

Perfil de distribución de los genotipos y fenotipos de Paraoxonasa-1 (PON1) en 89 estudiantes de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos

TESIS para optar el Título Profesional de QUÍMICO FARMACÉUTICO
AUTOR

CATAÑO MIRAVAL HÉCTOR CIRO
ASESOR Dr. VÍCTOR IZAGUIRRE PASQUEL
LIMA – PERÚ 2005

..	1
AGRADECIMIENTOS .	3
RESUMEN .	5
SUMMARY . .	7
ABREVIATURAS . .	9
I. INTRODUCCIÓN . .	13
II. GENERALIDADES .	15
2.1. Estructura y Polimorfismos de PON1 .	15
2.2. PON1 y la susceptibilidad a la toxicidad de Organofosforados .	16
2.2.1. Toxicidad y Metabolismo de Compuestos Organofosforados .	16
2.2.2. Rol de PON1 en el Metabolismo de OPs .	17
2.2.3. Efecto de los Polimorfismos de PON1 sobre la actividad catalítica hacia los OPs .	18
2.2.4. Relevancia Clínica de los Polimorfismos de PON1 .	18
2.3. PON1 y la aterosclerosis . .	19
2.3.1. Mecanismo celular y molecular de la Aterosclerosis .	19
2.3.2. Rol antioxidante de PON1 . .	19
2.3.3. Efecto de los polimorfismos de PON1 sobre el desarrollo de la aterosclerosis .	20
2.4. PON1 y el metabolismo de fármacos . .	21
2.5. Análisis Genotipo-fenotipo de PON1: Perspectivas futuras .	21
III. MATERIALES Y MÉTODOS . .	23
3.1. POBLACIÓN .	23
3.2. CRITERIOS DE INCLUSIÓN . .	23
3.3. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN .	24
3.4. MUESTRA BIOLÓGICA .	24
3.5. GENOTIPADO MOLECULAR DE LOS POLIMORFISMOS 192Q/R Y -108C/T DE PON1 .	24

3.5.1. Extracción y purificación de ADN genómico .	24
3.5.2. Amplificación de algunas regiones polimórficas del gen <i>PON1</i> . .	26
3.5.3. Restricción de los productos amplificados .	26
3.6. FENOTIPADO BIOQUÍMICO DE <i>PON1</i> .	27
3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO . .	28
IV. RESULTADOS .	31
V. DISCUSIÓN . .	39
CONCLUSIONES . .	43
BIBLIOGRAFÍA .	45

A mis padres, Héctor y Rosa, como muestra de mi amor por todo su esfuerzo y confianza en cada momento de mi vida. A mis compañeros del Laboratorio de Biología Molecular por todos los momentos compartidos y por su estímulo permanente. A todos aquellos que dedican parte de su vida a la investigación para hacer de este mundo un mejor lugar para vivir.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Amparo Zavaleta, por sus consejos, su paciencia, dedicación, tiempo y confianza que invirtió en mí. Gracias por todo, nunca lo olvidaré.

Al Dr. Víctor Izaguirre, quien con sus consejos, recomendaciones y comentarios hicieron posible la realización de esta Tesis.

A la Dra. Elizabeth Carranza, por su apoyo desinteresado, sus consejos y por su ejemplo de vida en la investigación científica.

RESUMEN

En el presente estudio, se determinó el perfil de distribución de los genotipos y fenotipos de Paraoxonasa-1 (PON1) en 89 estudiantes de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, mediante técnicas de biología molecular y bioquímicas, respectivamente. Se encontró que la actividad de PON1 tuvo una distribución unimodal y su media fue 167.01 ± 60.84 U/L. La media de la actividad arilesterasa (ArE) fue 63.44 ± 21.59 KU/L. Las frecuencias genotípicas para el polimorfismo *PON1* 192 (*QQ*, *QR*, *RR*) fueron 0.236, 0.607 y 0.157 respectivamente, mientras que para el polimorfismo *PON1* -108*C/T* (*CC*, *CT*, *TT*) fueron 0.315, 0.596 y 0.09 respectivamente. En la población estudiada existe predominio de los heterocigotos *QR* y *CT* sobre los homocigotos.

SUMMARY

In the present study, it was investigated the distribution profiles of Paraoxonase-1 (PON1) genotypes and phenotypes in 89 students of Pharmacy and Biochemistry of San Marcos University, using molecular and biochemistry techniques, respectively. It has found that the PON1 activity follows a unimodal distribution and its mean was 167.01 ± 60.84 U/L. The mean of arylesterase activity (ArE) was 63.44 ± 21.59 KU/L. The genotype frequencies to *PON1* 192 (*QQ*, *QR*, *RR*) polymorphism were 0.236, 0.607 and 0.157 respectively, while the frequencies to *PON1* -108*C/T* (*CC*, *CT*, *TT*) polymorphism were 0.315, 0.596 and 0.09 respectively. In the studied population exists a predominance of the heterozygous *QR* and *CT* on the homozygous.

ABREVIATURAS

Perfil de distribución de los genotipos y fenotipos de Paraoxonasa-1 (PON1) en 89 estudiantes de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos

PONI	Proteína Paraoxonasa-1.
PON2	Proteína Paraoxonasa-2.
PON3	Proteína Paraoxonasa-3.
PON1	Gen que codifica para Paraoxonasa-1.
PON1 ^{-/-}	Proteína Paraoxonasa-1 no funcional.
<i>PON1 192Q/R</i>	Polimorfismo genético en el codón 192 con sus formas alternativas Q y R.
<i>PON1 55L/M</i>	Polimorfismo genético en el codón 55 con sus formas alternativas L y M.
<i>PON1 -108C/T</i>	Polimorfismo genético en la posición -108 con sus formas alternativas C y T.
PON1 _{192R}	Isoenzima R de Paraoxonasa-1.
PON1 _{192Q}	Isoenzima Q de Paraoxonasa-1.
<i>PON1 192*R</i>	Alelo R del gen de Paraoxonasa-1.
<i>PON1 192*Q</i>	Alelo Q del gen de Paraoxonasa-1.
AA	Fenotipo de baja actividad de Paraoxonasa-1 hacia paraoxon.
BB	Fenotipo de alta actividad de Paraoxonasa-1 hacia paraoxon.
AB	Fenotipo de actividad intermedia de Paraoxonasa-1 hacia paraoxon.
A	Alelo A de Paraoxonasa-1.
B	Alelo B de Paraoxonasa-1.
ADN	Ácido Dexosirribonucleico.
Pb	Pares de bases.
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa.
RFLP	Polimorfismo en Longitud de los Fragmentos de Restricción.
LD	Desequilibrio del Ligamiento.
PON1cs	Actividad de Paraoxonasa-1 con estimulación.
ArE	Actividad Arilesterasa de Paraoxonasa-1.
PON1cs/ArE	Cociente entre la actividad de Paraoxonasa-1 con estimulación salina y la actividad Arilesterasa.
AChE	Acetilcolinesterasa.
NTE	Esterasa neurotóxica.
Ops	Organofosforados.
OPIDN	Neuropatía retardada inducida por organofosforados.
HDL	Lipoproteína de alta densidad.
LDL	Lipoproteína de baja densidad.
<i>Alw I</i>	<i>Acinotebacter lwoffii</i> .
<i>BstU I</i>	<i>Bacillus stearothermophilus</i> U458.
n	Número de individuos.
χ^2	Prueba estadística del Chi-Cuadrado.
S.D.	Desviación estándar.
ANOVA	Prueba estadística que se basa en el análisis de varianza.

PONI	Proteína Paraoxonasa-1.
P	Significancia.
nm	Nanómetros.
% w/v	Porcentaje del peso (w) con respecto al volumen (v).
U	Unidades.
UV	Ultravioleta.

I. INTRODUCCIÓN

Las paraoxonasas son una familia de enzimas compuesta por tres miembros: PON1, PON2 y PON3. El miembro más estudiado ha sido Paraoxonasa-1 (PON1), esterasa/lactonasa asociada a la lipoproteína de alta densidad (HDL) y codificada por el gen *PON1*. Inicialmente, PON1 fue investigada por su capacidad de hidrolizar *in vitro* diversos organofosforados (OPs). En las últimas dos décadas se ha demostrado que PON1 es la responsable del rol protector de las HDL contra la aterosclerosis y recientemente se ha reportado que PON1 esta involucrada en el metabolismo de algunos fármacos. No obstante, la presencia de polimorfismos genéticos en *PON1* afectan la expresión y la actividad de PON1. Se ha descrito correlación entre la variación en la actividad de PON1, debida a los polimorfismos en el gen, con la susceptibilidad a la toxicidad de OPs, el riesgo de enfermedades cardiovasculares, el fracaso terapéutico y/o mayores efectos indeseados de ciertos fármacos. Por ello, Conocer la actividad enzimática, los niveles de expresión y los genotipos de PON1 en diversas poblaciones toma especial relevancia en identificar individuos susceptibles a los efectos tóxicos de los insecticidas OPs; en la medicina clínica, para identificar individuos con mayor riesgo a enfermedades cardiovasculares; y en farmacología, para predecir que individuos responderán favorablemente a la terapia farmacológica suministrada y/o presentarán mayores efectos indeseados. Diversos estudios reportan que conociendo la actividad y los niveles de expresión de PON1 se puede determinar los fenotipos de PON1, y a su vez inferir de estos los genotipos. Sin embargo, la manera directa para determinar los genotipos de *PON1* es mediante análisis del ADN.

El objetivo de este estudio fue determinar el perfil de distribución de los genotipos y

los fenotipos de PON1 en 89 estudiantes de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos con la finalidad de estimar mediante inferencia estadística la distribución de genotipos y fenotipos de PON1 de la población Limeña.

II. GENERALIDADES

2.1. Estructura y Polimorfismos de PON1

La Paraoxonasa-1 (PON1) es una proteína de un peso molecular de 43-45 Kda, conteniendo 3 cadenas de carbohidratos, que representan el 15.8% de su peso (1). Mediante la tecnología del ADN recombinante, se determinó que *PON1* codifica una proteína de 355 aminoácidos, de los cuales sólo el residuo metionina amino-terminal es removido durante la maduración y secreción de PON1 (2). Además, se demostró que la estructura conformacional de PON1 presenta un puente disulfuro intramolecular entre la posición Cys-42 y Cys-353, con una cisteína libre en la posición 283 (3). PON1 es sintetizada principalmente en el hígado, y es liberada por un proceso que involucra la participación de la lipoproteína de alta de densidad (HDL). La HDL se une débilmente a la membrana celular de los hepatocitos y remueve la PON1 de la membrana (4). Esto es posible, debido a que PON1 se asocia a la HDL a través de su secuencia hidrofóbica N-terminal altamente conservada (5).

PON1 esta localizada en el cromosoma 7q21-22 (6) y presenta dos polimorfismos en su secuencia codificante, resultando en una sustitución del aminoácido Glutamina (Q) por Arginina (R) en la posición 192 y una sustitución del aminoácido Leucina (L) por Metionina (M) en la posición 55 (6,7). Además, se ha descrito al menos 5 polimorfismos

en su región reguladora 5', en las posiciones -907/909, -824/832, -162, -126 y -107/108 (8,9,10).

2.2. PON1 y la susceptibilidad a la toxicidad de Organofosforados

2.2.1. Toxicidad y Metabolismo de Compuestos Organofosforados

Los organofosforados (OPs) son sustancias tóxicas utilizadas como plaguicidas y en la fabricación de armas químicas (agentes de guerra neurológicos). A corto plazo, la exposición a OPs en dosis altas causa intoxicaciones agudas, seguidas en muchos casos por un cuadro clínico llamado "síndrome intermedio" o por una neurotoxicidad retardada (11,12). La toxicidad aguda es resultado de la inhibición de la acetilcolinesterasa (AChE) del tejido neural, seguido de un incremento de acetilcolina en la sinapsis, produciendo un síndrome colinérgico agudo vía una neurotransmisión continua (13). Resultado de la debilidad del músculo respiratorio, broncoespasmo y broncorrea puede ocurrir la muerte rápidamente. La mayoría de los pacientes pueden sobrevivir a la crisis colinérgica inicial, si existe una apropiada y rápida intervención. Sin embargo, algunos de estos pacientes pueden experimentar 24 a 96 horas después, un síndrome intermedio caracterizado por paresia aguda del músculo respiratorio, paresia de los miembros proximales y músculos faciales, produciéndose también parálisis de los nervios craneales (14). Después de dos o tres semanas del episodio agudo de envenenamiento también puede ocurrir una neuropatía retardada inducida por organofosforados (OPIDN) (13). Los rasgos más comunes de este síndrome recaen sobre el Sistema Nervioso Central y Periférico produciéndose una neuropatía mixta sensorio-motriz. Esto causa debilidad muscular distal progresiva, ataxia en los miembros inferiores, parálisis flácida y espástica. Actualmente, el mecanismo del síndrome intermedio es incierto (11), mientras que el mecanismo de la neuropatía retardada se debería a la inhibición de una enzima llamada esterasa neurotóxica (NTE) (15).

Si bien, los efectos tóxicos de los plaguicidas organofosforados son muy conocidos a corto plazo, sus efectos a largo plazo recién han comenzado a ser identificados. Diversos estudios publicados han reportado que la exposición a OPs a dosis bajas en periodos de tiempo prolongados pueden producir neurotoxicidad (16,17,12), caracterizada con el descenso persistente de la funcionalidad neuropsicológica (incluyendo la atención acústica, atención verbal, memoria visual, velocidad visomotora, secuenciación y solución de problemas, estabilidad motora, reacción y destreza).

La exposición a OPs ocurre en personas que están en contacto con estas sustancias como resultado de su ocupación, así como en la población general que esta expuesta por el ingreso y difusión de los OPs en el ambiente (contaminación residual). Los OPs pueden ingresar al organismo humano vía inhalación, absorción por la piel, absorción por la conjuntiva ocular o por ingestión (18). Una vez dentro del organismo y antes que

alcancen el Sistema Nervioso Central (sitio de acción), estos compuestos son detoxificados ampliamente en el hígado por diversas isoenzimas del citocromo P450. No obstante, un número de OPs con uniones P=S son metabolizados generando análogos oxigenados P=O, denominados oxones, los cuales son potentes inhibidores de la AChE y NTE. Este proceso es conocido como bioactivación y ocurre por una reacción llamada desulfuración oxidativa. Además, si algún oxon u OP escapa a la detoxificación hepática este es detoxificado hidrolíticamente en la sangre por PON1 (19).

2.2.2. Rol de PON1 en el Metabolismo de OPs

PON1 es una enzima asociada a la HDL, que está en mayor concentración en el plasma y en el hígado. In vitro, se demostró que PON1 en presencia de Ca^{+2} es capaz de hidrolizar diversos oxones como clorpirifos oxon, diazoxon, paraoxon, así como los agentes de guerra neurológicos soman y sarin, sugiriendo que PON1 podría tener un rol importante en la detoxificación de OPs in vivo y por ello, modular su toxicidad. Diversos estudios reportan resultados que apoyan esta hipótesis. Una evidencia inicial fue dada por Main (1956), el cual reportó que la inyección de PON1 exógena, proveniente de suero de conejos, a ratas, las protegió de la toxicidad aguda de paraoxon, la cual les fue administrado por vía intravenosa (20). Adicionalmente, evidencias indirectas también han sido dadas al comparar la sensibilidad o resistencia a la toxicidad de algunos OPs entre diferentes especies de animales. Por ejemplo, las aves fueron más sensibles a la toxicidad de paraoxon, diazoxon y pirimifos oxon que varios mamíferos; debido a su escasa actividad de PON1 (21,22). Además, los conejos, los cuales tienen la actividad de PON1 siete veces más alta que las ratas; fueron más resistentes a la toxicidad aguda de paraoxon.

En un posterior estudio, similar al de Main, se utilizaron inyecciones de PON1 purificada de suero de conejo en ratas y se observó que la actividad hidrolítica hacia paraoxon y clorpirifos oxon se elevó en 9 y 50 veces más, respectivamente. La toxicidad de los dos compuestos se evaluó midiendo el grado de inhibición de Colinesterasa en plasma, eritrocitos, diafragma y cerebro, siguiente a la exposición por vía oral, dermal, intraperitoneal o intravenosa. Los animales tratados con inyecciones de PON1 purificada fueron menos sensibles hacia los efectos tóxicos de los OPs que en ratas control (23).

Estudios posteriores fueron realizados en ratones, principalmente porque estos animales son ideales para la manipulación genética y requieren mucha menor cantidad de enzima purificada para los ensayos de protección por PON1. Los experimentos iniciales tuvieron como objetivo hacer conocer el grado de aumento de la actividad plasmática de PON1 cuando la enzima purificada es administrada por distintas vías. Se observó que luego de la administración de PON1 purificada por vía intravenosa + vía intramuscular, los niveles de PON1 se incrementaron por un periodo de 30 horas. Después, se demostró que PON1 exógena, administrada vía intravenosa + intramuscular antes o después (hasta 3 horas) de la exposición a clorpirifos, protegió a ratones contra su toxicidad (24).

Posteriormente se investigó la toxicidad de OPs en ratones genéticamente modificados ($\text{PON1}^{-/-}$), los cuales no tenían actividad plasmática y hepática de PON1

hacia paraoxon y diazinon pero una muy baja actividad hacia clorpirifosoxon. Estos ratones (PON1^{-/-}) fueron más sensibles hacia la toxicidad de clorpirifosoxon y diazinon; así como también a sus respectivos compuestos parentales. Sorprendentemente, los ratones (PON1^{-/-}) no mostraron un incremento en la sensibilidad hacia paraoxon, a pesar de la ausencia de la actividad en el plasma y el hígado. Se cree que esto se deba a otro sistema detoxificador distinto de PON1 y que actúa a nivel hepático (25).

2.2.3. Efecto de los Polimorfismos de PON1 sobre la actividad catalítica hacia los OPs

Diversos estudios han demostrado que el polimorfismo *PON1* 192Q/R afecta la actividad catalítica de PON1, dependiendo del sustrato. Así, la isoenzima PON1^{192R} hidroliza más eficientemente paraoxon que PON1^{192Q}, mientras que lo contrario ocurre frente a diazoxon y los agentes de guerra neurológicos soman y sarin (6,7,26). Por otro lado, el polimorfismo *PON1* 55 L/M ha sido asociado con la variación de los niveles plasmáticos de PON1. Sin embargo, estudios recientes contradicen esta afirmación reportando que la variación de los niveles plasmáticos de PON1 esta asociada con uno o más polimorfismos de la región reguladora 5' de *PON1* y que el efecto descrito del polimorfismo *PON1* 55 L/M sobre los niveles plasmáticos de PON1 no se debe a un cambio de aminoácido, sino a una relación de desequilibrio del ligamiento (*LD*) con el polimorfismo en la posición -108 (C/T) de la región reguladora de *PON1*, el cual demostró producir una variación del 22.8% en la expresión de *PON1* (27,10). Otro polimorfismo, ubicado en la posición -162, demostró producir una variación de 2.4% en la expresión de *PON1*. Los polimorfismos ubicados en la posición -909 y -126 no demostraron afectar significativamente la expresión.

2.2.4. Relevancia Clínica de los Polimorfismos de PON1

Estudios *in-vitro* e *in-vivo* han provisto gran evidencia sobre el rol importante de PON1 en el metabolismo de diversos OPs, así como la influencia de los polimorfismos de *PON1* en la susceptibilidad hacia la toxicidad de los OPs. Sin embargo, la confirmación de estas evidencias en humanos todavía continua en investigación. En 1995, el tren subterráneo de Tokio fue objeto de un atentado terrorista con el agente neurotóxico sarin, el cual causo la muerte de 12 individuos y más de 5000 afectados (28, 29). Sarin es metabolizado por PON1 y en ensayos *in vitro* el alelo *PON1* 192*Q es 10 veces más efectivo en hidrolizar a sarin, que *PON1* 192*R (26). En la población japonesa la frecuencia del alelo *PON1* 192*R fue 0.66 a comparación de 0.25-0.30 para poblaciones caucásicas (30,31). Por ello, se podría esperar que los individuos japoneses que sufrieron el ataque pudieron estar más predispuestos hacia la toxicidad de sarin, conociendo que el alelo *PON1* 192*R tiene una baja actividad hidrolítica hacia sarin. Sin embargo, de 10 víctimas del ataque, 7 poseían el alelo *PON1* 192*Q (6 heterocigotos Q/R y 1 homocigoto QQ). Al parecer, el alelo que confiere alta actividad hidrolítica hacia sarin, no protegió contra la intoxicación aguda por sarin (32). Esto sugiere que PON1 probablemente puede aportar escasa protección frente a una intoxicación aguda por OPs, en la que existe una

alta exposición. Sin embargo, en exposiciones repetidas a bajas dosis, el sistema catalítico mediado por PON1 podría tomar especial relevancia. Un estudio realizado por Hernández et al. (33) en 108 trabajadores de invernadero reportó que el alelo *PON1 192*R* estuvo asociado con un alto riesgo de inhibición de la actividad de colinesterasa por encima del 25%, lo cual apoya la hipótesis que los polimorfismos de PON1 están asociados con la susceptibilidad a la toxicidad de plaguicidas anticolinesterásicos. Son necesarios mayores estudios para confirmar el rol de PON1 en la exposición crónica a plaguicidas OPs, principalmente por que en las zonas rurales de Perú existe un alto porcentaje de la población que realiza actividades agrícolas, en las que están expuestos a diversos plaguicidas como los OPs; y además, debido a la contaminación residual, está en aumento la población expuesta a este tipo de compuestos tóxicos.

2.3. PON1 y la aterosclerosis

2.3.1. Mecanismo celular y molecular de la Aterosclerosis

La aterosclerosis es una enfermedad de las arterias grandes e intermedias en las que aparecen lesiones grasas, llamadas placas ateromatosas, en las superficies internas de las paredes vasculares. Estas placas comienzan como depósitos de cristales minúsculos de colesterol en la íntima y el músculo liso subyacente. Con el tiempo, los cristales crecen y coalescen para formar lechos cristalinos. Además los tejidos fibrosos y de músculo liso de alrededor proliferan para formar placas más grandes, reduciendo en gran medida el flujo sanguíneo y provocando la formación de coágulos; con la resultante formación de trombos, bloqueando así de forma brusca todo el flujo sanguíneo de la arteria. Casi la mitad de todas las personas de Estados Unidos y Europa fallecen en el estadio final de la aterosclerosis (34). Aproximadamente dos terceras partes de estas muertes son producidas por la trombosis de una o más arterias coronarias (34). El factor más importante que provoca la aterosclerosis es la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), las cuales provocan daño a las células endoteliales de las paredes vasculares (35).

2.3.2. Rol antioxidante de PON1

Se conoce desde hace mucho tiempo que existe una relación inversa entre las HDL y el riesgo de desarrollar aterosclerosis (34). Diversos estudios demuestran que PON1, una enzima asociada a la HDL, sería la responsable del rol protector de las HDL contra la aterosclerosis (36). PON1 es capaz de hidrolizar peróxidos lipídicos evitando la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) (37). Esta afirmación es apoyada por un estudio realizado en ratones por Shih et al. (38). Se dividieron a los ratones en 2 grupos; al primer grupo se eliminó el gen *PON1* mientras que el segundo sirvió de control. Ambos grupos fueron sometidos a una dieta inductora de aterosclerosis. El primer grupo fue más

susceptible para desarrollar aterosclerosis a comparación del segundo. Esto demostró que PON1 puede proteger contra la aterosclerosis. Además otros estudios en ratones, humanos y otras especies demostraron que la baja actividad de PON1 esta asociada con signos de aterosclerosis (39).

2.3.3. Efecto de los polimorfismos de PON1 sobre el desarrollo de la aterosclerosis

Estudios recientes reportan que la variación interindividual de la actividad de PON1 puede afectar su rol protector contra la aterosclerosis (40,41,42). Esto se debería a la influencia de polimorfismos genéticos y factores ambientales que modifican la expresión génica.

Inicialmente algunos estudios mostraron una asociación entre la presencia de la isoforma PON1_{192R} y las enfermedades cardiovasculares, sugiriendo que esta isoforma hidroliza los peróxidos lipídicos menos eficientemente que PON1_{192Q}. Esto fue demostrado experimentalmente por Aviram et al. (43), quienes reportaron que ambas isoformas de PON1 redujeron el contenido de peróxidos lipídicos en lesiones ateroscleróticas coronarias y de carótida humana, siendo la isoforma PON1_{192Q} dos veces más eficiente que PON1_{192R}.

Estudios posteriores que consideraron a los genotipos de PON1 como un predictor de enfermedades cardiovasculares han reportado resultados que se contradicen, pero todos ellos sugieren que el genotipo es uno de varios predictores de enfermedades cardiovasculares. El alelo *PON1 192*R* o el genotipo *PON1 192 RR* ha sido asociado con enfermedades cardiovasculares en varios (44-51) pero no en todos (52-61) los estudios realizados hasta la actualidad. Se cree que esta asociación es positiva pero débil o variable y es probable que los resultados contradictorios sean el resultado de la heterogeneidad entre las poblaciones estudiadas (39).

Otro polimorfismo estudiado fue *PON1 55L/M*. El genotipo *PON1 55LL* predijo enfermedades cardiovasculares en diversos estudios (62,63,64) incluyendo población caucásica en la cual los genotipos del polimorfismo *PON1 192Q/R* no predijeron enfermedad (65). Sin embargo, los genotipos de *PON1 55 L/M* no predijeron enfermedades cardiovasculares en otros estudios de cohortes (66,63,59,67), incluyendo una población asiática-india, en la cual los genotipos del polimorfismo *PON1 192Q/R* si predijeron enfermedades cardiovasculares (63). Otros estudios sugieren que el polimorfismo *PON1 55L/M* esta correlacionado con la concentración plasmática de PON1 por medio de una relación de desequilibrio del ligamiento con el polimorfismo *PON1 -108 C/T* (10) y posiblemente también a través del incremento de la catálisis proteica de la isoforma PON1_{55M} (68).

Recientemente se ha reportado que el nivel de la actividad de PON1 puede ser mejor predictor de enfermedades cardiovasculares que el genotipo. En un estudio realizado en 212 hombres caucásicos, se encontró una baja actividad de PON1 en sujetos con una severa enfermedad de la arteria carótida comparado a los controles (69). La actividad de PON1 predijo la enfermedad independientemente de los genotipos de *PON1 192 Q/R* o

PON1 55L/M. Otros estudios también han confirmado la asociación entre baja actividad de PON1 y enfermedades coronarias y de la arteria carótida. James et al. (70) encontró que la actividad de PON1 en pacientes diabéticos de tipo 2 fue menor en aquellos con enfermedades coronarias que aquellos sin enfermedades coronarias. Mackness et al. (66) reportó una baja actividad de PON1 en pacientes con enfermedades coronarias (417 casos y 282 controles).

2.4. PON1 y el metabolismo de fármacos

Recientemente se han reportado nuevos sustratos para PON1 como lactonas y ésteres de carbonatos, por lo que PON1 podría estar involucrada en el metabolismo de algunos fármacos con importantes consecuencias. Así, la variación genética interindividual de PON1 podría ser relevante en la efectividad y/o efectos indeseados de una droga. Billecke et al. (71) encontró que el diurético espironolactona y las drogas hipocolesterolémicas mevastatina, lovastatina y simvastatina son hidrolizadas por PON1 y que las isoformas PON1^{192Q} y PON1^{192R} las hidrolizan con similar eficiencia. También se ha reportado que prodrogas pueden ser bioactivados o inactivados in vivo por PON1. Por ejemplo los glucocorticoides γ -lactonas son inactivados (72), mientras que el antibacteriano Prulifloxacin es activado (73). La activación de la prulifloxacin ocurre a través de una hidrólisis, que es mayor por la isoforma PON1^{192Q}. Al parecer la cisteína libre en la posición 284 de PON1, el cual no es requerido para la hidrólisis de OPs, es esencial para proteger a la LDL de la oxidación y en el metabolismo de fármacos (73,74).

Estas evidencias sugieren que en el diseño de las siguientes generaciones de nuevos fármacos deben tomarse en cuenta las variaciones interindividuales de PON1 para reducir el fracaso terapéutico y/o efectos indeseados.

2.5. Análisis Genotipo-fenotipo de PON1: Perspectivas futuras

Los polimorfismos de *PON1* influyen cualitativamente y cuantitativamente a PON1, contribuyendo grandemente en la variación interindividual de su actividad. El polimorfismo *PON1* 192Q/R influye cualitativamente a PON1, determinando la eficiencia catalítica hacia determinados xenobióticos como OPs, fármacos, así como probables sustratos fisiológicos como peróxidos lipídicos. El polimorfismo *PON1* -108C/T influye cuantitativamente, variando la expresión génica. Por ello, conocer la eficiencia catalítica hacia determinado sustrato y los niveles de expresión de PON1 así como los genotipos de *PON1* toma especial relevancia en los campos de la toxicología, para identificar individuos susceptibles a los efectos tóxicos de los plaguicidas OPs; en el campo de la medicina clínica, para identificar individuos con mayor riesgo a enfermedades cardiovasculares; y en el campo de la farmacología, para predecir que individuos

responderán favorablemente a la terapia farmacológica suministrada y/o presentarán efectos indeseados. Esta información puede ser obtenida conociendo el genotipo y fenotipo individual.

El genotipo puede ser determinado mediante técnicas moleculares, identificando los polimorfismos a nivel del ADN, mientras los fenotipos se pueden determinar planteando la actividad de PON1 hacia 2 sustratos: fenilacetato y paraoxon (76). Este método proporciona distribuciones trimodales correspondiéndose cada moda con los fenotipos de baja, intermedia y alta actividad (76). La actividad de PON1 hacia fenilacetato, conocida como actividad arilesterasa (ArE), es un indicador de los niveles de expresión de PON1 (concentración enzimática), debido a que ambas isoenzimas de PON1 (Q y R) hidrolizan fenilacetato con similar eficiencia, mientras la actividad de PON1 hacia paraoxon evidencia la presencia del polimorfismo *PON1 192Q/R*, siendo paraoxon hidrolizado más eficientemente por la isoenzima R que Q.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. POBLACIÓN

Se contacto con la mayoría de estudiantes del primero a quinto año de estudios de la carrera profesional de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de san Marcos, y se les explicó a detalle el propósito del estudio. De los estudiantes que aceptaron participar voluntariamente, sólo 89 (42 hombres y 47 mujeres) cumplieron los criterios de inclusión y exclusión; y fueron considerados para el estudio. Las edades de los participantes comprendieron entre 18 y 31 años. Todos ellos firmaron una carta de consentimiento informado.

3.2. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Sujetos aparentemente sanos.
- Haber nacido en Lima.

3.3. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Tener vínculo de consanguinidad con alguno de los demás participantes.
- Tener antecedentes de problemas renales, hepáticos y/o cardiovasculares.
- Estar bajo medicación en el momento del estudio.

3.4. MUESTRA BIOLÓGICA

De cada persona se extrajeron 4 mL de sangre en tubos vacutainer utilizando como anticoagulante la heparina. Esto fue así, debido a que la actividad de PON1 hacia los sustratos a utilizar (paraoxon y fenilacetato) es Calcio-dependiente, siendo necesario utilizar un anticoagulante que no secuestre el calcio de la muestra sanguínea.

Cada muestra sanguínea fue dividida en dos partes iguales, una parte fue destinada a los ensayos de biología molecular y otra a los ensayos bioquímicos. La parte destinada a los ensayos bioquímicos se centrifugó a 2500 RPM durante 5 minutos y sólo se conservó el plasma para el análisis. Ambos, el plasma y las muestras sanguíneas totales, fueron almacenadas en congelación hasta su procesamiento.

3.5. GENOTIPADO MOLECULAR DE LOS POLIMORFISMOS 192Q/R Y -108C/T DE PON1

El análisis molecular fue realizado en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

3.5.1. Extracción y purificación de ADN genómico

Se procedió a extraer el ADN genómico de sangre total con anticoagulante heparina por el método Fenol-Cloroformo.

A. Principio: El ADN geonómico es liberado de la célula mediante lisis de la membrana celular y nuclear con un agente tensoactivo. El componente proteico es precipitado con fenol y los componentes orgánicos solubles son removidos con cloroformo. Después el ADN es purificado con isopropanol y etanol; y finalmente es disuelto en agua o un buffer que permita una mejor conservación.

B. Muestra: Sangre periférica con anticoagulante heparina.

C. Equipos, Materiales y Soluciones Reactivas:**a) Equipos:**

- Microcentrífuga.
- Pipetas automáticas Gilson □ (1000 uL, 200 uL y 20 uL).
- Baño María.

b) Materiales:

- Tubos de microcentrífuga de 2 mL y de 1.5 mL.
- Papel toalla.
- Guantes estériles.
- Puntas para pipetas automáticas.

c) Soluciones Reactivas:

Todos los reactivos utilizados para Biología Molecular fueron Ultra puros.

- Buffer fosfato pH = 7.0.
- Buffer de digestión pH = 8.0 (Urea 4 M, NaCl 0.2 M, Tris-HCl 100 mM, Dodecilsulfato de sodio (SDS) 0.5%, EDTA 10 mM y Proteinasa K 1 mg/mL, añadido antes de usar).
- Fenol.
- Cloroformo.
- Isopropanol.
- Acetato de Sodio 3 M.
- Etanol 70%.
- Buffer TE (Tris-HCl 10 mM y EDTA 1 mM, pH= 8.0)
- Buffer TBE (Tris-Base 89 mM, Ácido Bórico 89 mM y EDTA 2 mM, pH= 8.3).

D. Técnica Operatoria:

a. Tratamiento de la muestra: En un tubo de microcentrífuga de 2 mL, se adicionó: 200 uL de sangre y se centrifugó. El paquete globular se lavó con buffer fosfato y luego se le adicionó 600 uL del buffer de digestión e incubó a 57 °C por 12 horas.

b. A la muestra tratada:

- Se adicionó 800 uL de fenol, luego se agitó por 5 minutos y se centrifugó a 12000 RPM por 5 minutos.
- Se removió la fase acuosa a otro tubo de microcentrífuga de 2 mL y se adicionó igual volumen de cloroformo que el volumen de la fase acuosa removida. Luego, se agitó por 5 minutos y centrifugó a 12000 RPM por 5 minutos.
- Se removió la fase acuosa a otro tubo de microcentrífuga de 1.5 mL y se adicionó igual volumen de isopropanol que el volumen de la fase acuosa removida. Luego, se

adicionó acetato de sodio 3 M igual a 1/6 del volumen de isopropanol añadido. Esta mezcla se colocó a -20°C por una hora y luego se centrifugó a 12000 RPM por 15 minutos.

- Se descartó el sobrenadante y se recuperó el pellet. Luego, se resuspendió el pellet en 1 mL de etanol 70% y centrifugó a 12000 RPM por 10 minutos.
- Finalmente, se descartó el sobrenadante y se recuperó el pellet. Este se dejó secar por 1 hora y luego se resuspendió en 20 a 30 uL de TE.

3.5.2. Amplificación de algunas regiones polimórficas del gen *PON1*.

Las regiones genómicas que contienen los polimorfismos *192 Q/R* y *-108 C/T* fueron amplificadas mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polimerase Chain Reaction, PCR) según protocolo estándar descrito por Humbert et al. (6) y Brophy et al. (10): a partir de 100 ng de ADN genómico, utilizando los cebadores: Sentido 5'-TATTGTTGCTGTGGGACCTGAG-3' y Antisentido 5'-CACGCTAAACCCAAA-TACATCTC-3' para el polimorfismo *192*; y Sentido 5'-GACCGCAAGCCA-CGCCTTCTGTGCACC-3' y Antisentido 5'-TATATTTAATTGCAGCCGCAGCC-CTGCTGGGGCAGCGCCGATTGGCCCGCCGC-3' para el polimorfismo *-108* (Invitrogen.™). Las condiciones de cada ciclo de reacción, programadas en un termociclador Perkin Elmer 2400, fueron: desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 64°C y 63°C para las regiones *192* y *-108* respectivamente durante 1 minuto y polimerización a 72°C durante 2 minutos. Estas condiciones se repitieron durante treinta y cinco ciclos, y al finalizar se efectuó una última polimerización a 72°C durante 7 minutos. En todos los casos se efectuaron controles negativos de la reacción de PCR sin añadir DNA molde.

3.5.3. Restricción de los productos amplificados

Para evidenciar los polimorfismos *PON1 192 Q/R* y *PON1 -108C/T*, 1 μg de cada producto amplificado se cortó por separado con 2.5 U de la enzima *Afl* (New England Biolabs™) a 37°C y con 2.5 U de la enzima *BstU I* (New England Biolabs™) a 60°C respectivamente, durante toda la noche. Finalmente, el producto de la restricción se separó por electroforesis en gel de agarosa 3:1™ HRB (AMRESCO) al 3.5% (w/v), se coloreó con bromuro de etidio; y se visualizó y fotografió en un transiluminador UV a 302 nm.

El análisis de los productos digeridos se realizó considerando el tamaño molecular en pares de bases de los fragmentos de RFLP estimados. Para el polimorfismo *192* si se observa 2 fragmentos de 68 pb y 31 pb indica que está presente el alelo *Q* y si se observa un sólo fragmento de 99 pb indica que está presente el alelo *R*. Para el polimorfismo *-108* si se observa 2 fragmentos de 52 pb y 67 pb indican que está presente la forma *-108C* y si se observa un sólo fragmento de 119 bp indica que está presente la forma *-108T*.

3.6. FENOTIPADO BIOQUÍMICO DE PON1

El análisis bioquímico fue realizado en el Laboratorio de Bioquímica del Instituto Nacional de Biología Andina de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Para determinar los fenotipos de PON1 se utilizó el cociente de la actividad de paraoxonasa con estimulación (PON1cs) hacia el sustrato paraoxon dividido por la actividad de paraoxonasa hacia el sustrato fenilacetato (actividad Arilesterasa, ArE) como ha sido descrito por Reiner et al. (75) y Eckerson et al. (76).

A. Equipos, Materiales y soluciones Reactivas:

a) Equipos:

- Espectrofotómetro cuyo rango es Ultravioleta y Visible, modelo Hewlett Packard 8452A.
- Baño María.

b) Materiales:

- Celdas de cuarzo y descartables.
- Pipetas.
- Agitadores.

c) *Soluciones Reactivas:* Todos los reactivos utilizados para la determinación bioquímica fueron de grado ACS (American Chemical Society).

- SOLUCIÓN REACTIVA A: Glicina-NaOH 50 mM pH= 10.00 conteniendo 1 mM de CaCl_2 y 1 M de NaCl y paraoxon 1 mM.
- SOLUCIÓN REACTIVA B: Glicina-NaOH 50 mM pH= 10.00 conteniendo 1 mM de CaCl_2 y paraoxon 1 mM.
- SOLUCIÓN REACTIVA C: Tris-HCl 0.1 M pH= 8.00 conteniendo 2 mM de CaCl_2 y fenilacetato 1 mM.

B. Técnica Operatoria para la determinación cuantitativa de la actividad paraoxonasa sin estimulación (PON1)

Condiciones: Longitud de onda: 405 nm, Temperatura: 25°C.

- 1.- Se hizo el blanco con el Reactivo B.
- 2.- Se midió 1 mL de Reactivo B, se adicionó 25 uL de plasma y se mezcló.
- 3.- Se monitorizó la reacción durante 3 minutos, con intervalos de tiempo de 30 segundos.

4.- Se calculó el promedio de absorbancia por minuto (Abs/min).

5.- Se determinó la actividad enzimática en U/L, multiplicando Abs/min por el factor 2180.8.

C. Técnica Operatoria para la determinación cuantitativa de la actividad paraoxonasa con estimulación (PON1cs).

Condiciones: Longitud de onda: 405nm, Temperatura: 25°C.

1.- Se hizo el blanco con el Reactivo A.

2.- Se midió 1mL de Reactivo A, se adicionó 10 uL de plasma y se mezcló.

3.- Se monitorizó la reacción durante 3 minutos, con intervalos de tiempo de 30 segundos.

4.- Se calculó el promedio de absorbancia por minuto (Abs/min).

5.- Se determinó actividad enzimática en U/L, multiplicando Abs/min por el factor 5372.3.

D. Técnica Operatoria para la determinación cuantitativa de la actividad arilesterasa (ArE).

Condiciones: Longitud de onda: 270nm, Temperatura: 25°C.

1.- Se hizo el blanco con el Reactivo C.

2.- Se midió 0.5 mL de Reactivo C, se adicionó 25 uL plasma (1:40) y se mezcló.

3.- Se monitorizó la reacción durante 3 minutos, con intervalos de tiempo de 15 segundos.

4.- Se calculó el promedio de absorbancia por minuto (Abs/min)

5.- Se determinó la actividad enzimática en KU/L, multiplicando Abs/min por le factor 656.989.

3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó el paquete estadístico SPSS (versión 11.0) para el procesamiento de los datos. Las frecuencias alélicas y genotípicas para los polimorfismos *PON1* 192Q/R y -108C/T fueron calculadas por el método denominado Gene-counting. Se utilizó la prueba del Chi-cuadrado (χ^2) para estimar si las frecuencias genotípicas estuvieron desviadas del equilibrio de Hardy-Weinberg y para evaluar la significancia del desequilibrio del ligamiento entre cada par de polimorfismos combinados (haplotipo). Las actividades enzimáticas, cociente de dividir PON1cs/ArE y la edad fueron analizadas visualmente mediante la inspección de sus histogramas de frecuencias de distribución, y se evaluó si tenían una distribución normal usando la prueba de kolmogorov-Smirnov. Las diferencias de medias entre grupos fueron analizadas mediante análisis de variancia (one way ANOVA), *t*-Student y *U*-Mann Whitney (prueba no-paramétrica).

IV. RESULTADOS

La identificación de los polimorfismos *PON1* 192Q/R y –108C/T se muestran en la Figura 1.

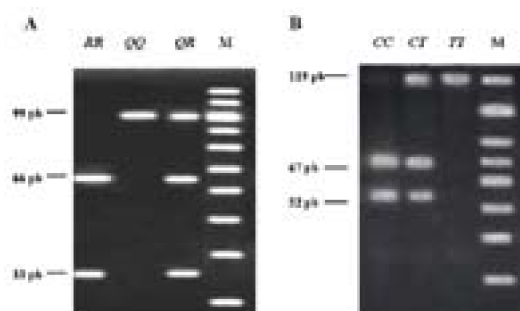


Figura 1. Polimorfismo *PON1* 192Q/R y –108C/T detectados en gel de agarosa 3:1TM HRB al 3.5%. A.

El polimorfismo *PON1* 192R genera un sitio de corte para la enzima *Alw* I, mientras que el polimorfismo *PON1* 192Q no genera ninguno, observándose en los homocigotos RR dos fragmentos de 66 pb y 33 pb, en los homocigotos QQ sólo un fragmento de 99 pb y en el caso de los heterocigotos QR tres fragmentos de 99 pb, 66 pb y 33 pb. B. El polimorfismo *PON1* –108C genera un sitio de corte para la enzima *Bst*U I, mientras que el polimorfismo *PON1* –108T no genera ninguno, observándose en los homocigotos CC dos fragmentos de 52 pb y 67 pb, en los homocigotos TT sólo un fragmento de de 119 pb y en el caso de los heterocigotos CT tres fragmentos de 52 pb, 67 pb y 119 pb. M, Ladder 10

pb.

Posición y Genotipos	n	Frecuencia Genotípica	Alélos	Frecuencia Alélica	χ^2 H.W. (p)
192					
QQ	21	0.236	Q	0.539	4.379
QR	54	0.607	R	0.461	(0.114)
RR	14	0.157			
-108			C	0.613	5.717
CC	28	0.315	T	0.388	(0.057)
CT	53	0.596			
TT	8	0.09			

Tabla 1. Frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos PON1 192Q/R y -108C/T. H.W. = Hardy-Weinberg, χ^2 = Chi-cuadrado, p: significancia.

En la Tabla 1 se puede observar que las frecuencias genotípicas para los polimorfismos PON1 192Q/R y -108C/T estuvieron en equilibrio de Hardy-Wienberg (192: $p = 0.114$ y -108: $p = 0.057$).

En la Tabla 2 se muestra las frecuencias de los genotipos y haplotipos resultantes de la combinación de los polimorfismos Q/R y C/T. Además, se observa que el polimorfismo PON1 192Q/R no estuvo en desequilibrio del ligamiento con el polimorfismo PON1 -108C/T ($p = 0.731$). Cuando las frecuencias genotípicas de los polimorfismos PON1 192Q/R y -108C/T fueron agrupados según sexo (Tabla 3 y 4, respectivamente), no se observó diferencia significativa entre las frecuencias genotípicas en ambos sexos (192: $p = 0.726$ y -108: $p = 0.722$).

Genotipos	n	Frecuencia Genotípica	Haplotipos	Frecuencia Haplotípica	χ^2 D.L. (p)
QQCC	3	0.034			
QQCT	12	0.135			
QQTT	5	0.056	QC	0.265	
QRCC	18	0.202	QT	0.21	1.293
QRCT	34	0.382	RC	0.28	(0.731)
QRTT	3	0.034	RT	0.135	
RRCC	7	0.079			
RRCT	7	0.079			
RRTT	0	0.000			

Tabla 2. Frecuencias genotípicas y haplotípicas resultantes de la combinación de los polimorfismos PON1 192Q/R y -108C/T. D.L. = Desequilibrio del Ligamiento, χ^2 = Chi-cuadrado, p: significancia.

Tabla 3. Relación entre la variable sexo y los genotipos del polimorfismo PON1 192Q/R. χ^2 = Chi-cuadrado, p: significancia.

Sexo	Frecuencia Genotípica		
	QQ	QR	RR
Masculino (n = 42)	9	26	7
Femenino (n = 47)	12	28	7
Total	21	54	14
$\chi^2 = 0.64$			$p = 0.726$

Tabla 4. Relación entre la variable sexo y los genotipos del polimorfismo *PON1 -108 C/T*. χ^2 = Chi-cuadrado, p : significancia.

Sexo	Frecuencia Genotípica		
	CC	CT	TT
Masculino (n = 42)	14	24	4
Femenino (n = 47)	14	29	4
Total	28	53	8
$\chi^2 = 0.65$			$p = 0.722$

El perfil de distribución de las enzimas estudiadas y la edad es mostrado en la Tabla 5. La actividad PON1, PON1cs y ArE estuvieron normalmente distribuidas, pero el cociente PON1cs/ArE tuvo una distribución trimodal (Figura 2B), identificándose por inspección visual la existencia de 3 grupos (de alta, intermedia y baja actividad). La edad tampoco tuvo una distribución normal.

Tabla 5. Actividades enzimáticas en la población participante. ^a Prueba de Kolmogorov-Smirnov. p = significancia.

Enzima	Media \pm S.D.	Rango	kurtosis	Skewness	Normal ^a
PON1 (U/L)	167.01 \pm 60.84	1.53-344.35	0.359	0.004	$p = 0.2$
PON1cs (U/L)	482.21 \pm 258.15	58.56-1242.61	0.077	0.379	$p = 0.2$
ArE (KU/L)	64.08 \pm 20.97	20.65-113.08	-0.449	0.043	$p = 0.2$
PON1cs/ArE	7.50 \pm 3.36	1.70-14.85	-0.570	0.017	$p = 0.049$
Edad	21.85 \pm 2.1	18-31	4.212	1.415	$p = 0.000$

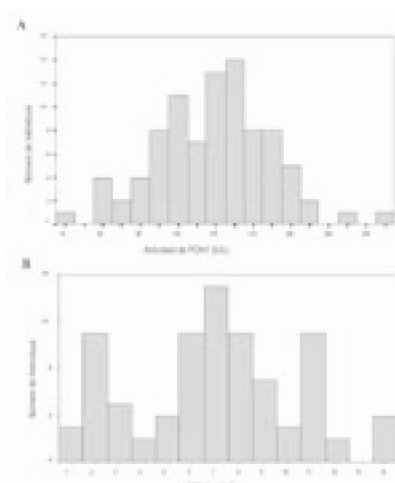


Figura 2. Histogramas de las frecuencias de distribución para la actividad de PON1 (A) y el cociente de la actividad de PON1 con estimulación salina (PON1cs) dividido por la actividad Arilesterasa (ArE) (B)

Cuando las medias de las actividades PON1, PON1cs, ArE y el cociente PON1cs/ArE fueron estratificados según sexo (tabla 6), no se observó diferencia significativa de medias en ambos sexos (PON1: $p = 0.548$, PON1cs: $p = 0.782$, ArE: $p = 0.789$ y PON1cs/ArE: $p = 0.770$).

Tabla 6. Actividades enzimáticas estratificadas por sexo. ^a *t*-test. *Mediana. ^b Mann Whitney *U*-test. $p =$ significancia.

Enzima	Masculino (n = 42)	Femenino (n = 47)	p
PON1 (U/L)	171.14 ± 63.05	163.31 ± 59.22	0.548 ^a
PON1cs (U/L)	490.28 ± 263.66	474.99 ± 255.77	0.782 ^a
ArE (KU/L)	63.44 ± 21.59	64.64 ± 20.60	0.789 ^a
*PON1cs/ArE	7.65	7.61	0.770 ^b

Los fenotipos de PON1 se determinaron de acuerdo al método descrito por Eckerson et al. (76), tomando arbitrariamente los siguientes puntos antimodales: Para el fenotipo AA de 1.70 a 4.50, AB de 4.60 a 11.00 y BB de 11.10 a 14.90. En la Tabla 7 se muestra las frecuencias fenotípicas y alélicas de PON1.

Tabla 7. Frecuencias fenotípicas y alélicas de las isoformas A y B de PON1. H.W. = Hardy-Weinberg, $\chi^2 =$ Chi-cuadrado, $p =$ significancia.

Fenotipos	n	Frecuencia Fenotípica	χ^2 H.W. (p)	Alelos	Frecuencia Alélica
AA	21	0.236	1.920 (0.383)	A	0.52
AB	51	0.573			
BB	17	0.191		B	0.48

Las frecuencias fenotípicas de PON1 estuvieron en equilibrio de Hardy-Wienberg ($p = 0.388$) y son muy similares a las encontradas molecularmente.

En la Tabla 8 se muestra la correlación de fenotipos de PON1 y los genotipos. Se puede apreciar que en sólo 7 muestras no coincidieron los fenotipos con los genotipos (AA=QQ, AB= QR y BB=RR), correspondiendo al 7.86 % del total de muestras.

Tabla 8. Correlación de fenotipos de PON1 y genotipos.

Perfil de distribución de los genotipos y fenotipos de Paraoxonasa-1 (PON1) en 89 estudiantes de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos

N°	PON1cs (U/L)	ArE (KU/L)	PON1cs/ArE	Fenotipo	Genotipos
1	557.11	68.39	8.15	AB	QR
2	97.00	42.26	2.3	AA	QQ
3	956.27	81.31	11.76	BB	RR
4	143.72	68.58	2.1	AA	QQ
5	765.02	64.12	11.93	BB	RR
6	922.42	82.62	11.16	BB	RR
7	616.20	90.54	6.81	AB	QR
8	766.63	66.69	11.5	BB	RR
9	560.87	65.21	8.6	AB	QR
10	367.47	53.35	6.89	AB	QR
11	495.33	60.88	8.14	AB	QR
12	328.78	49.44	6.65	AB	QR
13	360.48	24.27	14.85	BB	QR
14	340.60	47.07	7.24	AB	QR
15	566.78	74.03	7.66	AB	QR
16	514.67	62.52	8.23	AB	QR
17	624.26	82.36	7.58	AB	QR
18	493.18	64.15	7.69	AB	QR
19	626.95	79.06	7.93	AB	QR
20	563.55	82.08	6.87	AB	QR
21	706.46	49.92	14.15	BB	QR
22	594.18	53.25	11.16	BB	QR
23	297.09	71.86	4.13	AA	QQ
24	857.42	60.66	14.13	BB	RR
25	438.23	98.81	4.43	AA	QQ
26	848.29	75.98	11.16	BB	RR
27	553.88	68.1	8.13	AB	QR
28	103.15	27.06	3.81	AA	QQ
29	547.97	82.01	6.68	AB	QR
30	572.69	49.79	11.5	BB	RR
31	112.28	39.72	2.83	AA	QQ
32	521.65	68.58	7.61	AB	QR
33	297.09	50.14	5.92	AB	QR
34	407.76	42.99	9.48	AB	RR
35	58.56	22.89	2.56	AA	QQ
36	537.23	58.96	9.11	AB	QR
37	828.95	72.04	11.51	BB	RR
38	356.72	49.34	7.23	AB	QR
39	651.66	52.52	12.41	BB	QR
40	538.84	51.3	10.5	AB	QR
41	207.37	22.12	9.37	AB	QR
42	326.10	42.74	7.63	AB	QR

N°	PON1cs (U/L)	ArE (KU/L)	PON1cs/ArE	Fenotipo	Genotipos
43	135.38	46.55	2.91	AA	QQ
44	687.12	89.03	7.72	AB	QR
45	370.69	31.42	11.8	BB	RR
46	406.68	50.85	8	AB	QR
47	376.06	42.99	8.75	AB	QR
48	704.31	81.75	8.62	AB	QR
49	74.14	34.69	2.14	AA	QQ
50	501.24	66.46	7.54	AB	QR
51	358.33	48.93	7.32	AB	QR
52	468.52	87.59	5.35	AB	QR
53	125.71	73.9	1.7	AA	QQ
54	479.35	51.65	9.28	AB	QR
55	77.90	45.82	1.7	AA	QQ
56	773.61	66.37	11.66	BB	RR
57	118.36	20.65	5.73	AB	QR
58	271.30	40.69	6.67	AB	QR
59	79.51	38.51	2.06	AA	QQ
60	713.98	88.04	8.11	AB	QR
61	1010.53	113.08	8.94	AB	QR
62	492.64	54.41	9.05	AB	QR
63	635.54	97.34	6.53	AB	QR
64	546.90	74.61	7.33	AB	QR
65	388.95	98.56	3.95	AA	QQ
66	718.28	57.16	12.57	BB	QR
67	610.83	78.71	7.76	AB	QR
68	113.36	60.88	1.86	AA	QQ
69	586.14	62.89	9.32	AB	QR
70	698.36	79.36	8.8	AB	QR
71	598.47	83.87	7.14	AB	QR
72	391.64	68.35	5.73	AB	QR
73	408.66	104.56	3.91	AA	QQ
74	566.78	57.49	9.86	AB	QR
75	574.30	39.11	14.68	BB	RR
76	163.86	62.58	2.62	AA	QQ
77	368.54	54.66	6.74	AB	QR
78	550.12	83.84	6.56	AB	QR
79	470.08	68.67	6.84	AB	QR
80	167.08	80.31	2.08	AA	QQ
81	167.93	52.07	3.23	AA	QQ
82	523.80	72.17	7.26	AB	QR
83	71.99	30.68	2.35	AA	QQ
84	269.69	67.84	3.98	AA	QQ

Perfil de distribución de los genotipos y fenotipos de Paraoxonasa-1 (PON1) en 89 estudiantes de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos

N°	PON1cs (U/L)	ArE (KU/L)	PON1cs/ArE	Fenotipo	Genotipos
85	1062.10	97.31	10.92	AB	RR
86	1072.85	97.63	10.99	AB	RR
87	184.27	90.35	2.04	AA	QQ
88	1242.61	108.21	11.48	BB	QR
89	507.15	80.57	6.29	AB	QR

Para observar el efecto individual o combinado de los polimorfismo 192Q/R y -108C/T de PON1 sobre la concentración enzimática, se agrupó las medias de la actividad ArE según los genotipos de cada polimorfismo en forma individual y combinados. Se observó diferencia significativa entre las medias de los genotipos del polimorfismo PON1 -108C/T ($p = 0.08$), mientras que para los genotipos del polimorfismo PON1 192 Q/R y de la combinación 192Q/R y -108C/T no se observó diferencia significativa (192: $p = 0.579$ y 192/-108: $p = 0.105$).

Polimorfismo y Genotipo	n	Actividad ArE (Media ± S.D.) (KU/L)	p ^a
192			
QQ	21	59.81 ± 24.89	0.379
QP	54	64.97 ± 19.47	
RR	14	66.29 ± 20.32	
-108			
CC	28	79.21 ± 22.99	0.008
CT	53	63.50 ± 17.34	
TT	8	45.08 ± 26.79	
192/-108			0.105
QQCC	3	66.27 ± 22.79	0.105
QQCT	12	63.54 ± 21.48	
QQTT	3	59.93 ± 19.39	
QRCC	18	69.33 ± 24.11	
QRCT	34	62.99 ± 17.93	
QRTT	3	55.67 ± 47.43	
RRCC	1	66.49 ± 14.72	
RRCT	1	67.91 ± 26.04	

Tabla 9. Actividad arilesterasa, por cada genotipo de PON1192, -108 y 192/-108. a one way ANOVA, $p =$ significancia.

V. DISCUSIÓN

Diversos estudios describen una gran variación en la distribución mundial de las frecuencias alélicas del polimorfismo *PON1 192Q/R*. como puede observarse en la Tabla 9.

**Tabla 9. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo *PON1 192Q/R* en varias poblaciones del mundo.
*Presente estudio.**

Perfil de distribución de los genotipos y fenotipos de Paraoxonasa-1 (PON1) en 89 estudiantes de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Continente	Población	n	Frecuencias genotípicas de <i>PON1</i>			Frecuencias alélicas de <i>PON1</i>	
			QQ	QR	RR	Q	R
AFRICA	Etíopios (77)	169	0.367	0.450	0.183	0.592	0.408
	Beninianos (77)	98	0.184	0.408	0.408	0.388	0.612
ASIA	Japoneses (51)	431	0.137	0.422	0.441	0.348	0.652
	Chinos (58)	218	0.138	0.440	0.422	0.358	0.642
	Indios (49)	190	0.479	0.400	0.121	0.679	0.321
EUROPA	Alemanes (78)	2784	0.510	0.415	0.075	0.718	0.282
	Holandeses (52)	614	0.477	0.438	0.085	0.704	0.296
	Finlandeses (53)	169	0.515	0.444	0.041	0.737	0.263
	Italianos (Región Norte) (77)	179	0.497	0.380	0.123	0.687	0.313
	Italianos (Sardinia) (77)	161	0.571	0.360	0.068	0.752	0.248
	Españoles (Granada) (79)	195	0.496	0.416	0.088	0.704	0.296
	Turcos (80)	381	0.491	0.401	0.108	0.692	0.308
AMERICA	Euro Brasileños (81)	101	0.485	0.416	0.099	0.693	0.307
	Afro Brasileños (81)	70	0.214	0.514	0.272	0.471	0.529
	Indios Cayapa (Ecuador) (77)	83	0.060	0.301	0.639	0.211	0.789
	Estados Unidos (Norte) (10)	376	0.519	0.420	0.061	0.728	0.272
	Peruanos (Lima)	89	0.236	0.607	0.157	0.539	0.461

En la población estudiada la frecuencia alélica de *PON1*192Q* fue mayor que la de *PON1*192R* (Tabla 1). Es difícil afirmar con exactitud el mecanismo como se generó esta distribución, pero es probable que sea el resultado de la contribución del pool de genes de diversos grupos étnicos compuestos principalmente por elementos presentes en españoles (alelo *PON1*192Q*), trazas provenientes de los antepasados indígenas de la población peruana actual (alelo desconocido) y además de una menor pero significativa contribución africana (alelo *PON1*192R*) y oriental (alelo *PON1*192R*). Es probable que el alelo ancestral indígena predominante que contribuyó al perfil genético de la población peruana actual pudo haber sido *PON1*192R*. Es muy aceptada la teoría que los antepasados indígenas tuvieron el mismo ancestro que los orientales de la actualidad. Debido a su mismo origen, sería de esperar que nuestros antepasados indígenas también hayan tenido elevadas frecuencias del alelo *PON1*192R*. Estudios realizados recientemente en indígenas Oji-Cree de Canadá y Cayapa de Ecuador apoyan esta hipótesis, revelando que estos dos grupos nativos de América comparten el mismo origen ancestral que japoneses y chinos, al encontrarse en ellos elevadas frecuencias del alelo *PON1*192R* (77,86).

En la población estudiada también se puede observar un predominio de los heterocigotos (*QR*) sobre los homocigotos (*QQ* y *RR*) registrando la frecuencia más alta de heterocigotos que las descritas previamente (Tabla 2). No hay reportes que asocien la presencia de heterocigotos del polimorfismo *PON1 192Q/R* con algún factor que les proporcione una ventaja sobre los homocigotos, sugiriendo que el predominio de heterocigotos *QR* en la población estudiada sería el resultado, del mestizaje y/o producido al azar.

Tabla 10. Frecuencias alélicas del polimorfismo *-108 C/T* de *PON1*. *Presente estudio.

Población	n	Frecuencias alélicas de <i>PON1 -108 C/T</i>	
		C	T
Canadienses (85)	865	0.48	0.52
Estadounidenses (10)	376	0.50	0.50
Espanoles (86)	102	0.38	0.62
Peruanos (Lima)*	89	0.61	0.39

Respecto al polimorfismo *PON1 -108C/T* muy pocos estudios han sido realizados. En la Tabla 10 puede observarse la distribución de alelos de algunas poblaciones. En la población estudiada predomina el alelo *PON1 -108C* con una frecuencia de 0.61, mientras el alelo *PON1 -108T* alcanzó una frecuencia de 0.39.

Algunos estudios han reportado la existencia de desequilibrio del ligamiento entre los polimorfismos *PON1 192* y *-108* (10), sin embargo en la población estudiada no se observó este fenómeno (Tabla 2). Una característica común de las poblaciones donde se reportaron desequilibrio del ligamiento entre *PON1 192* y *-108* es su escasa variabilidad étnica, mientras que la población estudiada se caracterizó por su gran variabilidad étnica. Esto podría explicar el resultado observado, debido a que es más probable que se conserve una característica en una población proveniente de una sola etnia, que la proveniente de diversas etnias.

Previos estudios han reportado una distribución bimodal y polimodal para la actividad de *PON1* (79,83). Contrario a estos resultados, la actividad de *PON1* en la población estudiada tuvo una distribución unimodal (Figura 1A). Esto se debe a la alta frecuencia de individuos con actividad intermedia presente en la población estudiada. El cociente *PON1cs/ArE* tuvo una distribución trimodal (Figura 2B) como se esperaba (76), indicando la existencia de 2 grupos, de alta (rango de 11.10-14.90) y baja actividad (rango de 1.70-4.50), pero con evidencia de un tercer grupo con actividad intermedia (rango de 4.60-11.00). Contrario a otros estudios (79,86), los parámetros enzimáticos determinados en la población estudiada no estuvo influida por el sexo (Tabla 6).

La distribución de los genotipos de los polimorfismos *PON1 192* y *-108* tampoco estuvo influido por el sexo (Tabla 3 y 4).

El polimorfismo *PON1 192Q/R* provoca un cambio de aminoácido de Glutamina (Q) por Arginina (R) en la posición 192, generando dos isoenzimas A y B, respectivamente. Partiendo de esta premisa, los genotipos *QQ*, *QR* y *RR* deben coincidir con los fenotipos

AA, AB y BB, respectivamente. Sólo en 7.86% de las muestras no coincidieron los genotipos con los fenotipos de PON1, lo cual es una cifra baja y esta dentro del rango reportado por previos estudios (5-10%). Esto sugiere que alternativamente se podrían inferir los genotipos determinando los fenotipos bioquímicamente.

Brophy et al. (10) asociaron los genotipos de *PON1* 192 y -108 con la variabilidad en los niveles de la actividad ArE, reportando que el polimorfismo *PON1* -108 tuvo mayor influencia sobre los niveles de la actividad ArE que *PON1* 192. En la población estudiada sólo el polimorfismo *PON1* -108 mostró influir en los niveles de la actividad ArE ($p = 0.008$). Una explicación para esta diferencia en los resultados es que los polimorfismos *PON1* 192 y -108 en la población que estudio Brophy et al. estuvieron en desequilibrio del ligamiento, mientras que en la población estudiada no, sugiriendo que el polimorfismo *PON1* -108 sería el principal modulador en los niveles de expresión del gen *PON1*, concordando con lo reportado por otros estudios (10,88).

Cuando se comparó las medias de la actividad ArE de los genotipos combinados de *PON1* 192 y -108 no se observó diferencia significativa. Esto apoyaría aun más la afirmación que el polimorfismo *PON1* 192 no influye en la variación de los niveles de la actividad ArE (39).

En la actualidad, el hombre esta expuesto con mayor frecuencia a sustancias tóxicas como los OPs, por exposiciones ocupacionales (fumigadores, agricultores, ganaderos, trabajadores de fábricas de plaguicidas y comerciantes) y no-ocupacionales (intento de suicidio, uso doméstico, habitar en lugares próximos a zonas agrícolas, consumo de alimentos con residuos de OPs y en guerras químicas). Conocer el perfil genotípico y fenotípico individual en diversas poblaciones puede ser útil para estimar la susceptibilidad que cada individuo tiene a la toxicidad por organofosforafos, el riesgo individual hacia enfermedades cardiovasculares, fracaso terapéutico y/o efectos indeseados por ciertos fármacos.

CONCLUSIONES

1. La población estudiada tiene frecuencias elevadas de heterocigotos para los polimorfismos *PON1* 192Q/R y -108C/T (0.607 y 0.596, respectivamente), además predominan los alelos *PON1* 192*Q y *PON1* -108*C.
2. En la población estudiada predomina el fenotipo de actividad intermedia de *PON1* (AB), lo cual concuerda con lo hallado mediante el análisis de ADN.
3. Como la población estudiada es una muestra representativa de la población Limeña (para fines de genética poblacional) y además estuvo en equilibrio de Hardy-Weinberg para los polimorfismos *PON1* 192Q/R y -108C/T, se puede inferir que los resultados obtenidos de la población estudiada reflejan el perfil de distribución de genotipos y fenotipos de *PON1* de la población Limeña.
4. La actividad *PON1* y ArE tuvieron distribución unimodal con medias de 167.01 \pm 60.84 U/L y 64.08 \pm 20.97 KU/L, respectivamente. Además, existe una gran variación en la actividad de *PON1* (Rango: 1.53-344.35 U/L) y ArE (Rango: 20.65-113.08 KU/L) de un individuo a otro. Debido a esto, al tamaño pequeño de la muestra y a que la población estudiada sólo comprende sujetos entre 18 a 31 años, no se puede inferir de la población estudiada la media de la actividad *PON1* y ArE de la población Limeña.
5. El polimorfismo *PON1* -108C/T influye en la variación de la expresión de *PON1*.

BIBLIOGRAFÍA

- Gan KN, Smolen A, Eckerson HW and La Du BN. Purification of human serum paraoxonase/arylesterase. *Drug Metab Dispos* 1991;19:100-116.
- Hasset C, Richter RJ, Humbert R, Chapline C, Crabb JW, Omiecinski CJ, et al. Characterization of cDNA clones encoding rabbit and human serum paraoxonase: the mature proteins retains its signal sequence. *Biochemistry* 1991;30:10141-10149.
- Sorenson RC, Primo-Parmo SL, Kuo CL, Adkins S, Lockridge O and La Du BN. Reconsideration of the catalytic center and mechanism of mammalian paraoxonase/arylesterase. *Proc Natl Acad Sci* 1995b;92:7187-7191.
- Deakin S, Leviev I, Gomaraschi M, Calabresi L, Franceschini G, James RW. Enzymatically active paraoxonase-1 is located as the external membrane of producing cells and released by a high-affinity, saturable, desorption mechanism. *J Biol Chem* 2002;277(6):4301-8.
- Sorenson RC, Bisgaier CL, Aviram M, Hsu C, Billecke S, La Du BN. Human Serum paraoxonase/arylesterase's retained hydrophobic N-terminal leader sequence associates with HDLs by binding phospholipids: apolipoprotein A-1 stabilizes activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:2214-25.
- Humbert R, Adler DA, Disteche CM, Hasset C, Omiecinski CJ, Furlong CE. The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism. *Nature Genet* 1993;3:73-76.
- Adkins S, Gan KN, Mody M, La Du BN. Molecular basis for the polymorphic forms of

- human serum paraoxonase/arylesterase:glutamine or arginine at position 191, for the respective A or B allozymes. *Am J Hum Genet* 1993;52:598–608.
- Leviev I, James RW. Promoter polymorphism of human serum paraoxonase gene and serum paraoxonase activities and concentrations. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:516-21.
- Suehiro T, Nakamura T, Inoue M. et al. Polymorphism upstream from the human paraoxonase (PON1) gene and its association with PON1 expression. *Atherosclerosis* 2000;150:295-98.
- Brophy VH, Hastings MD, Clendenning JB. et al. Polymorphism in the human paraoxonase (PON1) promoter. *Pharmacogenetics* 2001;11:77-84.
- Jamal JA. Neurological syndromes of organophosphorus compounds. *Adverse Drug React Toxicol Rev* 1997;16(3):133-70.
- Steenland K, Jenkins B, Ames RG. Chronic neurological sequelae to organophosphate poisoning. *Am J Public Health* 1994;84:731-6.
- Hsieh BH, Deng JF, Ger J, Tsai WJ. Acetylcholinesterase Inhibition and the Extrapyramidal Syndrome: A Review of the Neurotoxicity of Organophosphate. *Neurotoxicology* 2001;22:423-427.
- DeBleecker J, Van Den Neucker K, Colardyn F. Intermediate syndrome in organophosphorous poisoning: A prospective study. *Crit Care Med* 1993;21:1706-11.
- He F. Neurotoxic effects of insecticides-current and future research review. *Neurotoxicology* 2000;21:839-845.
- Jamal GA, Hansen S, Julu POO. Low level exposures to organophosphorus esters may cause neurotoxicity. *Toxicology* 2002;181-182:23-33.
- Ray DE, Richards PG. The potential for toxic effects of chronic low-dose exposure to organophosphates. *Toxicology Lett* 2001;120:343-351.
- Kushik J, Chandrabhan D. Sources of exposure to and public health implications of organophosphate pesticide. *Pan Am J Public Health* 2003;14(3).
- Sogorb MA, Vilanova E. Enzyme involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. *Toxicol Lett* 2002;128:215-228.
- Main AR. The role of A-esterase in acute toxicity of paraoxon, TEPP and parathion. *Can J Biochem Physiol* 1956;34:197-216.
- Machin AF, Anderson PH, Quick MP, Waddell DF, Skibniewska A, Howells LC. The metabolism of diazinon in the liver and blood of species of varying susceptibility to diazinon poisoning. *Xenobiotica* 1976;6:104.
- Brealey CB, Walker CH, Baldwin BC. A-esterase activities in relation to the differential toxicity of pirimiphos-metyl to birds and mammals. *Pestic Sci* 1980;11:546-54.
- Costa LG, McDonal BE, Murphy SD, Ritcher RJ, Motulsky AG, Furlong CE. Serum paraoxonase and its influence on paraoxon and chlorpirifos oxon toxicity in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1990;103:66-76.
- Li WF, Furlong CE, Costa LG. Paraoxonase protects against chlorpyriphos toxicity in mice. *Toxicol Lett* 1995;76:219-226.

- Shih DM, Gu L, Xia YR, Navab M, Li WF, Hama S, et al. Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphorus toxicity and atherosclerosis. *Nature* 1998;394:284-287.
- Davies HG, Richter RJ, Keifer M, Broomfield CA, Sowalla J, Furlong CE. The effect of the human serum paraoxonase polymorphism is reversed with diazoxon, soman and sarin. *Nat Genet* 1996;14:334-336.
- Brophy VH, Jarvik GP, Ritcher RJ, Rozek LS, Schellenberg GD, Furlong CE. Analysis of paraoxonase (PON1) L55M status requires both genotype and phenotype. *Pharmacogenetics* 2000;10: 453-460.
- Suzuki T, Morito H, Ono K, Mackawa K, Nagai R, Yazaki Y. Sarin poisoning in Tokyo subway. *Lancet* 1995;345:980-981.
- Nagao M, Takatori T, Matsuda Y, Nakajima M, Iwase H, Iwade K. Definitive evidence for the acute sarin poisoning diagnosis in the Tokyo subway. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997;144:198-203.
- Brophy VH, Jarvik GP, Furlong CE. PON1 polymorphisms. In: Costa LG, Furlong CE, eds. *Paraoxonase (PON1) in health and disease: Basic and clinical aspects*. Norwell, MA: Kluwer Academic Publishers, 2002:53-77.
- Yamasaki Y, Sakamoto K, Watada H, Kajimoto Y, Hori M. The Arg₁₉₂ isoform of paraoxonase with low sarin-hydrolyzing activity is dominant in the Japanese. *Hum Genet* 1997;101:67-68.
- Yamada Y, Takatori T, Nagao M, Iwase H, Kurada N, Yanagida J, Shinozuka T. Expression of paraoxonase isoform did not confer protection from acute sarin poisoning in the Tokyo subway terrorist attack. *Int J Leg Med* 2001;115:82-84.
- Hernandez AF, Gomez AM, Pena G, Gil F, Rodrigo L, Villanueva E, Pla A. Effect of long-term exposure to pesticides on plasma esterases from plastic greenhouse workers. *Journal of toxicology and environmental health, Part A* 2004;67:1-14.
- Guyton A.C, Hall J.E. *Atherosclerosis en Tratado de Fisiología Médica*. 1998; pp.948-949. McGraw-Hill interamericana.
- Durrington PN, Mackness B, Mackness MI. Paraoxonase and Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:473-480.
- Senti M, Tomas M, Elosua R. and Marrugat J. Interrelationship of serum paraoxonase genetic variants on atherosclerosis risk. *Contributions to Science* 2000;1(3):323-329.
- Mackness B, Mackness MI, Arrol S, Turkie W, Durrington PN. Effect of the human serum paraoxonase 55 and 192 genetic polymorphisms on the protection by high density lipoprotein against low density lipoprotein oxidative modification. *FEBS Lett* 1998b;423:57-60
- Tward A, Xia YR, Wang XP, Shi YS, Park C, Castellani LW, et al. Decreased Atherosclerotic Lesion Formation in Human Serum Paraoxonase Transgenic Mice. *Circulation* 2002;106:484.
- Costa LG, Cole TB, Jarvik GP and Furlong CE. Functional Genomics of the paraoxonase (PON1) polymorphisms: effects on pesticide sensitivity, cardiovascular disease, and drug metabolism. *Annu Rev Med* 2003;54:371-92.
- Gnasso A, Motti C, Irace C, Di Gennaro I, Pujia A, Leto E, et al. The Arg allele in

- position 192 of PON1 is associated with carotid atherosclerosis in subjects with elevated HDLs. *Atherosclerosis* 2002;164(2):289.
- Heinecke J.W and Lusis A.J. Paraoxonase-gene polymorphism Associated with coronary Heart Disease: Support for the oxidative damage Hypothesis? *Am J Hum Genet* 1998;62:20-24.
- Hong S.H, Song J, Min W.K, Kim J K. Genetic variations of the paraoxonase gene in patients with coronary artery disease. *Clin Biochem* 2001;34:475-481.
- Aviram M, Hardak E, Vaya J, Mahmood S, Milo S, Hoffman A, et al. Human serum paraoxonases (PON1) Q y R selectively decrease lipid peroxides in human coronary and carotid atherosclerosis lesions: Pon1 esterase and peroxidase-like activities. *Circulation* 2000;101:2510-2517.
- Ruiz J, Blanche H, James RW, Garin MC, Vaisse C, Charpentier G, et al. Gln-Arg 192 polymorphism of paraoxonase and coronary artery disease in type 2 diabetes. *Lancet* 1995;346:869-72.
- Serrato M, Marian AJ. A variant of human paraoxonase/arylesterase (HUMAPONA) gene is a risk factor for coronary artery disease. *J Clin Invest* 1995;96:3005-8.
- Pfohl M, Koch M, Enderle MD, et al. Paraoxonase 192 Arg/Gln gene polymorphism, coronary artery disease, and myocardial infarction in type 2 diabetes. *Diabetes* 1999;48:623-27.
- Zama T, Murata M, Matsubara Y, Kawano K, Aoki N, Yoshino H, et al. A 192 Arg variant of the human paraoxonase (HUMAPONA) gene polymorphism is associated with an increased risk for coronary artery disease in the japanese. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:3565-69.
- Sanghera DK, Saha N, Aston CE, Kamboh MI. Genetic polymorphism of paraoxonase and the risk of coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:1067-73.
- Sanghera DK, Aston CE, Saha N, Kamboh MI. DNA polymorphisms in two paraoxonase genes (PON1 and PON2) are associated with the risk of coronary heart disease. *Am J Hum Get* 1998;62:36-44.
- Pati N, Pati U. Paraoxonase gene polymorphism and coronary artery disease in indian subjects. *In J Cardiol* 1998;66:165-68.
- Imai Y, Morita H, Kurihara H, Sugiyama T, Kato N, Ebihara A, et al. Evidence for association between paraoxonase gene polymorphism and atherosclerotic diseases. *Atherosclerosis* 2000;149:435-442.
- Heijmans BT, Westendorp RG, Lagaay AM, Knook DL, Klufft C, Slagboom PE. Common paraoxonase gene variants, mortality risk and fatal cardiovascular events in elderly subjects. *Atherosclerosis* 2000;149:91-97.
- Antikainen M, Murtomaki S, Syvanne M, Pahlman R, Tahvanainen E, Jauhiainen M, et al. The Gln-Arg 191 polymorphism of the human paraoxonase gene (HUMAPONA) is not associated with risk of coronary artery disease in Finns. *J Clin Invest* 1996;98:883-885.
- Rice GI, Ossei-Gerning N, Stickland MH, Grant PJ. The paraoxonase Gln-Arg192 polymorphism in subjects with ischaemic heart disease. *Coron Artery Dis*

1997;8:677-82.

- Herrmann SM, Blanc H, Poirier O, Arveiler D, Luc G, Evans A, et al. The Gln/Arg polymorphism of human paraoxonase (PON) is not elated to myocardial infarction in the ECTIM study. *Atherosclerosis* 1996;126:299-303.
- Suehiro T, Nakauchi Y, Yamamoto M, Arie K, Itoh H, Hamashige N, et al. Paraoxonase gene polymorphism in japanese subjects with coronary heart disease. *Int J Cardiol* 1996;57:69-73.
- Ombres D, Pannitteri G, Montali A, Candeloro A, Seccareccia F, Campagna F, et al. The Gln/Arg 192 Polymorphism of human paraoxonase gene is not associated with coronary artery disease in Italian patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:1611-18.
- Ko YK, Wang SM Hsu LA, et al. The Gln/Arg 191 polymorphism of the human paraoxonase gene is not associated with the risk of coronary artery disease among chinese in Taiwan. *Atherosclerosis* 1998;141:259-64.
- Cascorbi I, Laule M, Mrozikiewicz PM, Mrozikiewicz A, Andel C, Baumann G, et al. Mutations in the human paraoxonase 1 gene: frequencies, allelic linkages, and association with coronary artery disease. *Pharmacogenetics* 1999;9:755-61.
- Hasselwander O, Savage DA, McMaster D, Loughrey CM, McNamee PT, Middleton D, et al. Paraoxonase polymorphism are not associated with cardiovascular risk in renal transplanterecipients. *Kideny Int* 1999;56:289-98.
- Aubo C, Senti M, Marrugat J, Tomas M, Vila J, Sala J, et al. Risk of myocardial infraction associated with Gln/Arg polymorphism in the human paraoxonase gene and diabetes mellitus. The REGICOR investigators *Eur Heart* 2000;21:33-38.
- Garin MC, James RW, Dussoix P, Blanche H, Passa P, Froguel P, et al. Paraoxonase polymorphism Met-Leu 54 is associated with modified serum concentrations of the enzyme. A posible link between the paraoxonase gene and increased risk of cardiovascular disease in diabetes. *J Clin Invest* 1997;99:62-66.
- Sanghera D, Saha N, Kamboh, MI. The codon 55 polymorphism in the paraoxonase 1 gene is not associates with the risk of coronary Herat disease in Asian Indians And Chinese. *Atherosclerosis* 1998;136:217-23.
- Boright AP, Connelly PW, Brunt JH, Scherer SW, Tsui LC, Hegele RA. Genetic varaiation in paraoxonase-1 and paraoxonase-2 is associated with variation in plasma lipoproteins in Alberta Hutterities. *Atherosclerosis* 1998;139:131-36.
- Schmidt H, Schmidt R, Niederkorn K, Gradert A, Schumacher M, Watzinger N, et al. Paraoxonase polymorphism leu-met54 is associated with carotid atherosclerosis: results of the Austrian Stroke prevention study. *Stroke* 1998;29:2043-48.
- Mackness B, Davies GK, Turkie W, Lee E, Roberts DH, Hill E, et al. Paraoxonase status in coronary heart disease: Are activity and concentration more important than genotype?. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:1451-57.
- Ayub A, Mackness MI, Arrol S, Mackness B, Patel J, Durrington PN. Serum paraoxonase after myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19:330-35.
- Leviev I, Deakin S, James RW. Decreased stability of the M54 isoform of paraoxonase

- as a contributory factor to variations in human serum paraoxonase concentrations. *J Lipid Res* 2001;42(4):528-35.
- Jarvick Gp, Rosek LS, Brophy VH, Hatsukami TS, Ritcher RJ, Schellenberg GD, et al. Paraoxonase (PON1) phenotype is a better predictor of vascular disease than is PON1_{192Q} y PON1₅₅ genotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:2441-2447.
- James RW, Leviev I, Ruiz J, Passa P, Froguel P, Garin MC. Promoter polymorphism T(-107)C of the paraoxonase PON1 gene is a risk factor for coronary heart disease in type 2 diabetic patients. *Diabetes* 2000;49:1390-93.
- Billecke S, Draganov D, Counsell R, Stetson P, Watson C, Hsu C, et al. Human serum paraoxonase (PON1) isozymes Q and R hydrolyze lactona and cyclic carbonate esters. *Drug Meta Dispos* 2000;28:1335-1342.
- Biggadike K, Angell RM, Burgess CM, Farrell RM, Hancock AP, Harker AJ, et al. Selective plasma hydrolysis of glucocorticoid gamma-lactones and cyclic carbonates by the enzyme paraoxonase: an ideal plasma inactivation mechanism. *J Med Chem* 2000;43 (1):19-21.
- Tougou K, Nakamura A, Watanabe S, Okuyama Y, Morino A. Paraoxonase has a major role in the hydrolysis of prulifloxacin (NM441), a prodrug of a new antibacterial agent. *Drug Metab Dispos* 1998;26:355-359.
- Aviram M, Billecke S, Sorenson R, Bisgaier C, Newton R, Rosenblat M, et al. Paraoxonase active site required for protection against LDL oxidation involves its free sulfhydryl group and is different from that required for its arylesterase/paraoxonase activities: selective action of human paraoxonase aloenzymes Q and R. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:1617-24.
- Reiner E and Radic Z. Method for measuring human plasma paraoxonase activity. Course on analytical procedures for assessment of exposure to organophosphorus pesticides. In *Manual of analytical methods* 1985, pp:62-70. cremone, Italy.
- Eckerson HW, Wyte CM, La Du BN. The human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism. *Am J Hum Genet* 1983;35:1126-1138.
- Scacchi R, Corbo RM, Rickards O, De Stefano GF. New data on the world distribution of paraoxonase (PON1 Gln192#Arg) gene frequencies. *Human Biology* 2003;75:365-373.
- Gardemann A, Philipp M, Hess K, Katz N, Tillmanns H, Haberbosch W. The paraoxonase Leu-Met54 and Gln-Arg191 gene polymorphism and ethnic distribution differences of human serum paraoxonase. *Am J Phys Anthropol* 2000;62:235-241.
- Hernandez AF, Gonzalvo MC, Gil F, Rodrigo L, Villanueva E, Pla A. Distribution profiles of paraoxonase and cholinesterase phenotypes in a Spanish population. *Chem-Biolog Interact* 1999;119-120:201-209.
- Aynacioglu AS, Cascorbi I, Mrozikiewicz PM, Nacak M, Tapanyigit EE, Roots I. Paraoxonase 1 mutations in a Turkish population. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999;157:174-177.
- Allebrandt KV, Souza RL, Chautard-Freire-Maia. Variability of the paraoxonase gene (PON1) in Euro- and Afro-Brazilians. *Toxicol Appl Pharmacol* 2002;180:151-156.
- Hegele RA, Harris SB, Connelly PW, Hanley AJ, Tsui LC, Zinman B, et al. Genetic

-
- variation in paraoxonase-2 is associated with variation in plasma lipoproteins in Canadian Oji-Cree. *Clin Genet* 1998;54:394-399.
- Playfer JR, Eze LC, Bullen MF, Evans DA. Genetic polymorphism and interethnic variability of paraoxonase activity. *J Med Genet* 1976;13:337-342.
- Deakin S, Leviev I, Brulhart-Meynet M, James RW. Paraoxonase 1 promoter haplotypes and serum paraoxonase: a predominant role for polymorphic position -107, implicating the Sp1 transcription factor. *Biochem J* 2003;372:643-649.
- Hernández AF, Mackness B, Rodrigo L, López O, Pla A, Gil F, et al. Paraoxonase activity and genetic polymorphisms in greenhouse workers with long term pesticide exposure. *Human and experimental toxicology* 2003;00:1-10.
- Carrera V, Llopis I, Sastre J, Sogorb MA, Vilanova E. Distribution of serum paraoxon hydrolyzing activity in a large Spanish population using a routine automated method in clinical laboratory. *J Anal Toxicol* 2003;27(5):290-3.