso JM. Single nucleotide polymorphisms (SNPs): functional implications of regulatory-SNP (rSNP) and structural RNA (srSNPs) in complex diseases. *Gac Med Mex*. 2013 Mar-Apr;149(2):220-8.
- 47) Strittmatter WJ, Weisgraber KH, Huang DY, Dong LM, Salvesen GS, et al. Binding of human apolipoprotein E to synthetic amyloid beta peptide: isoform-specific effects and implications for late-onset Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Sep 1;90(17):8098-102.
- 48) Costa LG, Giordano G, Cole TB, Marsillach J, Furlong CE. Paraoxonase 1 (PON1) as a genetic determinant of susceptibility to organophosphate toxicity. *Toxicology*. 2013 May 10;307:115-22.
- 49) Cardoso AS, Gonzaga NA, Medeiros CCM, de Carvalho DF. Association of uric acid levels with components of metabolic syndrome and non-alcoholic fatty liver disease in overweight or obese children and adolescents. *J Pediatr (Rio J)*. 2013 Jul-Aug;89(4):412-8
- 50) So A, Thorens B. Uric acid transport and disease. *J Clin Invest*. 2010 Jun;120(6):1791-9.
- 51) King MW. Fructosa metabolismo. The medical biochemistry page. Visitado 2 de marzo de 2016.
- 52) Colombo CM, Cornejo EV, Raimann BE. Errores innatos en el metabolismo del niño. 2nd. Ed. Santiago de Chile:Editrial Universitaria; 2003.
- 53) Barrera ALA. ESTUDIOS BIOQUÍMICOS DE LOS ERRORES INNATOS DEL METABOLISMO EN COLOMBIA, DURANTE DOS DÉCADAS. *REV. ACAD. COLOMB. CIENC*. 2009 Sep;33(128):377-394.
- 54) Santos CX, Anjos EI, Augusto O. Uric acid oxidation by peroxynitrite: multiple reactions, free radical formation, and amplification of lipid oxidation. *Arch Biochem Biophys*. 1999 Dec 15;372(2):285-94.
- 55) Kuzkaya N, Weissmann N, Harrison DG, Dikalov S. Interactions of peroxynitrite with uric acid in the presence of ascorbate and thiols: implications for uncoupling endothelial nitric oxide synthase. *Biochem Pharmacol*. 2005 Aug 1;70(3):343-54.
- 56) Gersch C, Palii SP, Kim KM, Angerhofer A, Johnson RJ, et al. Inactivation of nitric oxide by uric acid. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2008 Aug;27(8):967-78.

- 57) Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*. 2006 Dec 14;444(7121):860-7.
- 58) Barrio CPA. Revisión de métodos de extracción de ADN a partir de restos óseos en el laboratorio forense. *Rev Esp Med Legal*. 2013;39(2):54-62.
- 59) Ruiz GRLM, Maldonado LV. Reparación del DNA y cáncer. En: Ruiz GRLM *Biología molecular en cáncer*. México D.F: Planeación y desarrollo editorial; 2008 p. 117-120
- 60) Ljungman M. Activation of DNA damage signaling. *Mutat Res*. 2005 Sep 4;577(1-2):203-16.
- 61) Amaru R, Peñaloza R, Miguez H, Torres G, Cuevas H. UMSAgen, método para la extracción simultánea de RNA y DNA para diagnóstico molecular. *Cuad. - Hosp. Clín*. 2008;53(1).
- 62) Burger J, Hummel S, Herrmann B, Henke W. DNA preservation: A microsatellite-DNA study on ancient skeletal remains. *Electrophoresis*. 1999 Jun;20(8):1722-8.
- 63) TriPure Isolation Reagen How to use the reagentt. *Nucleic Acid Isolation and Purification Manual*.
- 64) QIAamp DNA Blood Midi/ Kit, Qiagen, Alemania Flexigene® DNA AGF3000
- 65) ZINEXTS LIFE SCIENCE CORP®.
- 66) Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987;155:335-350.
- 67) Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ. *PCR Strategies*. San Diego (NY): Academic Press, 1995.
- 68) Diazaraque R, Pacheco R, Roiz JC. Polymerase chain reaction. Basis and application in Internal Medicine. *Rev Clin Esp*. 2002 May;202(5):272-4.
- 69) Tamay de Dios L, Ibarra C, Velasquillo C. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad*. Mayo-agosto 2013; 2(2):70-78
- 70) Edwards K, Logan J, Saunders N. Real-Time PCR; An Essential Guide. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Nov 2004;54(5):968.
- 71) Vinueza BC. Real Time PCR: the new age of celular genetic information. *REDVET*. 2009;10(2):1-13.
- 72) Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 1988 Jan 29;239(4839):487-91
- 73) Fox JL, Hsu PH, Legator MS, Morrison LE, Seelig SA. Fluorescence in situ hybridization: Powerful molecular tool for cancer research. *Clin Chem*. 1995 Nov;41(11):1554-9.
- 74) Lee M.A., Squirrell D.J., Leslie D.L., Brown T. Homogeneous Fluorescent Chemistries. In: *Real-Time PCR; An Essential Guide*. 2004.
- 75) Erlich HA, Gelfand D, Sninsky JJ. Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science*. 1991 Jun 21;252(5013):1643-51.
- 76) Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR Analysis: Real-Time Monitoring of DNA Amplification Reactions. *Biotechnology (N Y)*. 1993 Sep;11(9):1026-30.
- 77) Soriguer F y Morcillo S. ¿Qué hacer cuando en los estudios de epidemiología biomolecular la distribución genotípica no se ajusta al equilibrio de Hardy-Weinberg? *Endocrinol Nutr*. 2007;54(3):169-73.
- 78) Schaid DJ, Jacobsen SJ. Biased tests of association: comparisons of allele frequencies when departing from Hardy-Weinberg proportions. *Am J Epidemiol*. 1999 Apr 15;149(8):706-11.

- 79) Barbadilla A. Genética de Poblaciones: definiciones, conceptos básicos, ejercicios, simulaciones, glosario. Visitado 23 de junio de 2016.
- 80) Andrews AT. Electrophoresis of nucleic acids. In: Essential Molecular Biology. A Practical Approach. New York: T. A. Oxford University Press Ed. Brown; 1991
- 81) Diego F. Hernández Ramírez y Javier Cabiedes. Immunological Techniques that Support the Diagnosis of the Autoimmune Diseases. *Reumatol Clin*. 2010 May-Jun;6(3):173-7.
- 82) OxiSelect™ Human Oxidized LDL ELISA CML-LDL Quantitation. CELL BIOLABS, INC.
- 83) Centers for diseases Control and Prevention. BMI percentile calculator for child and teen metric. English versión. Disponible en:
- 84) Barlow SE. Expert Committee Recommendations Regarding The Prevention, Assessment and Treatment of Child and Adolescent Overweight and Obese. Summary Reports. *Pediatrics* 2007;120 (Suppl 4):5164-5192
- 85) National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine
- 86) Asociación médica mundial. Declaración de Helsinki de la AMM Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos.
- 87) Ley general de Salud.
- 88) Comisión Nacional de Investigación del IMSS.
- 89) Bhattacharyya T, Nicholls SJ, Topol EJ, Zhang R, Yang X, Schmitt D. et al. Relationship of paraoxonase 1 with systemic oxidative stress and cvd risk. *JAMA* 2008;299(11):1265-1276.
- 90) Márquez LIDC. Caracterización de la actividad enzimática y polimorfismos genéticos de la paraoxonasa-1 (PON-1), en trabajadores expuestos a plaguicidas organofosforados en el municipio de Soacha 2014. Universidad Nacional de Colombia Facultad de Medicina, Departamento de Toxicología Bogotá, Colombia 2015
- 91) Ramírez JR, Yáñez EL, Mejía SR, Martínez SF. Polimorfismos 55 y 192 de PON1 y actividades de PON1 y BChE en niños. *Asociación Mesoamericana de Ecotoxicología y Química Ambiental*. Enero 2006.
- 92) Moura LM, Faria S, Brito M, Pinto FJ, Kristensen SD et al. Relationship of PON1 192 and 55 gene polymorphisms to calcific valvular aortic stenosis. *Am J Cardiovasc Dis* 2012;2(2):123-132.
- 93) Rojas GAE, Solís HMJ, Piña GB, Vega L, López CL et al. Genetic polymorphisms and activity of PON1 in a Mexican population. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2005 Jun 15;205(3):282-9
- 94) Bojórquez RMC. Enfermedad por hígado graso no alcohólico en pediatría. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 2014;52(Supl 1):S110-S114.
- 95) Martínez SMF, Almenares LD, García JS, Sánchez AMA, Juantorena UA et al. Relationship between the paraoxonase (PON1) L55M and Q192R polymorphisms and obesity in a Mexican population: a pilot study. *Genes Nutr* 2011 6:361–368.
- 96) Tabur S, Torun AN, Sabuncu T. Non-diabetic metabolic syndrome and obesity do not affect serum paraoxonase and arylesterase activities but do affect oxidative stress and inflammation. *European Journal of Endocrinology* 2010;162 535–54.
- 97) Ferretti G, Bacchetti T, Moroni C et al. Paraoxonase activity in high density lipoproteins: a comparison between healthy and obese females. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:1728– 1733.
- 98) Koncsos P, Seres I, Harangi M, Illyé I, Józsa L et al. Human paraoxonase-1 activity in childhood obesity and its relation to leptin and adiponectin levels. *Pediatr Res* 2010;67:309–313

- 99) Garelnabi M y Younis A. Paraoxonase-1 Enzyme Activity Assay for Clinical Samples: Validation and Correlation Studies. *Med Sci Monit*, 2015; 21: 902-908.
- 100) Saruhan E, Olgun A, Oztürk K, Akman S, Erbil MK. Age-related paraoxonase activity changes in Turkish population. *Ann N Y Acad Sci*. 2007 Apr;1100:218-22.
- 101) Seres I, Paragh G, Deschene E, Fulop TJr, Khalil A. Study of factors influencing the decreased HDL associated PON1 activity with aging. *Exp Gerontol*. 2004 Jan;39(1):59-66.
- 102) AnandBabu K, Bharathidevi SR, Sripriya S, Sen P, Prakash VJ, Bindu A, Viswanathan N, Angayarkanni N. Serum Paraoxonase activity in relation to lipid profile in Age-related Macular Degeneration patients. *Exp Eye Res*. 2016 Nov;152:100-112
- 103) Lakshmy R, Ahmad D, Abraham RA, Sharma M, Vemparala K, Siuli DK, Srinath RK, Prabhakaran D. Paraoxonase gene Q192R & L55M polymorphisms in Indians with acute myocardial infarction & association with oxidized low density lipoprotein. *Indian J Med Res* 131, April 2010, pp 522-529