

**UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**



**ESTUDIO DEL POLIMORFISMO GENÉTICO Y LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA
DE *PON1* EN GRUPOS RACIALES DE PANAMÁ**

ANA ELENA TEJADA ESPINOSA

**TESIS PRESENTADA COMO UNO DE LOS REQUISITOS PARA OPTAR AL
GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS CON ESPECIALIZACIÓN
EN BIOQUÍMICA**

**ASESORES:
Dr. TOMÁS DIEZ
Dr. CARLOS RAMOS**

PANAMÁ, REPÚBLICA DE PANAMÁ

2007

DEDICATORIA

A mi hija Ana Melissa para que siempre luche en la vida por sus sueños.

A mi esposo Heriberto.

A mi madre Marina, a la memoria de mi padre Guillermo Tejada.

A mis hermanos Carmen y Guillermo.

AGRADECIMIENTO

**A ti Señor Jesús por haberme regalado,
entre tantas cosas, la oportunidad de culminar este trabajo.**

**A mi hija Ana Melissa por todo el tiempo y el ánimo
que siempre me distes para dedicarlo a mis estudios**

**A mi madre Marina por todo su apoyo incondicional,
gracias porque siempre has estado conmigo.**

**A mis asesores: Dr. Tomás Diez y Dr. Carlos Ramos
por todo el tiempo y esfuerzo que dedicaron en mi formación.**

**Departamento de Bioquímica y Nutrición mi segunda casa: a todos mis compañeros de
trabajo.**

**Laboratorio de Investigaciones de Genética y Biología Molecular mi tercera casa: a todos
mis compañeros de tesis.**

**A mis amigos que durante estos años siempre me han dado ánimo: Melquiades Concepción
y Gloria Montenegro.**

**Laboratorio de Análisis de Investigación del Departamento de Ciencias de Laboratorio
Clínico: Dr. Nicanor Morales, Lic. Juan Carlos Navarro, Katherine Castillo, Jennifer
Obispo.**

**Departamento de Investigación en Genómica y Proteómica del Instituto Conmemorativo
Gorgas de Estudios de la Salud: Dr. Juan Pascale, Magister Dalys Mójica, Lic. Yamitzel
Zaldívar, Lic. Juan Castillo.**

Dr. Manuel Escala y la Lic. Argelis Acevedo por todo su apoyo en el análisis estadístico.

ÍNDICE

	Páginas
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	x
RESUMEN	xi
SUMMARY	xii
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 1	
GENERALIDADES DEL ESTUDIO	
1.1 Planteamiento del problema	4
1.2 Objetivos	6
1.3 Justificación	7
CAPÍTULO II	
FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA	
2.1. Características estructurales de la Paraoxonasa	9
2.2 Mecanismo de reacción de la Paraoxonasa	10
2.3 Polimorfismos de la Paraoxonasa	11
2.4 Mecanismo de anclaje de la <i>PON1</i> en las HDL	15

Páginas

2.5 Secreción de la <i>PONI</i> y asociación con las membranas de la célula	19
2.6 Actividades enzimáticas de la Paraoxonasa	20
2.7 Factores que regulan la actividad enzimática de la <i>PONI</i>	24
2.8 La Paraoxonasa y algunas patologías	25

CAPÍTULO III**MATERIALES Y MÉTODOS**

3.1 Tipo de estudio	35
3.2 Universo y muestra	35
3.3 Materiales, Equipo e Instrumentos	37
3.4 Métodos	37
3.5 Análisis Estadístico	43

CAPÍTULO IV**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

4.1 Resultados y discusión de los polimorfismos	45
4.2 Comparación de los resultados de este estudio con otros estudios.	53
4.3 Resultados de la combinación de los tres polimorfismos en los cuatro grupos estudiados	54
4.4 Análisis polimórfico mediante la determinación de dos actividades enzimáticas de <i>PONI</i> .	55
4.5 Actividades arilesterasa y diazoxonasa para determinar los genotipos de <i>PONI</i> 192.	60

CONCLUSIONES	63
RECOMENDACIONES	65
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
ANEXOS	69

ÍNDICE DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1 Estructura de <i>PON1</i>	9
Figura 2 Iones Calcio (Ca^{2+}) asociados a la <i>PON1</i>	10
Figura 3 Mecanismo de reacción propuesto de la <i>PON1</i>	11
Figura 4 Polimorfismos de la Paraoxonasa	12
Figura 5 Polimorfismos en la región promotora.	12
Figura 6 Polimorfismos de <i>PON1</i> en la región codificadora	13
Figura 7 Polimorfismos de <i>PON1</i> (192)	15
Figura 8 Representación de las hélices H1 y H2 en la <i>PON1</i>	16
Figura 9 Modelo de anclaje de la <i>PON1</i> a la superficie de las HDL	17
Figura 10 Estructura de la HDL	18
Figura 11 Reacción de hidrólisis del paraoxón	21
Figura 12 Reacción de hidrólisis del sarín	22
Figura 13 Reacción de hidrólisis del diazoxón	22
Figura 14 Reacción de hidrólisis del fenilacetato	23

	Páginas
Figura 15 Reacción de hidrólisis de tiolactona de homocisteína	23
Figura 16 Modelo propuesto por Ribas et al. Oxidación de la LDL por las células de la pared aórtica	29
Figura 17 Arteria normal y con aterosclerosis	30
Figura 18 Productos de digestión de <i>PONI</i> (192)	46
Figura 19 Productos de digestión de <i>PONI</i> (55)	48
Figura 20 Producto de digestión de <i>PONI</i> (-108)	50
Figura 21 Actividad arilesterasa según los tres polimorfismos estudiados	80
Figura 22 Actividad arilesterasa versus actividad diazoxonasa en 153 muestras de suero.	61
Figura 23 Número de individuos versus el intervalo de la relación arilesterasa/diazoxonasa.	62
Figura 24 Actividad diazoxonasa U/mL en los tres polimorfismos estudiados	80

ÍNDICE DE TABLAS

	Páginas
Tabla No. 1 CANTIDAD DE INDIVIDUOS SEGÚN EL POLIMORFISMO	51
Tabla No. 2 FRECUENCIA GENOTÍPICA EN POLIMORFISMOS DE <i>PON1</i>	52
Tabla No. 3 FRECUENCIA ALÉLICA EN POLIMORFISMOS DE <i>PON1</i>	52
Tabla No. 4 COMPARACIÓN DE LAS FRECUENCIAS DE LOS ALELOS DE <i>PON1</i> 192, -108 Y 55 OBTENIDAS EN DIFERENTES ESTUDIOS	74
Tabla No. 5 CANTIDAD DE INDIVIDUOS CON POLIMORFISMOS <i>PON1</i>	75
Tabla No. 6 ACTIVIDAD ARILESTERASA SEGÚN 3 POLIMORFISMOS <i>PON1</i>	57
Tabla No. 7 ACTIVIDAD DIAZOXONASA SEGÚN 3 POLIMORFISMOS <i>PON1</i>	58
Tabla No. 8 ACTIVIDAD ARILESTERASA U/mL EN LA POBLACIÓN BLANCA Y NEGRA SEGÚN LA COMBINACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS	59
Tabla No. 9 ACTIVIDAD DIAZOXONASA U/mL EN LA POBLACIÓN BLANCA Y NEGRA SEGÚN LA COMBINACIÓN DE LOS TRES POLIMORFISMOS	60
Tabla No. 10 ACTIVIDADES ARILESTERASA Y DIAZOXONASA EN 153 MUESTRAS DE SUERO	76
Tabla No. 11 ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS EN 153 MUESTRAS DE SUERO	79

ABREVIATURAS

PON1 Paraoxonasa 1

PON2 Paraoxonasa 2

PON3 Paraoxonasa 3

His: histidina

Ca: calcio

Asp: aspartato

Glu: glutamato

G: guanina

C: citosina

T: timina

Q: glutamina

R: arginina

L: leucina

M: metionina

HDL: lipoproteína de alta densidad

VLDL: lipoproteína de muy baja densidad

LDL: lipoproteína de baja densidad

HF: hipercolesterolemia familiar

HMG-CoA: hidroximetilglutaril coenzima A

SREBP-2: proteína de unión al elemento regulador de esteroides

CETP: proteína transferidora de ésteres de colesterol

LCAT: lecitina colesterol aciltransferasa

PLTP: proteína transferidora de fosfolípidos

PAF-AH: acetilhidrolasa de factor plaquetario

GPX3: glutatión peroxidasa

SR-B1: receptor de esteroides B-1

RESUMEN

La Paraoxonasa (*PONI*) humana es una enzima asociada a las HDL que puede reducir la oxidación de metabolitos presentes en las LDL y en las propias HDL, además de hidrolizar metabolitos altamente tóxicos de compuestos organofosforados. La actividad enzimática de *PONI* puede variar de un individuo a otro debido, posiblemente, a la presencia de polimorfismos en este gen. En este estudio se determinaron los polimorfismos en las posiciones 55 y 192 de la región codificadora, y en la posición -108 de la región promotora del gen *PONI*. Se determinaron, además, dos actividades enzimáticas -arilesterasa y diazoxonasa- de *PONI* en grupos de individuos sanos pertenecientes a la población panameña.

Las frecuencias genotípicas encontradas para la posición 192 fue: QQ = 0.42, QR = 0.47 y RR = 0.11; para la posición 55 fue: LL = 0.57, LM = 0.43 y MM = 0; y para la posición -108 fue: CC = 0.04, CT = 0.64 y TT = 0.32.

Las frecuencias alélicas encontradas fueron: Q = 0.65, L = 0.78 y T = 0.64. Al comparar estas frecuencias con las obtenidas en otros estudios encontramos que nuestra población de estudio presentó diferencias significativas en la región polimórfica *PONI* Q(192)R con respecto a las poblaciones: afroamericana, afrobrazileña, hispánica caribeña, costarricense, mexicana, indígenas Cayapa, francesa, japonesa, china, y la hindostana, pero fue similar a la chilena y peruana. Para la región polimórfica *PONI* C(-108)T encontramos diferencias significativas en relación con los resultados obtenidos en la población peruana, canadiense y afroamericana, pero similares a la mexicana. Para la región polimórfica *PONI* L(55)M hay diferencias con respecto a las poblaciones caucásica y la californiana de origen hispánico, pero similar a la mexicana.

En la población panameña la actividad arilesterasa promedio fue de 126.17 U/mL y la actividad diazoxonasa fue de 10.26 U/mL y no se presentan diferencias significativas al evaluarla según el genotipo de los tres polimorfismos estudiados. Las dos combinaciones de los tres polimorfismos presente en la mayor cantidad de individuos que participaron de este estudio fueron: QQ CT LM y la QR CT LM, donde prácticamente es mayor la combinación heterocigoto.

Debido a que estas regiones polimórficas han sido asociadas con la actividad y el nivel plasmático de *PONI*, lo cual a su vez se correlaciona con el riesgo de aterogénesis y la susceptibilidad a la intoxicación con compuestos organofosforados, la determinación del genotipo y fenotipo en individuos con predisposición genética a desarrollar eventos aterogénicos o que se dedican a labores agrícolas que involucran la utilización cotidiana de compuestos organofosforados podría ser de utilidad epidemiológica, por lo que recomendamos futuras investigaciones en estos dos grupos de la población panameña.

SUMMARY

Human paraoxonase is an enzyme associated to HDL particles that can reduce the oxidation of metabolites present in LDL and HDL, in addition to hydrolyze highly toxic metabolites of organophosphorus compounds. The enzymatic activity of *PON1* can vary from one individual to another, possibly due to the presence of polymorphisms in the *PON1* gene. This study identified polymorphisms at positions 55 and 192 in the coding region, and at position -108 in the promoter region of the *PON1* gene.

The genotype frequencies at position 192 were: QQ = 0.42, QR = 0.47, and RR = 0.11; frequencies at position 55 were: LL = 0.57, LM = 0.43 and MM = 0; and the frequencies at position -108 were: CC = 0.04, CT = 0.64 and TT = 0.32. The highest allele frequencies were: Q = 0.56 L = 0.78 and T = 0.64.

We found that the Panamanian population presents significant differences in the polymorphic region *PON1* Q (192) R with respect to the following populations: African-Americans, African-Brazilians, Caribbean-Hispanics, Costa Ricans, Mexicans, Cayapa Indians, French, Japanese, Chinese and Indians; however, it was similar to the Chilean and Peruvian populations.

Significant differences were found in the polymorphic region *PON1* C(-108)T when the genotype frequencies were compared to the Peruvian, Canadian and African-American populations, but there were no differences with the Mexican population.

The polymorphic region *PON1* L(55)M presented differences with regard to the Caucasian and Hispanic population of California, but similar to the Mexicans.

The two combinations of the three polymorphisms present in most individuals who participated in this study were QQ LM CT and CT QR LM. Arylesterase and diazoxonase activities of *PON1* were also determined in 85 healthy individuals: the mean value of arylesterase activity was 126.17 U/mL and the mean value of diazoxonase activity was 10.26 U/mL. These two activities of *PON1* were independent of the three studied polymorphisms.

Since these polymorphic regions have been associated with the activity and the plasmatic level of *PON1*, which in turn correlate with the risk of atherogenesis and susceptibility to poisoning with organophosphorus compounds, we recommend further epidemiological studies in individuals with a genetic predisposition to develop atherogenic events or who are engaged in agricultural work involving the use of organophosphorus compounds.

INTRODUCCIÓN

Las HDL (lipoproteína de alta densidad) forman parte de las principales familias de lipoproteínas presentes en el plasma. Las HDL son consideradas un factor protector frente a la aterosclerosis, mientras que el colesterol de las LDL (lipoproteínas de baja densidad) constituye un factor de riesgo. Entre los componentes proteicos de las HDL se encuentran apolipoproteínas, enzimas asociadas al metabolismo de las HDL como: LCAT (lecitina colesterol aciltransferasa), CETP (proteína transferidora de ésteres de colesterol), PLTP (proteína transferidora de fosfolípidos). Además, en las HDL encontramos enzimas con un papel menos claro o desconocido como: *PON1* (Paraoxonasa 1), *PON3* (Paraoxonasa 3), PAF-AH (acetilhidrolasa de factor plaquetario) y GPX3 (glutación seleno peroxidasa plasmática) (23).

El locus *PON* en humanos codifica un grupo de enzimas de una familia génica que en los mamíferos tiene al menos tres miembros codificados por los genes *PON1*, *PON2* y *PON3*. Esta familia de genes parece haberse formado por duplicación de un precursor común, ya que presentan: similitud en 70% de la secuencia de nucleótidos y 60% en los residuos de aminoácidos, además de localizarse en posiciones adyacentes en el cromosoma 7 (7q21.3) en humanos (22).

La *PON1* humana es una enzima que al estar asociada a las HDL puede reducir la oxidación de metabolitos presentes en las LDL (lipoproteínas de baja densidad) y en las HDL; además, hidroliza metabolitos altamente tóxicos de pesticidas, tales como el paraoxón que proviene del metabolismo hepático del paratión. Estas propiedades confieren

a la *PON1* la habilidad de proteger contra la enfermedad aterosclerótica y la intoxicación con pesticidas (1). La actividad enzimática de *PON1* puede variar de un individuo a otro debido a la presencia de ciertos polimorfismos, tanto en la región codificadora como en la región promotora (1). Resulta interesante saber cuáles son los polimorfismos que están presentes en la población panameña, su distribución y los valores de actividades enzimáticas para la *PON1*.

Esta investigación aporta valores de referencia de las actividades arilesterasa y diazoxonasa de la *PON1* en la población panameña. Además, determina tres polimorfismos de *PON1* en las posiciones 55, 192 y -108. Estos resultados son comparados con estudios realizados en otras poblaciones del mundo.

Para una mejor comprensión del trabajo en el capítulo 1 se presentan las generalidades del trabajo. El capítulo 2 se explica el fundamento teórico sobre la enzima Paraoxonasa con figuras ilustrativas sobre este tema. El capítulo 3 se detallan los métodos utilizados para el desarrollo del estudio. Las tablas de resultados y su discusión se consignan en el capítulo 4, seguidas de las conclusiones y recomendaciones. En los anexos hemos ubicado las gráficas y las tablas de resultados.

CAPITULO I

GENERALIDADES DE LA INVESTIGACIÓN

1.1 Planteamiento del Problema

La enfermedad cardiovascular de origen isquémico es considerada, actualmente, una de las patologías más importantes por su alta prevalencia y elevada morbi-mortalidad. La situación en los países en desarrollo ha mejorado drásticamente por la confluencia de varios factores, principalmente las campañas de prevención y los avances en los tratamientos (1). Sin embargo, el aumento en la esperanza de vida y la adquisición de hábitos de vida perniciosos, especialmente los asociados a hábitos dietéticos inadecuados y al tabaquismo, presagian que la situación no mejorará. De hecho, la OMS (Organización Mundial de la Salud) reconoce a la enfermedad cardiovascular isquémica como la principal preocupación sanitaria en los próximos años (1).

La enfermedad isquémica se origina a partir de un proceso inflamatorio y suele producirse precozmente, observándose en las arterias la denominada “estría grasa”. Es bien conocido que algunos factores de riesgo clásicos como la diabetes, la obesidad, el sedentarismo, el sexo masculino y las alteraciones en el perfil lipídico favorecen el desarrollo de la enfermedad. Especialmente importante es el aumento de las concentraciones plasmáticas de los lípidos séricos: colesterol, fundamentalmente el asociado a las LDL y la disminución de la concentración de colesterol asociado a las HDL (1).

Estudios recientes, en poblaciones europeas y americana, resaltan la importancia de una enzima denominada Paraoxonasa (*PON1*), cuya actividad representa un factor de

protección contra el riesgo de sufrir esta enfermedad. Resulta interesante que en nuestro país no hay estudios sobre las variaciones genéticas ni la actividad sérica de esta enzima.

Adicionalmente, hay que tomar en consideración la participación de esta enzima en los procesos de desintoxicación de metabolitos de pesticidas organofosforados. En los últimos años ha habido un incremento en la utilización de pesticidas en el área centroamericana y Panamá, lo que a su vez ha provocado el deterioro del medio ambiente y de la salud de los habitantes. Entre los principales factores responsables de este deterioro están el uso indebido de estos agroquímicos, deficientes condiciones de producción y almacenamiento de los mismos, un pobre entendimiento, si lo hay, de los efectos reales sobre la salud y el medio ambiente.

Seún el informe del Departamento de Vigilancia de Factores Protectores y de Riesgo a la Salud y Enfermedad de la Dirección General de Salud del Ministerio de Salud, durante los años 2001 y 2002 se importaron a Panamá un total de 11 230 934 kilogramos (promedio de 5 615 467 kg/año) de una amplia variedad de plaguicidas (25 en total), incluyendo los organofosforados (2). En Panamá no se tiene información acerca de la sensibilidad que tiene la población a los pesticidas organofosforados.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo General

- Estudiar el polimorfismo genético y la actividad de la enzima *PONI* en cuatro de los principales grupos raciales de la población panameña.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Determinar la actividad enzimática de la arilesterasa en los diferentes grupos raciales de la población panameña.
- Determinar el polimorfismo genético en las posiciones 55 y 192 de la región codificadora del gen de la *PONI* en los diferentes grupos raciales de la población panameña.
- Relacionar el polimorfismo genético de la región codificadora del gen con la actividades arilesterasa y diazoxonasa en los grupos de blancos y negros.
- Determinar el polimorfismo genético en la posición -108 de la región promotora del gen de la *PONI* en los diferentes grupos raciales de la población panameña.
- Relacionar el polimorfismo de la región promotora con la actividades arilesterasa y diazoxonasa en los grupos de blancos y negros.
- Comparar las frecuencias alélicas y genotípicas observadas y las actividades enzimáticas entre los grupos raciales.
- Comparar las frecuencias alélicas y genotípicas de la población panameña con las reportadas para otras poblaciones.
- Ensayar la posibilidad de determinar el polimorfismo genético mediante análisis bidimensional de las actividades arilesterasa y diazoxonasa de *PONI*.

1.3 Justificación

La *PONI* humana es una enzima que al estar asociada a las HDL tiene como funciones reducir la oxidación de metabolitos presentes en las LDL y en las HDL; además, hidrolizar metabolitos altamente tóxicos de pesticidas, tales como el paraoxón que proviene del metabolismo hepático del paratión y el sarín que es un gas nervioso. Estas funciones confieren a la *PONI* la habilidad de proteger contra la enfermedad aterosclerótica y la intoxicación con pesticidas (3).

La actividad enzimática de *PONI* puede variar de un individuo a otro debido a la presencia de ciertos polimorfismos, tanto en la región codificadora como en la región promotora (3). Resulta importante determinar cuales son los polimorfismos que están presentes en la población panameña, su distribución y los valores de actividades enzimáticas para la *PONI*.

En Panamá no se tiene información acerca de la variabilidad genética ni de los niveles de actividad sérica de la *PONI*, por lo que se desconoce cuan activa es esta enzima en la población. En el presente estudio, la población panameña altamente heterogénea, ha sido dividida en grupos con fenotipo mestizo, blanco, negro, y Ngöbé-Bugle para conocer si existen o no diferencias y de existir, conocer cual población se encuentra más protegida por la acción de esta enzima.

CAPITULO II
FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

El Ca^{2+} está ubicado en el centro de las hojas plegadas y es designado como “calcio estructural” porque al disociarse de la proteína se produce su desnaturalización (6).



Figura No. 2. Iones Calcio (Ca^{2+}) asociados a la PON1: En el túnel central de la hélice se observan dos átomos de calcio en rojo y verde. Tomado de Harel, M.; Aharoni, A., et al. Structure and evolution of the paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes. *Nature Structural & Molecular Biology*. 2004; Vol. 11(5):412-419.

2.1.2 Sitio Catalítico

El sitio catalítico de la *PON1* incluye, además del ión calcio, un ión fosfato y ha sido postulada la presencia de una diada de His134-His115 (Figura No.3a) (6).

2.1.3 Familia PON

La familia de *PON* está formada por tres miembros: *PON1*, *PON2*, y *PON3* (5). En los humanos la expresión de *PON1* ocurre en el hígado, mientras que la de *PON3* se lleva a cabo en el hígado y en el riñón, y la de *PON2* en diversos tejidos (5).

2.2 Mecanismo de Reacción de la Paraoxonasa:

El mecanismo de reacción de la *PON1* consta de los siguientes pasos (figura 4B) (6).

- Paso 1: se disocia una molécula de agua por acción de la diada His-His; en consecuencia, se genera un ión hidróxido que ataca al carbonilo del éster para producir un intermediario tetrahédrico oxianiónico (Figura No. 3b) (6).
- Paso 2: El doble enlace en el intermediario tetrahédrico se restablece y se libera el ión acetato y fenol cuando el sustrato es el fenilacetato (Figura No. 3b) (6).

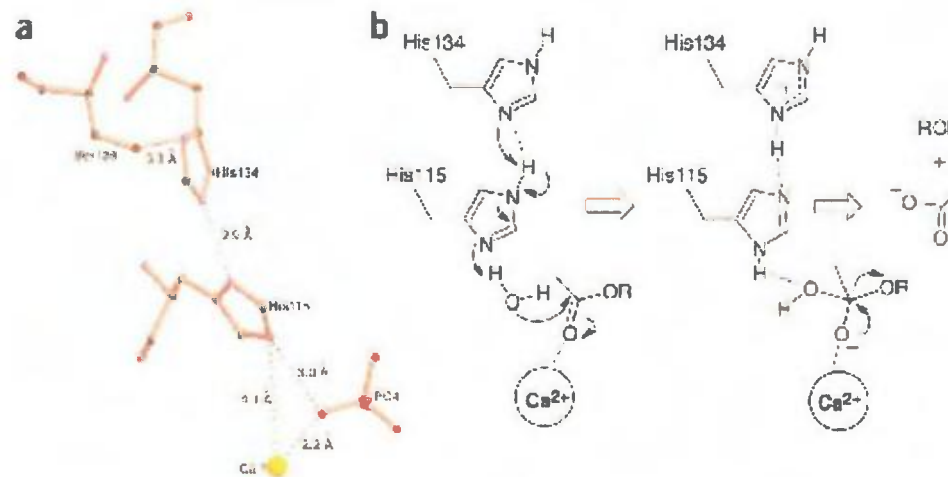


Figura No. 3. Mecanismo de reacción propuesto de la *PON1*.

a. El sitio catalítico de la *PON1* incluye un átomo de calcio (verde), el ión fosfato (rojo) y se ha propuesto una diada de His 134-His 115.

b. Representación del mecanismo propuesto para la *PON1*.

Tomado de Harel, M.; Aharoni, A., et al. Structure and evolution of the paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes. *Nature Structural & Molecular Biology*. 2004; Vol. 11(5):412-419.

2.3 Polimorfismos de la Paraoxonasa

La *PON1* presenta polimorfismos en la región promotora y en la región codificadora (Figura No.4).

2.3.1 Polimorfismos en la región promotora

En la región promotora están presente polimorfismos en las posiciones: -108 (T/C), -126 (G/C), -162 (A/G), -832 (T/C) y -909 (C/G). De éstos, los polimorfismos -108, -162

y el -909 han sido relacionados con diferencias en la expresión y actividad de la *PON1* (7). El efecto más significativo sobre la actividad de la *PON1* ocurre cuando hay polimorfismos en la posición -108. Este polimorfismo contribuye con el 22.8% de la actividad enzimática (Figura No.5) (7).

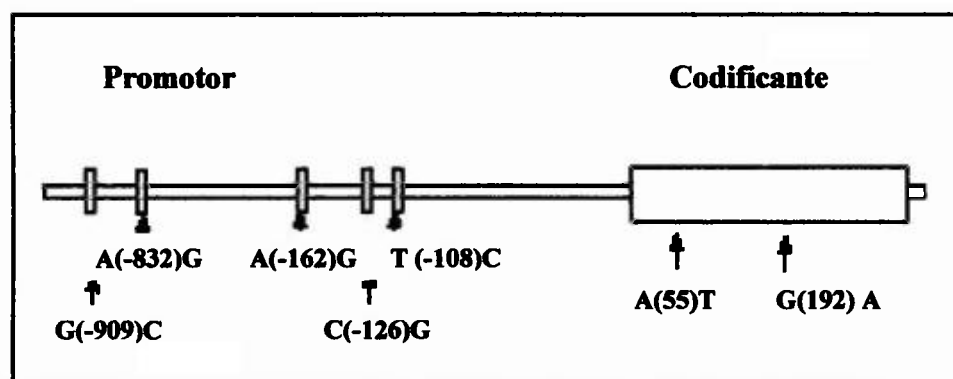


Figura No. 4. Polimorfismos de la Paraoxonasa: Localización en el gen *PON1* de los polimorfismos más importantes descritos.

Tomado Ferré N.; Camps, J.; Joven, J. Paraoxonasas, acción antioxidante de la HDL y respuesta inflamatoria. *Cardiovascular Risk Factors* 2004;13: 2,106-114

En los estudios realizados por Leviev et al. (2000) concluyeron que la posición -108 podría ser un sitio potencial de unión del factor de transcripción Sp1. La unión del factor Sp1 con la caja GC en el ADN, promueve la transcripción y por ende, la traducción de la proteína. (8).

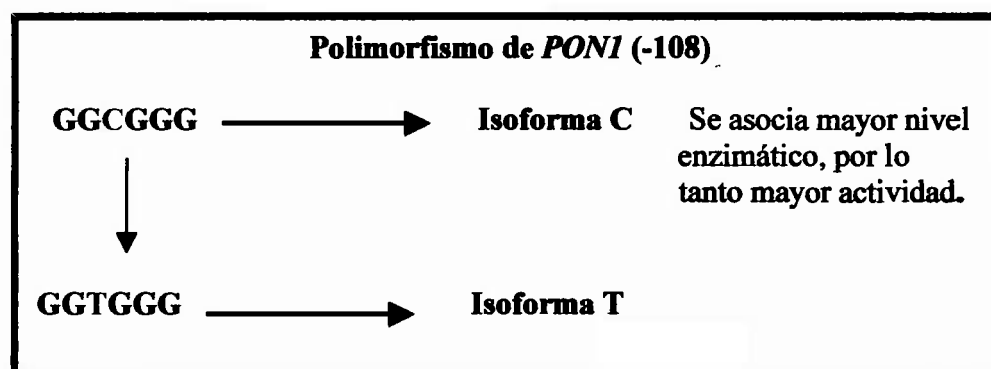


Figura No. 5. Polimorfismos en la región promotora. Esquema de los cambios de nucleótidos correspondientes al polimorfismo -108 del gen *PON1*. Tomado Leviev, I; James, R. Promoter polymorphisms of human paraoxonase *PON1* gene and serum paraoxonase activities and concentrations. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2000;20:516-521.

2.3.2 Polimorfismos en la región codificadora

En la región codificadora han sido investigados los polimorfismos en la posición 55(L/M), que afecta los niveles de la *PON1* en suero y en la posición 192(Q/R), que afecta la actividad enzimática en relación con el sustrato (9) (Figura No. 6). De estos dos polimorfismos el más estudiado es el de la posición 192; éste presenta una frecuencia de 0.75 en individuos caucásicos del norte de Europa y 0.30 en individuos asiáticos (4). Este polimorfismo ha sido estudiado por los efectos que produce en la eficacia catalítica al hidrolizar sustratos específicos (4).

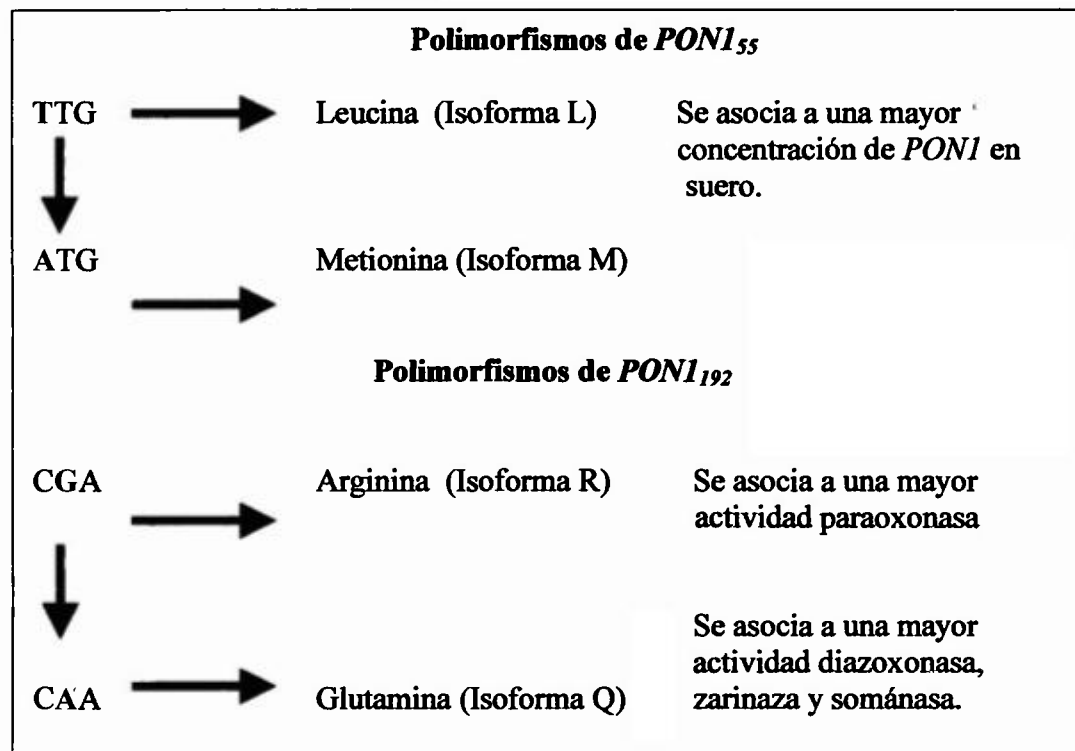


Figura No. 6. Polimorfismos de *PON1* en la región codificadora: Esquema de los cambios de nucleótidos y residuos de aminoácidos correspondientes a los polimorfismos *PON1*₅₅ y *PON1*₁₉₂ del gen de *PON1*. Tomado Ferré N.; Camps, J.; Joven, J. Paraoxonasas, acción antioxidante de la HDL y respuesta inflamatoria. *Cardiovascular Risk Factors* 2004;13: 2,106-114

Aparentemente, el polimorfismo L/M no está relacionado con la eficacia catalítica, pero ha sido asociado con la variabilidad de los niveles de la *PONI* en plasma. Individuos con el polimorfismo *PONI*_{M55} presentan niveles bajos de la *PONI*. Por otro lado, estudios relacionados con la posición 192 han revelado que este polimorfismo afecta significativamente la actividad de la enzima *PONI*, dependiendo del sustrato utilizado.

Estudios iniciales indicaron que la isoenzima *PONI*_{R192} hidroliza paraoxón más rápido que la isoenzima *PONI*_{Q192}. Estudios posteriores indicaron que la isoforma *PONI*_{Q192} hidroliza diazoxón, sarín y somán más rápido que la *PONI*_{R192} (4).

Estudios realizados por Watson et al.(10), demostraron que al tratar las LDL oxidada con *PONI* purificada se reducía significativamente la capacidad de esta lipoproteína de inducir las interacciones entre monocitos y las células endoteliales y que este efecto estaba asociado a una disminución de los fosfolípidos oxidados presentes en la LDL. Estos autores sugieren que la función fisiológica de *PONI* podría ser la de proteger contra la inducción de la respuesta inflamatoria en la pared de la arteria mediante la hidrólisis de los fosfolípidos biológicamente activos en la LDL oxidada. Investigaciones realizadas por Mackness et al.(11), demostraron que las HDL de individuos con el polimorfismo QQ presentaban una mayor capacidad de proteger las LDL contra la oxidación, en comparación con las HDL de individuos que tiene el polimorfismo QR o RR (Figura No. 7). Otros estudios realizados por Aviram et al.(12), demostraron que la *PONI* Q purificada era más efectiva que la *PONI* R hidrolizando hidroperóxidos de linoleato de colesterol e hidróxidos de linoleato de colesterol en lesiones de arterias carótidas. Estos trabajos no han sido confirmados por otros investigadores, por tanto este tema todavía es polémico.

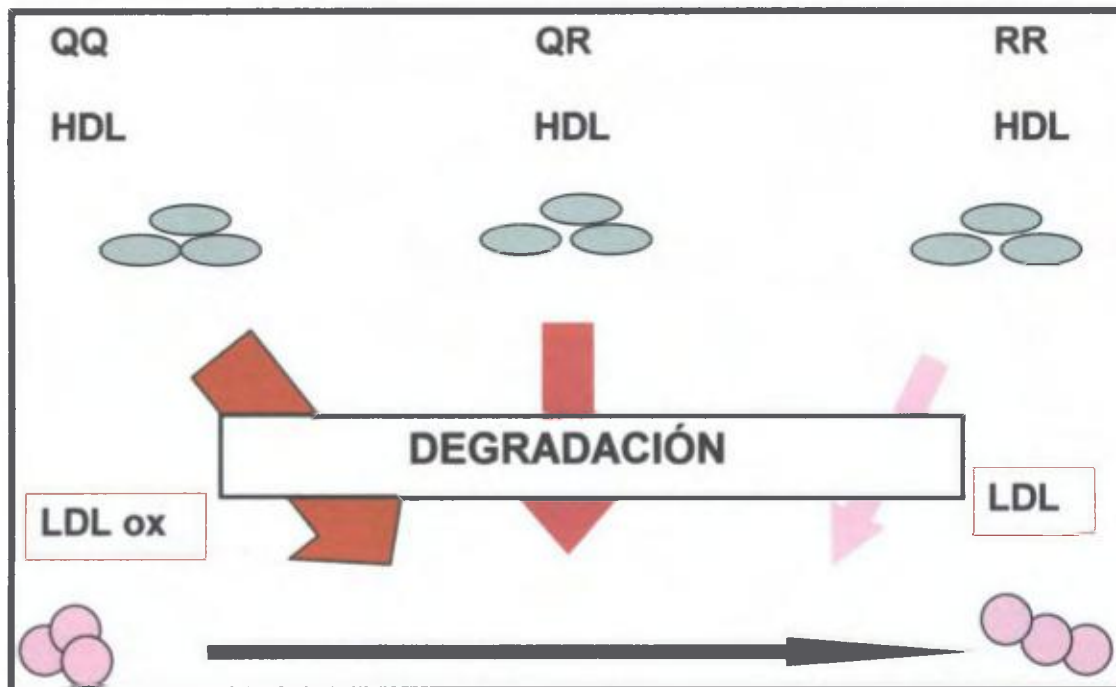


Figura No. 7. Polimorfismos de *PON1*₁₉₂: La *PON1* presente en las HDL procedente de individuos QQ es más eficiente en la degradación de los fosfolípidos oxidados de la LDL que la procedente de individuos QR o RR según el trabajo realizado por Mackness et al. Tomado de Ferré N.; Camps, J.; Joven, J. Paraoxonasas, acción antioxidante de la HDL y respuesta inflamatoria. *Cardiovascular Risk Factors* 2004;13: 2,106-114

2.4 Mecanismo de anclaje de la *PON1* en las HDL

La *PON1* está asociada principalmente a las HDL, es sintetizada en el hígado y liberada por un proceso de anclaje. En este proceso, las HDL se asocian de forma transitoria a la membrana celular; luego la *PON1* es removida de la membrana celular y queda asociada a las HDL (4). Estudios recientes sugieren que la *PON1* también se asocia a lipoproteínas ricas en triacilglicéridos como los quilomicrones y las VLDL, pero no a las LDL (5).

De forma inusual la *PON1* es capaz de retener su secuencia señal hidrofóbica N-terminal al ser secretada de la célula (13). Esta secuencia ha sido involucrada para explicar

el mecanismo de anclaje de la *PONI* (6). Este mecanismo es explicado mediante dos hélices adyacentes e hidrofóbicas representadas como H1 y H2 que proveen de una superficie que potencia la unión con la monocapa de la lipoproteína (6). En la mayoría de los casos, la secuencia señal N-terminal es escindida o invisible en la estructura terciaria obtenida a partir de cristales y adopta una conformación helicoidal (H1) (Figura No. 8). Los residuos hidrofóbicos de una segunda hélice (H2) (figura No. 8), adyacente al extremo N-terminal, se orientan hacia el solvente al igual que un número de residuos hidrofóbicos en los lazos que conectan la hélice con el resto de la estructura de la *PONI* (6).

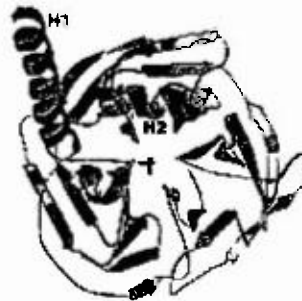


Figura No. 8: Representación de las hélices H1 y H2 en la *PONI*: Las hélices hidrofóbicas H1 y H2 participan de la unión de la *PONI* a las HDL. Tomado de Harel, M.; Aharoni, A., et al. Structure and evolution of the paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes. *Nature Structural & Molecular Biology*. 2004; Vol. 11(5):412-419.

Estas regiones proporcionan las áreas hidrofóbicas adyacentes que permiten que la *PONI* se una a las membranas y/o a las lipoproteínas. La interfase potencial con la HDL tiene un “anillo aromático” rico en residuos de triptófano y tirosina, el cual ha sido descrito en otras proteínas de unión a membranas (figura No. 9) (13).

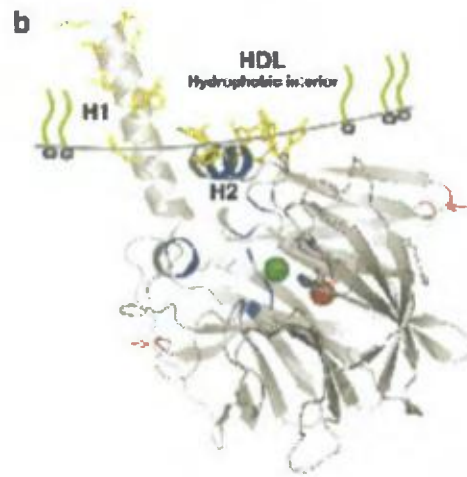


Figura No. 9: Modelo de anclaje de la *PON1* a la superficie de las HDL. Los residuos hidrofóbicos (amarillo) de la hélice H2 son Tyr185, Phe186, Tyr 190, Trp194 y Trp 202, el residuo de la hélice H1 es Lys21, estos son los residuos de ambas hélice que están involucrados en el anclaje de la *PON1* en la HDL. Tomado de Harel, M.; Aharoni, A., et al. Structure and evolution of the paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes. *Nature Structural & Molecular Biology*. 2004; Vol. 11(5):412-419.

Cuando se elimina la secuencia señal hidrofóbica se produce una *PON1* que al ser secretada de la célula es incapaz de ligarse a las HDL. Esto demuestra que la *PON1* se une a la lipoproteína HDL mediante esta secuencia hidrofóbica N-terminal (13).

Las predicciones de la estructura tridimensional indican que la *PON1* que está unida a las HDL puede modificar su sitio catalítico, particularmente porque la región de anclaje a la HDL es parte del sitio catalítico (13).

Las HDL son las lipoproteínas con mayor proporción proteica (55-60% de su masa seca), siendo la apo A-I su apolipoproteína más abundante (Figura No. 10). La apo A-I, la cual desempeña una función estructural, es indispensable para el flujo de colesterol de las células periféricas y, además, es la coenzima de la lecitina:colesterol aciltransferasa (LCAT). Se han descrito varias subclases de HDL en función de ciertas características

fisicoquímicas y funcionales. Una clasificación, con base en la densidad de flotación, las distingue en HDL₂ y HDL₃. Las HDL₂ son ricas en lípidos hidrofóbicos, mientras que las HDL₃ están formadas principalmente por fosfolípidos y proteínas (14).

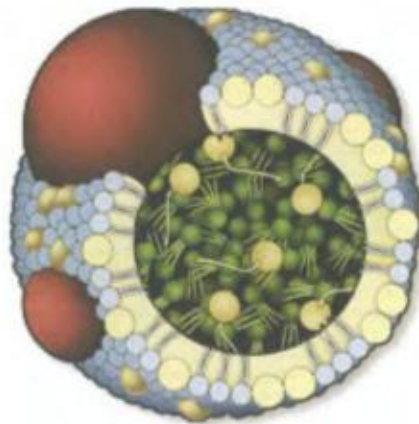


FIGURA No 10. Estructura de la HDL: Las HDL son complejos macromoleculares, constituidos por lípidos anfipáticos (fosfolípidos y colesterol libre), lípidos no polares (triglicéridos y ésteres de colesterol) y por proteínas llamadas apolipoproteínas (apo) (24). Figura tomada de www.wichita.kumc.edu

En una revisión bibliográfica presentada por Pérez (14) menciona la correlación positiva entre la concentración de apo A-I y la actividad enzimática de *PONI*. Tal correlación tiene su origen en que la cantidad de partículas HDL determina el número de moléculas de la enzima presente en plasma. Siendo la apo A-I un marcador excelente de la cantidad de partículas HDL, la correlación entre apo A-I plasmática y actividad *PONI* es de esperarse. Sin embargo, la cantidad de *PONI* presente en las HDL depende inversamente de la apo A-II, segunda proteína en abundancia de las HDL. Ratones transgénicos para apo A-II humana, expresan un tipo de HDL proinflamatorias y que carecen de capacidad para inhibir la oxidación de las LDL debido a un bajo contenido de *PONI*. Estudios recientes han demostrado que las HDL₃ son los mejores aceptores plasmáticos de la paraoxonasa que originalmente se encuentra unida a la membrana del hepatocito (14). La capacidad de las

HDL para liberar la *PONI* de la membrana del hepatocito depende, también, del contenido de colesterol libre presente en la lipoproteína, indicando que la tensión superficial y la fluidez de la capa de fosfolípidos de las HDL es fundamental para su asociación con la enzima. Estos resultados sugieren que no cualquier tipo de partícula HDL es capaz de transportar *PONI* en plasma y vectorizarla al espacio subendotelial en donde desempeña su papel antiateroscleroso. Indudablemente, la *PONI* tiene una participación importante en la prevención de la aterosclerosis, pero debido a los factores genéticos y ambientales que la regulan, no se puede concluir que sea el único elemento que confiera la actividad protectora a las HDL (14).

2.5 Secreción de la *PONI* y asociación con las membranas de la célula

El mecanismo de secreción de la *PONI* es importante porque los factores que modulan esta secreción, a su vez afectarán los niveles plasmáticos de la enzima. Se ha utilizado un modelo de cultivo de células CHO (Ovario de Hámster Chino) para estudiar la secreción de la *PONI* (13). En ausencia de lipoproteínas, poca *PONI* fue secretada. La adición de las micelas de fosfolípidos o de HDL estimuló la secreción, mientras que la LDL y la ApoA-I libre de lípidos no tuvieron ningún efecto. Esto sugiere que la *PONI* requiere de un aceptor apropiado para su liberación hacia el plasma. La HDL parece ser el aceptor fisiológico predominante, pero la presencia de la apoA-I/apoA-II no son esenciales. La *PONI* puede ser removida de fosfolípidos de las HDL por competencia; por lo tanto, debe ser capaz de moverse entre las HDL y otras áreas ricas en proteínas como las membranas celulares y las áreas de daño lipídico (13).

Estudios con inmunofluorescencia mostraron que la *PONI* está localizada en la superficie externa de las membranas celulares de hepatocitos de CHO transfectados (13). La *PONI* que está ligada a membrana es activa frente al fenilacetato como sustrato. En presencia de las HDL, esta actividad se pierde a nivel de membrana, sugiriendo que HDL puede sustraer activamente *PONI* de las membranas de la célula. La secreción de la *PONI* inducida por HDL es dependiente de la concentración y es saturable, indicando que esta puede ser mediada por receptores. Un posible receptor es el depurador SR-B1. Este receptor facilita la asociación transitoria de HDL con la superficie de la célula. Tiene una especificidad para los ligandos libres y puede unirse a las HDL que contengan apoA-I y apoA-II, al igual que micelas de fosfolípidos. Resulta interesante que el receptor SR-B1, no puede unirse a lípidos pobres en apoA-I, limitando los requerimientos del complejo aceptor de secreción de la *PONI* (13). La *PONI* puede aprovechar el hecho de que el SR-B1 retiene a las HDL cerca de la membrana para llevar a cabo la transferencia. Para corroborar esta hipótesis, experimentos especialmente diseñados demostraron un aumento en la secreción de *PONI* en las células que sobreexpresan el receptor (13).

2.6 Actividades enzimáticas de la Paraoxonasa

La *PONI* puede presentar, según el sustrato, las siguientes actividades enzimáticas:

2.6.1 Actividad Paraoxonasa: La *PONI* inicialmente fue identificada en el campo de la toxicología por su capacidad de hidrolizar compuestos organofosforados sintéticos presentes en pesticidas y en gases nerviosos (15). El paraoxón es un metabolito tóxico producido en el hígado a partir del paratión. Si el paraoxón llega al torrente sanguíneo es hidrolizado por la enzima *PONI* de la HDL en los mamíferos y queda inactivo. La *PONI* no está presente en las aves, peces e insectos

por lo cual estos animales son intoxicados con facilidad por los compuestos antes mencionados (15). La sensibilidad o la resistencia de un individuo al metabolito de un pesticida depende de la forma polimórfica y de los niveles plasmáticos de la enzima en el individuo (16).

- Metabolitos de pesticidas: paraoxón y los metabolitos oxones de clorpirifós.

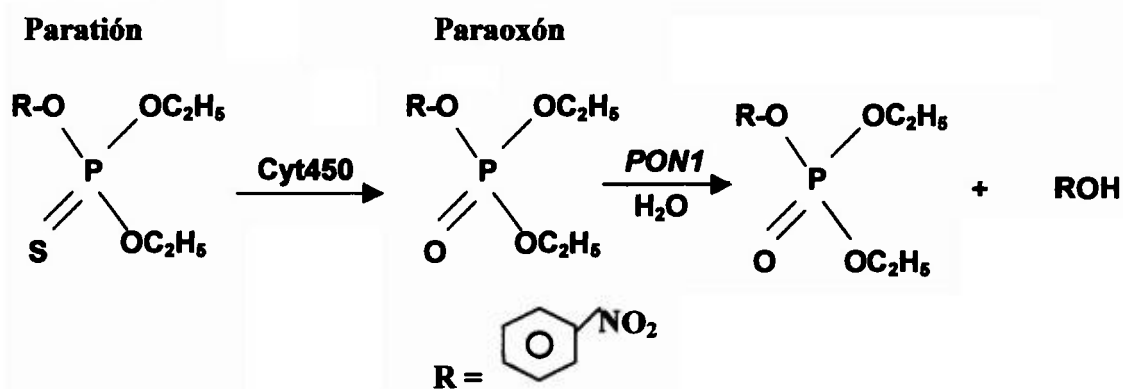


Figura No. 11: Reacción de hidrólisis del paraoxón: Tomado: Draganov, D.; La Du, B.N. Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review. *Pharmacol.* 2004; 369: 78-88.

- Gases nerviosos: sarín y somán.

El sarín es un arma química de guerra creada por el hombre y clasificada como un agente nervioso. Los agentes nerviosos son los compuestos químicos de guerra más tóxicos y de más rápido efecto que se conocen. Son parecidos a los pesticidas organofosforados debido a la forma en que actúan y a los efectos dañinos que producen. Sin embargo, los agentes nerviosos son mucho más potentes que los pesticidas organofosforados. El sarín fue desarrollado originalmente como pesticida en 1938 en Alemania. Es un líquido claro, incoloro e insípido que no tiene olor en su forma pura. Sin embargo, puede convertirse en gas y propagarse al medio ambiente. El 20 de marzo de 1995 la ciudad de Tokio fue foco de todos los medios internacionales tras el atentado terrorista con el gas nervioso sarín por

parte del grupo sectario Aum Shinrikyo en el sistema de trenes subterráneos, en el cual murieron 12 personas y miles fueron afectadas (17).

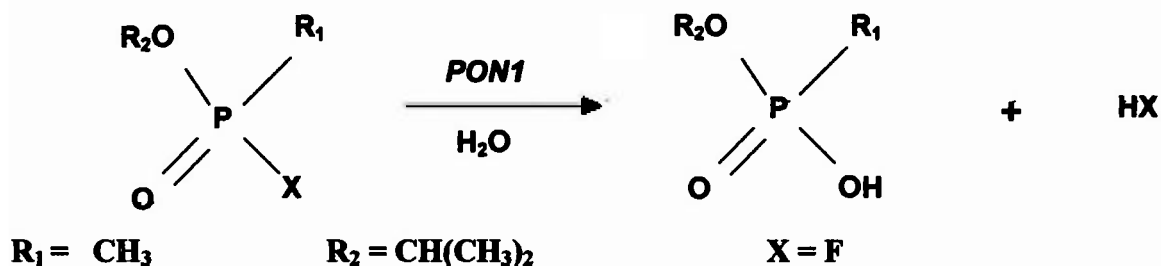


Figura No. 12. Reacción de hidrólisis del sarín:

Tomado: Draganov, D.; La Du, B.N. Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review. *Pharmacol* 2004; 369: 78-88.

2.6.2 Actividad Diazoxonasa: Esta actividad permite a la *PON1* hidrolizar el sustrato diazoxón en pirimidinol y dietilfosfato (18).

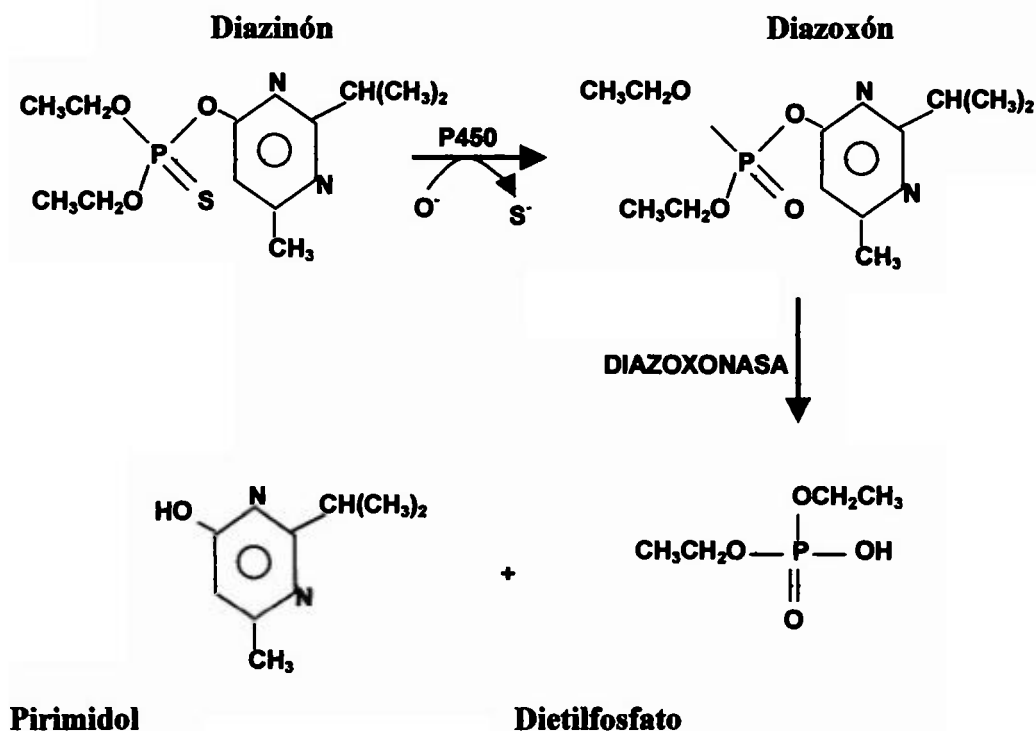


Figura No. 13. Reacción de hidrólisis del diazoxón: Tomado de Leary, K.; Edwards, R.; et al. Genetic and other sources of variation in the activity of serum paraoxonase/diazoxonase in humans: consequences for risk from exposure to diazinon. *Pharmacogenetics and Genomics*. 2005, 15: 51-60.

2.6.3 Actividad Arilesterasa

Esta actividad le permite a la *PON1* hidrolizar arilésteres como el fenilacetato (15).

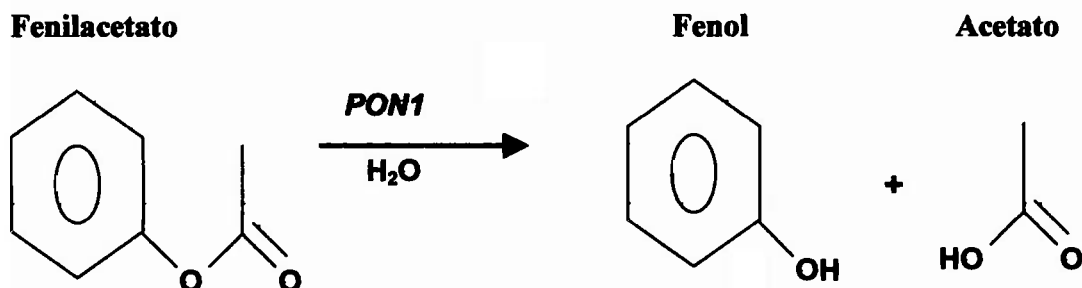
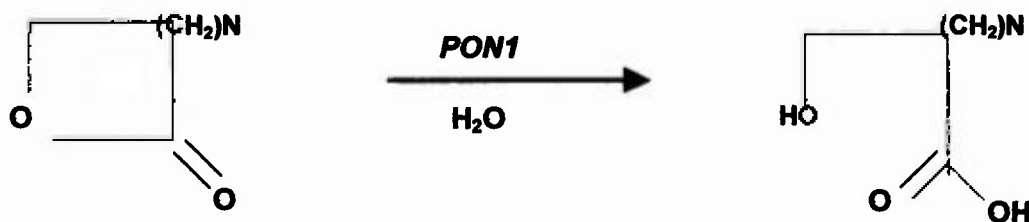


Figura No. 14. Reacción de hidrólisis del fenilacetato: Tomado: Draganov, D.; La Du, B. N. Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review. *Pharmacol* 2004; 369: 78-88.

2.6.4 Actividad lactonasa: La *PON 1* tiene la capacidad de hidrolizar más de 30 moléculas de tipo lactona entre las que se encuentran: (15)

- Moléculas endógenas: tiolactonas de homocisteínas y gammalactonas de glucocorticoides.
- Moléculas exógenas: estatinas.



N = β-propiolactona

Figura No. 15: Reacción de hidrólisis de tiolactona de homocisteínas: Tomado: Draganov, D.; La Du, B.N. Pharmacogenetics de paraoxonases: a brief review. *Pharmacol.* 2004; 369: 78-88.

2.6.5 Actividad antioxidante

La *PON1* confiere propiedades antioxidantes a las HDL y representa probablemente el principal mecanismo de:

- Prevenir la oxidación del colesterol en las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y de las propias HDL (15).
- Prevenir la iniciación de la aterosclerosis (15).
- Aunque no existe un acuerdo unánime, la *PON 1* podría activar a la enzima acetilhidrolasa, la cual hidroliza al factor activador de plaquetas, confiriéndole a la *PON1* propiedades antiinflamatorias (15). La *PON1* puede presentar propiedades antiinflamatorias en las células de la pared arterial. Un mecanismo posible de esta protección mediada por la *PON1* podría residir en su capacidad de hidrolizar peróxidos lipídicos en lipoproteínas oxidadas, especialmente hidroperóxidos de fosfolípidos, así como el factor activador de plaquetas y otros fosfolípidos con estructuras similares que representan un elevado potencial inflamatorio (19).

2.7 Factores que regulan la actividad enzimática de la *PON1*

2.7.1 Los peróxidos lipídicos.

Estos peróxidos inhiben las actividades paraoxonasa, arilesterasa y esterasa de la enzima *PON1*, probablemente, por sus interacciones con un grupo sulfhidrilo de la enzima. Cuando las HDL se oxidan se produce una disminución de la actividad de la paraoxonasa y, en consecuencia, una reducción de la protección que ejerce la enzima frente a la oxidación de las LDL (15).

2.7.2 La presencia del aminoácido Cys283.

La presencia del aminoácido Cys 283, probablemente forma parte del sitio catalítico de la *PONI* (15).

2.7.3 El ión Calcio

La concentración plasmática de Ca^{2+} afecta la actividad de *PONI*, debido a que la *PONI* tiene dos iones calcio con funciones diferentes, uno estructural y el otro catalítico (15).

2.7.4 Las variantes génicas

Las variantes génicas en la región codificadora *PONI*₁₉₂ y *PONI*₅₅ generan isoenzimas con diferentes velocidades de reacción, dependiendo del sustrato, mientras que las variantes de la región promotora *PONI*₋₁₀₈ producen niveles plasmáticos diferentes de la enzima (15).

2.8 La Paraoxonasa y algunas patologías

La actividad de la *PONI* puede también variar dependiendo de las condiciones fisiológicas o el estado patológico de un individuo, como por ejemplo durante el embarazo, enfermedades renales, diabetes mellitus, cirrosis hepática, deficiencia de HDL, la dieta y el estilo de vida (4).

2.8.1 La Paraoxonasa y las Enfermedades Neurológicas:

Los insecticidas son la principal fuente de compuestos organofosforados formados por triésteres del ácido fosfórico. Los insecticidas comúnmente usados como el diazinón y el clorpirifós son transformados a nivel hepático a los correspondientes metabolitos mediante procesos de desulfuración y oxidación catalizados por enzimas tipo citocromo P₄₅₀ (4). La

exposición aguda a estos organofosforados puede causar neurotoxicidad a través del Síndrome Colinérgico, el cual ocurre cuando hay una sobreestimulación en los sistemas nerviosos central y periférico de los receptores muscarínicos y nicotínicos por la acetilcolina. Los compuestos organofosforados y sus metabolitos inhiben a la acetilcolinesterasa (enzima responsable de hidrolizar a la acetilcolina) por modificación covalente del residuo de serina que participa en el mecanismo de hidrólisis de la acetilcolina. (4).

Como ya se mencionó anteriormente, la *PONI* es una esterasa que puede hidrolizar compuestos organofosforados sintéticos que incluyen agentes nerviosos, por lo que otra función de la *PONI* es desintoxicar al organismo de los compuestos organofosforados (4). La mayoría de los compuestos organofosforados son neurotoxinas y la exposición crónica a ellos puede ocasionar neuropatías y efectos neuropsiquiátricos. Se ha sugerido que el efecto desintoxicante de la *PONI* respecto a estos compuestos y a los peróxidos lipídicos podría ser un elemento clave en el desarrollo de enfermedades neurológicas, como la enfermedad de Alzheimer o de Parkinson (15).

Resulta interesante la observación de que los granjeros, para desinfectar a sus ovejas, usan organofosforado diazinón (cuyo metabolito es el diazoxón) y pueden acabar afectándose si la actividad diazoxonasa de la *PONI* está disminuida. Se han observado niveles bajos de actividad de la *PONI* en soldados que participaron en la guerra del Golfo Pérsico, algunos de los cuales presentaban síntomas neurotóxicos (15).

2.8.2 La Paraoxonasa y las Enfermedades Cardiovasculares:

El conocimiento de las funciones de la *PON1* en fisiología y patología humana es escaso, pero los datos de estudios bioquímicos y genéticos recientes sugieren que la paraoxonasa atenúa la enfermedad de aterosclerosis porque la actividad sérica de la *PON1* está inversamente relacionada con el riesgo de enfermedad cardiovascular (5).

La aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria, crónica y evitable cuyas manifestaciones clínicas agudas dependen de la rotura de la placa (19). Las células de la pared arterial secretan, por su propio metabolismo normal, diversas sustancias oxidantes que rápidamente provocan la oxidación de los lípidos atrapados en el espacio subendotelial. En una primera fase, simplemente se oxidan los lípidos de las LDL, pero cuando los monocitos son finalmente reclutados y convertidos en macrófagos, se añade su gran capacidad oxidativa que altera la apoproteína B. Consecuentemente, el receptor de la LDL pierde su capacidad de reconocerlas y entran en juego otros receptores no regulados por el contenido de colesterol de las células. El estado inicial de formación de la placa ateromatosa se caracteriza por la acumulación de moléculas de C-LDL parcialmente oxidadas que penetran en el subendotelio y son fagocitadas por los macrófagos mediante el receptor CD36 de estas células (20). Debido a que los macrófagos carecen de un mecanismo de autorregulación en este proceso de atrapamiento del C-LDL oxidado, el citoplasma de los macrófagos acumula grandes cantidades de C-LDL oxidado y se transforman en células espumosas (20). El resultado es una masiva acumulación de colesterol y LDL oxidada, y, por lo tanto, la formación de células espumosas (19).

La participación de la *PONI* en el desarrollo de aterosclerosis ha sido demostrada en estudios realizados con ratones transgénicos carentes de *PONI* y de apolipoproteína E, en donde se comprobó que desarrollaban un proceso acelerado de aterosclerosis (5). Estos autores concluyeron que la *PONI* es la enzima responsable del efecto protector de las HDL contra la aterosclerosis (4).

La mayoría de los estudios sugieren que la propiedad antiaterogénica de la *PONI* se debe a su función antioxidante y, por ende, la disminución del estrés oxidativo. Se ha demostrado que la *PONI* protege tanto al colesterol-LDL (C-LDL) como al colesterol-HDL (C-HDL) contra la lipoperoxidación. El C-HDL obtenido del ratón privado de *PONI* era incapaz de prevenir la oxidación del C-LDL *in vitro* (20).

Las HDL son el principal grupo lipoproteico donde se acumulan ésteres de colesterol con hidroperóxidos (19). Estudios realizados por Ribas et al. sugieren que una de las propiedades antioxidante/antiinflamatoria de las HDL es mediado por un mecanismo de transporte de estos hidroperóxidos para su metabolismo en el hígado (19).

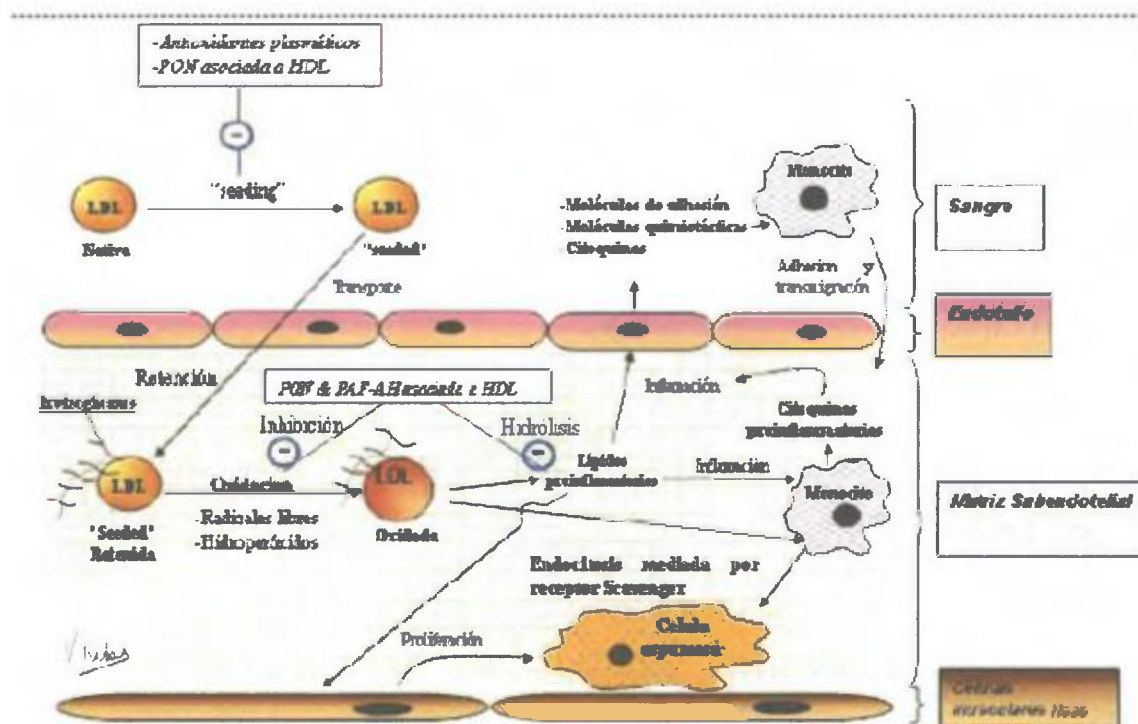


Figura No. 16. Modelo propuesto por Ribas et al. Oxidación de la LDL por las células de la pared aórtica. La LDL puede adquirir hidropéroxidos en la circulación mediante el intercambio de lípidos con otras lipoproteínas o bien al entrar en la matriz endotelial y volver a la circulación. Los antioxidantes solubles en plasma y las HDL podrían evitar la adquisición o inactivar estas moléculas iniciadoras de la oxidación. Cuando las LDL quedan atrapadas en los proteoglicanos de la matriz subendotelial pueden adquirir más moléculas iniciadoras de la oxidación provenientes de las especies reactivas de oxígeno, de los hidropéroxidos, de los productos de las vías de las lipooxigenasa y la mieloperoxidasa. Cuando el nivel de estas moléculas llega a un determinado umbral se puede producir un proceso de oxidación no enzimático que genera lípidos con capacidad proinflamatoria, especialmente fosfolípidos. Estos lípidos oxidados estimulan la expresión de moléculas de adhesión y la secreción de quimiocinas que atraen a monocitos y estos transmigran a través de endotelio. Los monocitos en la matriz subendotelial pueden transformarse en macrófagos. Tomado de Ribas Serra, Vicent. Estudio de la propiedades antiaterogénicas de las HDL de ratones transgénicos de apo A-II humana. Marzo 2005. Barcelona. <http://www.tdx.cesca.es>.

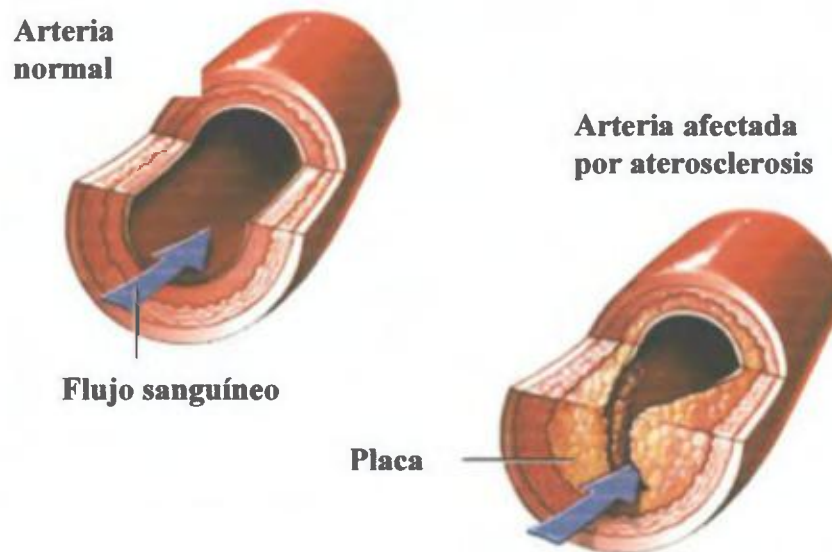


Figura No 17. Arteria normal y con placa ateromatosa: Comparación de una arteria normal y una arteria de paciente con aterosclerosis que presenta una disminución de la luz por la presencia de la placa ateromatosa. Tomado y adaptado de www.Virtualsciencefair.org/.../chol.html

La *PONI* puede entrar en el macrófago durante su interacción con el C-HDL; de esta forma puede proteger a los macrófagos contra el estrés oxidativo a través de la hidrólisis de los lípidos oxidados y mediante la atenuación de la captación del C-LDL oxidado por parte de los macrófagos (20).

El sustrato específico de la *PONI* no ha sido identificado. La *PONI* hidroliza fosfolípidos y ésteres de colesterol hidroperoxidados y los hidróxidos derivados del ácido araquidónico o el ácido linolénico (4).

La *PONI* podría tener actividades de esterasa, y fosfolipasa que previenen la formación de los lípidos oxidados que son proinflamatorios (4). Las HDL aisladas de pacientes

normolipidémicos con baja actividad plasmática de *PONI* no protegen a los lípidos de las LDL de la acción oxidativa de las especies reactivas de oxígenos (4).

Estudios realizados en ratones transgénicos que sobreexpresan la Apo A-II han demostrado que las HDL enriquecidas con esta apolipoproteína son proaterogénicas. Esto podría ocurrir porque la apo AII desplaza a la enzima *PONI* de las HDL. Así, las HDL presentan pobres propiedades antiaterogénicas (21).

Estudios realizados en pacientes con diabetes indican que más del 70% de la actividad de la *PONI* se encuentra libre de HDL. Esta *PONI* libre, a diferencia de la *PONI* asociada a las HDL, no logra proteger contra la lipoperoxidación y presenta una disminución de su habilidad para estimular el flujo del colesterol en el macrófago. El incremento de la disociación de la *PONI* de las HDL de los diabéticos podría estar relacionado con la disminución de los niveles de ApoA-1 o con la glicosilación de las HDL (21).

El tabaquismo favorece las reacciones de oxidación en el organismo humano debido a que el humo del tabaco contiene agentes oxidantes que producen radicales libres y participan en el proceso de peroxidación (16). En condiciones normales, los antioxidantes atrapan a los radicales libres y actúan como barrera protectora frente a este mecanismo de oxidación. Si este mecanismo de protección falla previamente a la inhalación del humo de cigarrillo, el colesterol oxidado comienza a acumularse en las LDL que han sido fagocitadas por los macrófagos, lo cual constituye el paso previo a la aterosclerosis. Estudios llevados a cabo en el Hospital Universitario de Ginebra (2004) determinaron que fumar reduce los niveles o la actividad antioxidantes de la paraoxonasa, aportando nuevos

datos sobre el daño que causa el tabaco, ya que esto favorece la aparición de placas ateromatosas en las arterias, que pueden provocar ataques al corazón (16).

El estudio antes mencionado fue realizado en 596 sujetos con enfermedad coronaria y los resultados indican que los fumadores presentan concentraciones de la enzima antioxidante paraoxonasa mucho menores que las de los no fumadores o las de los exfumadores. Los sistemas antioxidantes y las vitaminas antioxidantes contrarrestan los efectos de los radicales libres en las células. El colesterol oxidado de las LDL puede ser más propenso a formar placas de ateroma que obstruyen los vasos sanguíneos. Como la sangre de los fumadores contiene una menor cantidad de paraoxonasa, los respectivos componentes sufren más oxidación, lo que aumenta el colesterol oxidado en las LDL, provocando a su vez la aparición de trombos o placas que desencadenan lesiones durante un ataque cardíaco (16).

2.8.3 La Paraoxonasa y la Hipercolesterolemia Familiar (HF)

Los pacientes con HF se caracterizan porque tienen un número reducido de receptores para las LDL debido a mutaciones en el gen de dicho receptor. Estos pacientes presentan un aumento significativo de la actividad paraoxonasa después de un tratamiento con simvastatina (15).

La simvastatina es una lactona que al ser rápidamente hidrolizada *in vivo* libera el correspondiente β -hidroxiácido que inhibe a la HMG-CoA reductasa, enzima clave en la biosíntesis del colesterol. Experimentos *in vitro* han demostrado que la simvastatina promueve un mecanismo antiaterosclerótico, porque activa al factor de transcripción SREBP-2 (proteína de unión al elemento regulador de esteroides) que se une a la región

promotora del gen que codifica para la paraoxonasa, provocando un aumento de 2.5 veces en la concentración plasmática de la paraoxonasa. En ausencia de simvastatina, esta región promotora se encuentra bloqueada por el mevalonato y por otros intermediarios de la síntesis del colesterol (15).

CAPITULO III
MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Tipo de estudio

Este estudio es descriptivo exploratorio ya que se determinaron los valores de referencia de las actividades enzimáticas arilesterasa y diazoxonasa de la *PONI* en diferentes grupos raciales de la población panameña y se identificaron polimorfismos genéticos en las regiones codificadora y reguladora. El estudio relaciona, también, el polimorfismo genético y la actividad enzimática, por lo que se trata parcialmente de un Estudio de Correlación.

3.2 Universo y muestra

3.2.1 Universo

Individuos de diferentes grupos raciales de la población panameña en el año 2006.

3.2.2 Muestra y tamaño

La muestra consistió de individuos pertenecientes a cuatro de los principales grupos raciales que conforman la población panameña. Cada grupo está formado por, aproximadamente, 50 panameños de ambos sexos. Blancos, 34 mujeres y 19 hombres; negros, 29 mujeres y 10 hombres; mestizos, 25 mujeres y 24 hombres; Ngöbé-Bugle, 21 mujeres y 27 hombres. El tamaño de la muestra fue establecido con base en los siguientes criterios:

1. B-Rao C. (2001) y Fernández (1999) coinciden en que el tamaño de la muestra en estudios de polimorfismo genético depende del número de alelos por locus, estableciéndose una relación directa; es decir, a menor cantidad de alelos por locus menor es el tamaño de la muestra requerida para determinar las frecuencias dentro de los límites de error permisible. Se ha demostrado que las varianzas de las frecuencias alélicas se estabilizan en el caso de loci bialélicos con muestras de 30 ó más individuos. En nuestro estudio, los polimorfismos estudiados presentan sólo dos alelos para cada locus de allí que es un caso de loci bialélicos. Por lo tanto, una muestra de 50 individuos se considera suficiente para determinar las frecuencias de los dos alelos de cada locus, con un intervalo de confianza de 95%.

2. Las bases de datos sobre frecuencias alélicas de loci STR, con un promedio de 10 alelos por locus, utilizadas mundialmente en pruebas de paternidad han sido generados a partir de estudios con un tamaño de muestra de alrededor de 200 individuos (GenePrint®STR systems, Promega Technical Manual).
3. El alto costo de los reactivos utilizados en las diferentes técnicas empleadas (extracción de ADN, PCR y digestión con endonucleasa de restricción).

3.2.3 Criterios de inclusión y exclusión

Criterios de inclusión.

- Individuos sanos, ambos sexos, mayores de 18 años.
- Población con fenotipo blanco: individuos con cabello lacio, piel blanca, labios no pulposos, nariz delgada y perfilada, descendientes de padres con fenotipo semejante.
- Población con fenotipo negro: individuos con cabello muy rizado, nariz ancha, pigmentación de la piel muy oscura, labios pulposos, descendientes de padres con fenotipo semejante.
- Población con fenotipo mestiza: individuos de cabello lacio negro, piel cobriza, descendientes de padres con fenotipo semejante.
- Población indígena: individuos pertenecientes al grupo aborigen Ngöbe-Buglé, descendientes de padres con fenotipo semejante.

Criterios de Exclusión:

- Pacientes con las siguientes patologías: diabéticos, enfermedad coronaria, hemoglobinopatías, hipercolesterolemia familiar, enfermedad neurológica.
- Pacientes fumadores.
- Pacientes que sean familia en el primer grado de consanguinidad.

3.2.4 Método de muestreo

Para este estudio se realizó un muestreo intencionado; las muestras fueron seleccionadas de acuerdo con el fenotipo para cada grupo.

3.2.5 Variables

- **Actividades Enzimáticas**

En este estudio se cuantificaron dos actividades enzimáticas: arilesterasa utilizando fenilacetato como sustrato y diazoxonasa usando diazoxón como sustrato.

- **Polimorfismos**

En la región codificadora para *PONI* se determinaron dos polimorfismos: la posición 192 que presenta codifica para un residuo de arginina o de glutamina; y la posición 55 que codifica para un residuo de metionina o de leucina. En la región promotora se estudió el polimorfismo de la posición -108 el cual puede presentar timina o citosina.

3.3 Materiales, Equipo, Instrumentos (ver anexo)

3.4 Métodos

3.4.1 Obtención de las muestras de sangre:

En el Laboratorio de Análisis de Investigación del Departamento de Ciencias de Laboratorio Clínico de la Facultad de Medicina se obtuvieron 4 mL de sangre de individuos pertenecientes a los grupos raciales que participaron en este estudio. Se utilizaron 2 mL de sangre para determinar las actividades enzimáticas y los 2 mL restantes fueron utilizados para la extracción del ADN empleado para la detección de los diferentes polimorfismos. La sangre utilizada para la determinación de las actividades enzimáticas fue colectada en un tubo sin anticoagulante y transportada al Laboratorio de Bioquímica y Nutrición de Facultad de Medicina en donde se midieron las actividades enzimáticas en un lapso de tiempo no mayor de 24 horas.

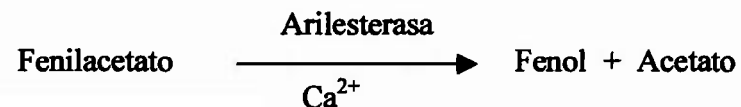
La sangre utilizada para la determinación de los polimorfismos fue colectada en un tubo con EDTA y transportada al Laboratorio de Investigaciones de Genética y Biología Molecular en donde se determinaron los polimorfismos.

Muchas de las muestras de sangre utilizadas en este estudio se obtuvieron de estudiantes del IV semestre de la carrera de Medicina y de primer ingreso de la Universidad de Panamá que participaron como voluntarios en el estudio en el año 2006. Cada uno de los individuos que participaron del estudio firmaron un formulario de consentimiento informado y llenaron una encuesta con sus datos.

3.4.2 Determinación de las actividades *PONI* en suero

3.4.2.1 Actividad Arilesterasa

Como sustrato de la enzima se utilizó el fenilacetato con el principio de reacción siguiente:



La velocidad de hidrólisis del fenilacetato fue determinada por duplicado midiendo la absorbancia del fenol durante 2 minutos de reacción, a una longitud de onda de 270 nm en un espectrofotómetro SHIMATZU y utilizando el método cinético a 25°C. La mezcla de reacción contenía 30 μL de suero diluido, CaCl_2 0.9 mM, Tris-Cl 20 mM pH 8.0 y fenilacetato 10 mM, en un volumen total de 3.0 mL. El ensayo fue iniciado mediante la adición del sustrato. La hidrólisis no enzimática del fenilacetato fue sustraída de la velocidad total de hidrólisis. El coeficiente de extinción del fenol a 270 nm es de $1310 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Una unidad (1U) de actividad de arilesterasa de *PONI* es igual a 1 μmol de fenilacetato hidrolizado/minmL (22).

Cálculo de la actividad Arilesterasa = Δ Absorbancia min/ ϵ

Coefficiente de extinción:

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

$$\epsilon = 1310 \text{ L/mol}$$

Factor de conversión:

$$\frac{1 \times 10^6 \mu\text{mol}}{1 \text{ mol}} \times \frac{1 \text{ mol}}{1310 \text{ L}} = 763.36 \mu\text{mol/L}$$

$$= 0.76336 \mu\text{mol/mL}$$

Factor de dilución de la muestra:

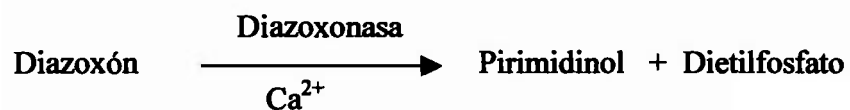
$$\frac{3.0 \text{ mL de reacción}}{0.003 \text{ mL suero}} = 1000$$

Actividad Arilesterasa = Δ Absorbancia x 0.76336 μmol x min x factor de dilución/ mL

Actividad Arilesterasa = Δ Absorbancia x 763.36 μmol x min / mL

3.4.2.2 Actividad Diazoxonasa

Como sustrato de la enzima se utilizará el diazoxón con el principio de reacción siguiente:



La velocidad de hidrólisis del diazoxón fue determinada midiendo la absorbancia del pirimidinol durante 2 minutos de reacción, a una longitud de onda a 270 nm en un espectrofotómetro SHIMATZU y utilizando el método cinético a 25°C. La mezcla de reacción contenía 30 μL suero diluido, CaCl_2 1.0 mM, Tris-Cl 50 mM pH 8.0 y diazoxón 1mM en un volumen total de 3.0 mL. El ensayo fue iniciado mediante la adición del sustrato. La hidrólisis no enzimática del diazoxón fue sustraída de la velocidad total de hidrólisis (18).

El coeficiente de extinción a 270 nm es de $2665 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Una unidad (1U) de actividad de diazonasa es igual a $1 \text{ } \mu\text{mol}$ de diazoxón hidrolizado/minmL (18).

Cálculo de la actividad Diaxozonasa = Δ Absorbancia min/ ϵ

Coeficiente de extinción:

$$\epsilon = 2665 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}, \quad \text{cm} = 1$$

$$\epsilon = 26651310 \text{ L / mol}$$

Factor de conversión:

$$\frac{1 \times 10^6 \text{ } \mu\text{mol}}{1 \text{ mol}} \times \frac{1 \text{ mol}}{2665 \text{ L}} = 375 \text{ } \mu\text{mol / L}$$

$$= 0.375 \text{ } \mu\text{mol / mL}$$

Factor de dilución de la muestra:

$$\frac{3.0 \text{ mL de reacción}}{0.009 \text{ mL suero}} = 333.33$$

Actividad Diaxozonasa = Δ Absorbancia x $0.375 \text{ } \mu\text{mol}$ x min x factor de dilución/ mL

Actividad Diazoxonasa = Δ Absorbancia x $125 \text{ } \mu\text{mol}$ x min mL

3.4.3 Extracción del ADN

El ADN genómico se obtuvo a partir de muestras de sangre. La extracción se realizó utilizando “Gentra Systems Puregene DNA Purification Kit” (Gentra Systems Inc.) y de acuerdo con el procedimiento descrito por el fabricante. Brevemente, el procedimiento consistió de los siguientes pasos: primero lisar las células rojas, seguido de lisar las células blancas, luego precipitar y descartar las proteínas, precipitar el ADN y por último hidratar el ADN.

La calidad y cantidad de ADN fue evaluada mediante electroforesis en gel de 1% agarosa en TBE 1X. El ADN fue visualizado mediante tinción con bromuro de etidio (1mg/mL) y luz UV.

3.4.4 Determinación de los polimorfismos

Los alelos presentes en cada individuo fueron determinados mediante PCR-RFLP lo cual consistió en la amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa y la posterior digestión con enzimas de restricción del producto de amplificación. El procedimiento utilizado para la determinación de los polimorfismos fue el descrito por Furlong. Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador GenAmp 2400 (Perkin-Elmer).

3.4.2.2 PCR: Polimorfismo 192 Q/R:

La PCR se llevó a cabo mediante el uso de cebadores específicos para amplificar un fragmento de 238 pb que comprende la región polimórfica de *PON1*. Los cebadores utilizados fueron 5'-TATTGTTGCTGTGGGACCTGAG-3' y 5'-GACATACTTGCCATCGGGTGAA-3'. Se utilizaron de 100-200 ng de ADN, 200 μ M de dNTPs, 1.5 mM de $MgCl_2$ 0.1 μ M de cada cebador, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 9.0 y 1 U de Taq polimerasa en un volumen final de 25 μ L. El termociclador fue programado a 96 °C por 5 minutos, luego 30 ciclos de 94 °C 1 minuto, 61 °C 1 minuto, 72 °C 1 minuto y una extensión final 10 minutos a 72 °C. Con el objetivo de confirmar la amplificación correcta del producto esperado, se realizó una electroforesis en gel de 3% agarosa en TBE 1X. (9)

3.4.2.3 Digestión del fragmento polimorfismo 192

Se utilizaron 15 μ L del producto amplificado en la reacción de digestión con la enzima *AlwI* (New England Biolabs). El volumen total de la reacción fue de 50 μ L y la digestión se realizó de acuerdo al procedimiento descrito por el fabricante. Los fragmentos digeridos fueron separados por electroforesis en gel de agarosa 3% en TBE 1X e

identificados mediante tinción con bromuro de etidio. Una banda de 238 pb identifica al alelo Q, mientras que el alelo R presenta un patrón de dos bandas, una de 172 pb y otra de 66 pb (9).

3.4.2.4 PCR: Polimorfismo -108 C/T

La PCR se llevo a cabo mediante la utilización de cebadores específicos para amplificar un fragmento de 119 bp de la región promotora del gen PON1. Los cebadores utilizados fueron 5'-GACCGCAAGCCACGCCTTCTGTGCACC-3', y 5'-TATATTTAATT GCAGCCGCAGCCCTGCTGGGGCAGCGCCGATTGGC-3'.

Se utilizaron de 100-200 ng de ADN, 200 μ M de dNTPs, 1.5 mM de MgCl₂, 0.1 μ M de cada cebador, 50 mM KCl, 10mM Tris-HCl pH 9.0, 1 U de taq polimerasa, en un volumen final de 25 μ L. El termociclador fue programado a 96 °C por 5 minutos, luego 25 ciclos de 94 °C 1 minuto, 63 °C 1 minuto, 72 °C 1 minuto y una extensión final de 10 minutos a 72 °C. Para confirmar la presencia del producto amplificado se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 3% y se reveló en bromuro de etidio (3).

3.4.2.5 Digestión del fragmento del polimorfismo -108

Se utilizaron 15 μ L del producto amplificado en la reacción de digestión con la enzima *Bst*UI (New England Biolabs). Los fragmentos digeridos fueron separados por electroforesis en gel de agarosa 3% en TBE 1X e identificados mediante tinción con bromuro de etidio. Una banda de 119 pb identifica al alelo T, mientras que el alelo C presenta un patrón de dos bandas, una de 52 pb y otra de 67 pb (3).

3.4.2.6 PCR: Polimorfismo 55 M/L

La PCR se realizó mediante la utilización de cebadores específicos para amplificar un fragmento de 172 pb de la región codificadora. Los cebadores utilizados fueron 5'-CCTGCAATAATATGAAACAACCTG-3' y 5'-TGAAAGACTTAAACTGCCAGTC-

3'. Se utilizaron de 100-200 ng de ADN, 200 μ M de dNTPs, 1.5 mM de $MgCl_2$, 0.1 μ M de cada cebador, 50 mM KCl, 10mM Tris-HCl pH 9.0, 1 U de taq polimerasa, en un volumen final de 20 μ L. El termociclador fue programado a 96°C por 5 minutos, luego 30 ciclos de 94°C 1 minuto, 63°C 1 minuto, 72°C 1 minuto y una extensión final de 72°C 10 minutos. Para confirmar la presencia del producto amplificado se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 3% y se reveló en bromuro de etidio (9).

3.4.2.7 Digestión del fragmento del polimorfismo 55

Se utilizaron 15 μ L del producto amplificado en la reacción de digestión con la enzima *NlaIII* de acuerdo con el procedimiento descrito por la casa comercial (New England Biolabs). Los fragmentos digeridos fueron separados por electroforesis en gel de agarosa 3% en TBE 1X e identificados mediante tinción con bromuro de etidio. Una banda de 172 pb identifica al alelo L, mientras que el alelo M presenta un patrón de dos bandas, una de 66 pb y otra de 106 pb (9).

3.5 Análisis estadístico

Con los datos obtenidos mediante el PCR-RFLP se utilizó el programa Epiinfo 3.3.2 para calcular las frecuencias genotípicas y alélicas de los tres polimorfismos, en la población total y en cada uno de los grupos raciales considerados en este estudio.

La prueba de bondad de ajuste de chi cuadrado fue utilizada para determinar si las diferencias observadas en las frecuencias genotípicas entre los grupos raciales estudiados eran estadísticamente significativas.

CAPITULO IV
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Resultados y discusión de los polimorfismos

En este estudio utilizamos la técnica PCR-RFLP para determinar los polimorfismos en la posición 55, -108 y 192 del gen *PONI* en cuatro de los principales grupos raciales de la población panameña. Este es el primer estudio del gen *PONI* que se realiza en la población panameña.

4.1.1. Polimorfismo *PONI* (192)

En la amplificación de *PONI* (192) obtuvimos una sola banda de 238 bp como tamaño esperado. El fragmento amplificado fue digerido con la enzima *AlwI*, observándose los resultados esperados para cada alelo. El alelo Q no posee sitios de restricción para la enzima *AlwI* por lo que, luego de la incubación con la enzima, no se observaron fragmentos de restricción, sólo el producto de amplificación de 238 bp. El alelo R posee un sitio de restricción para la enzima, por lo que el tratamiento del producto de amplificación con la enzima de restricción generó dos fragmentos, uno de 172 bp y otro de 66 bp característicos de este alelo. El genotipo de cada individuo para este polimorfismo fue determinado con base en los alelos que presentaba. Los individuos con genotipo QQ presentaron una sola banda de 238 bp; los homocigotos RR presentaron dos bandas (172 y 66 bp), mientras que en los heterocigotos QR se observaron tres bandas: la banda característica para el alelo Q (238 bp) y las dos bandas correspondientes al alelo R (172 y 66 bp) (Figura No.18). En este estudio no se observó el genotipo RR en los individuos pertenecientes al grupo blanco (Tabla No. 1).

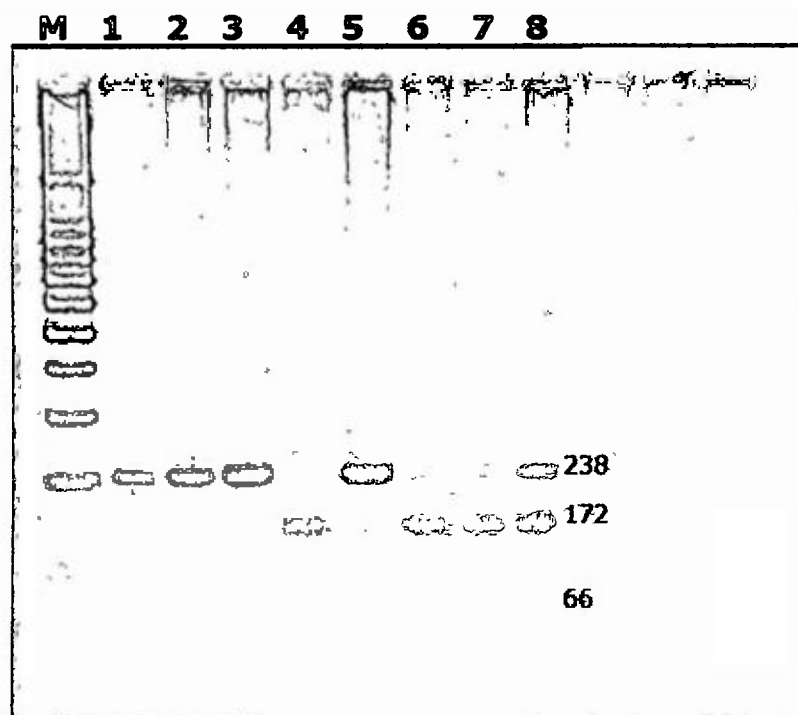


Figura No. 18. Productos de digestión de *PONI* (192) con la enzima *AlwI* para 8 muestras del grupo mestizo. M: marcador de peso molecular; carriles: 1-2 y 5-8 heterocigotos (QR); carril 3: homocigoto (QQ), carril 4: homocigoto (RR).

Setenta y ocho (78) individuos presentaron el genotipo QQ de *PONI* (192). Este genotipo se observó con mayor frecuencia en el grupo Ngöbé-Bugle (26/48). La frecuencia de QQ en los otros grupos raciales fue menor que la observada en los Ngöbé-Bugle (Tabla No. 1). Las frecuencias de QQ observadas en los diferentes grupos raciales fue comparada mediante la prueba de bondad de ajuste de chi cuadrado (χ^2). No se observaron diferencias estadísticamente significativas en las frecuencias QQ entre grupos raciales ($\chi^2 = 3.12$, $P = 0.05$).

El genotipo RR de *PONI* (192) fue determinado en 21 individuos que participaron en el estudio. Las frecuencias para este genotipo por grupo racial fueron: mestizos 10/49, negros 7/40, Ngöbé-Bugle 4/48 y blanco 0/49 (Tabla No. 1). Las frecuencias del grupo RR fueron comparadas entre grupos raciales mediante la prueba de bondad de ajuste de chi

cuadrado. Las frecuencias observadas fueron significativamente diferentes ($\chi^2 = 10.41$, $P = 0.01$). En el grupo racial mestizo se observó una mayor frecuencia para este genotipo, lo cual sugiere una mayor susceptibilidad genética de sufrir una intoxicación severa a la exposición con paratión debido a que este genotipo está asociado con una menor eficiencia en la hidrólisis de paraoxón. Sin embargo, la capacidad de hidrolizar sarín, somán y diazoxón es mayor en los individuos con este genotipo, según investigaciones realizadas por Costa et al. (2003).

4.1.2. Polimorfismo *PONI* (55)

En la región de *PONI* que contiene la posición 55 se logró amplificar una sola banda de 172 bp, la cual coincide con el tamaño esperado. La digestión con la enzima *NlaIII* generó los fragmentos de restricción característicos para cada uno de los alelos en este polimorfismo. El alelo L no posee sitios de restricción para la enzima *NlaIII* por lo que, luego de la incubación con la enzima, no se observaron fragmentos de restricción; sólo el producto de amplificación de 172 bp. El alelo M, posee un sitio de restricción para la enzima, por lo que luego de la digestión se generaron dos fragmentos: uno de 172 bp y otro de 66 bp, característicos de este alelo. El genotipo de cada individuo para este polimorfismo fue determinado con base en los alelos observados. Los individuos con genotipo LL presentaron una sola banda de 172 bp. Los heterocigotos LM presentaron tres bandas: la banda característica para el alelo L (172 bp) y las dos bandas correspondientes al alelo M (106 y 66 bp) (Figura No. 19). En este estudio no se observaron individuos con genotipo MM.

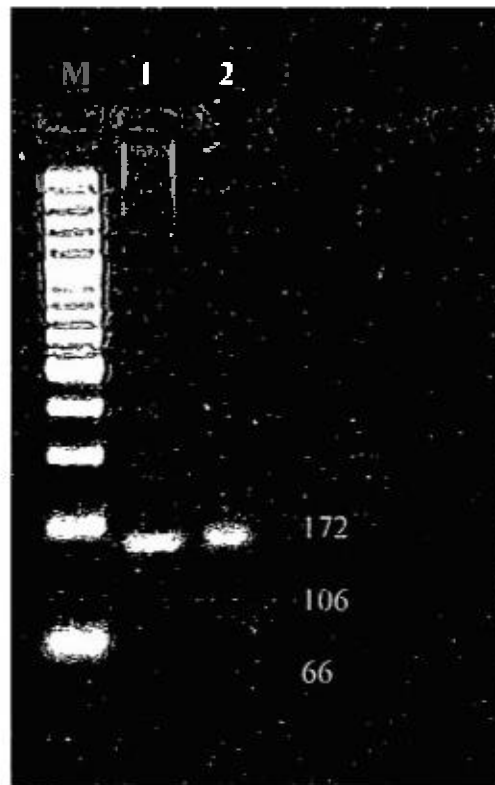


Figura 19. Productos de digestión *PON1* (55): Carril M: marcador de peso molecular; carril 1: homocigoto (LL); carril 2: heterocigoto (LM).

El genotipo LL de *PON1* (55) fue observado en 100 individuos estudiados. La frecuencia de este genotipo en los diferentes grupos raciales fue la siguiente: blancos 28/52, mestizos 29/48, negros 8/40 y Ngöbe-Bugle 35/36 (Tabla No. 1). El valor de χ^2 para las frecuencias de este genotipo entre grupos raciales fue de 16.2 $P = 0.001$, lo cual indica que las frecuencias observadas son estadísticamente significativas. El grupo Ngöbe-Bugle presentó la frecuencia más alta de este genotipo, el cual está asociado con altos niveles de enzima y, por ende, una mayor capacidad de metabolizar organofosforados (4).

4.1.3 Polimorfismo *PONI* (-108)

En la amplificación de la región que contiene el polimorfismo *PONI* (-108) se obtuvo una banda de 119 bp, la cual coincide con el tamaño esperados. Este fragmento fue digerido con la enzima *Bst*UI , observándose los resultados esperado para cada alelo. El alelo T no posee sitios de restricción para la enzima *Bst*UI por lo que, luego de la incubación con la enzima, no se observaron fragmentos de restricción; sólo el producto amplificación de 119 bp. El alelo C posee un sitio de restricción para la enzima, por lo que luego de la digestión se generaron dos fragmentos: uno de 67 bp y otro de 52 bp, característicos de este alelo. El genotipo de cada individuo para este polimorfismo fue determinado con base en los alelos presentes. Los individuos con genotipo TT presentaron una sola banda de 119 bp; los homocigotos CC presentaron dos bandas de 67 y 52 bp, mientras que en los heterocigotos CT se observaron tres bandas; la banda característica para el alelo T (119 bp) y las dos bandas correspondientes al alelo C (67 y 52 bp) (Figura No. 20).

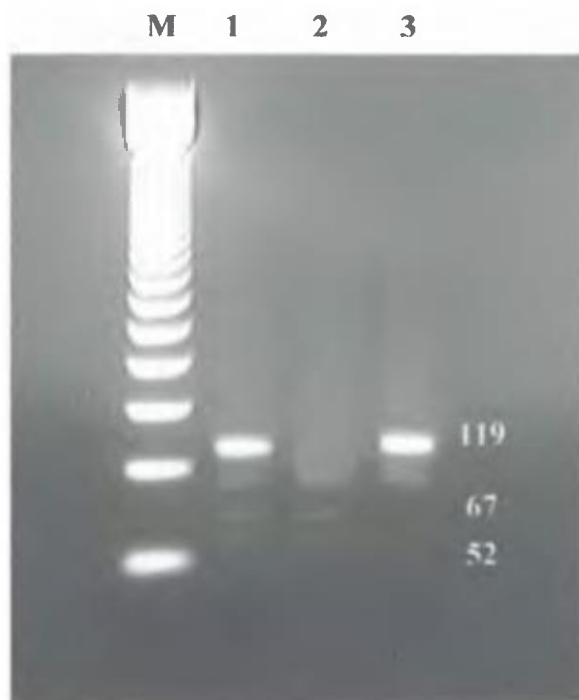


Figura No. 20. Producto de digestión *PONI* (-108): Carril M: marcador de peso molecular; Carril 1: heterocigoto (CT); carril 2: homocigoto CC; carril 3: homocigoto (TT).

Cincuenta y nueve (59) individuos presentaron genotipo TT. Las frecuencias del genotipo TT en los diferentes grupos raciales fue de 10/52 en blancos, 25/49 en mestizos, 8/39 en negro y 16/48 en Ngöbe-Bugle (Tabla No. 1). Se observaron diferencias altamente significativas en las frecuencias de este genotipo entre grupos raciales ($\chi^2 = 11.836$, $P=0.001$). Según estudios realizados por Leviev et al. (2000) el genotipo TT está asociado con un menor nivel enzimático. En el grupo mestizo se observó una mayor frecuencia para este genotipo.

Tabla No. 1: CANTIDAD DE INDIVIDUOS SEGÚN EL POLIMORFISMO

<i>PON1(192)</i>	Blanco	Mestizo	Negro	Ngöbe-Bugle	Total
QQ	17	16	19	26	78
QR	32	23	14	18	87
RR	0	10	7	4	21
<i>PON1(55)</i>	Blanco	Mestizo	Negro	Ngöbe-Bugle	Total
LL	28	29	8	35	100
LM	24	19	32	1	76
MM	0	0	0	0	0
<i>PON1(-108)</i>	Blanco	Mestizo	Negro	Ngöbe-Bugles	Total
CC	1	0	1	6	8
CT	41	24	30	26	121
TT	10	25	8	16	59

Fuente: este estudio

Con los datos obtenidos en la Tabla No. 1 se calcularon las frecuencias genóticas y las frecuencias alélicas para cada grupo utilizando el programa Epiinfo 3.3.2. Estos resultados se muestran en las Tablas No. 2 y No. 3.

Tabla No. 2: FRECUENCIA GENOTÍPICA EN POLIMORFISMOS DE *PONI*

<i>PONI</i> (-108)	Mestizo	Ngöbe-Bugle	Blanco	Negro	Total
CC	0	0.13	0.02	0.03	0.04
CT	0.49	0.54	0.79	0.77	0.64
TT	0.51	0.33	0.19	0.20	0.32
<i>PONI</i> (192)					
QQ	0.33	0.54	0.35	0.48	0.42
QR	0.47	0.38	0.65	0.35	0.47
RR	0.20	0.08	0	0.17	0.11
<i>PONI</i> (55)					
LL	0.60	0.97	0.54	0.20	0.57
LM	0.40	0.03	0.46	0.80	0.43
MM	0	0	0	0	0

Fuente: este estudio.

Tabla No. 3: FRECUENCIA ALÉLICA EN POLIMORFISMOS DE *PONI*

<i>PONI</i> (-108)	Mestizo	Ngöbe-Bugle	Blanco	Negro	Total
T	0.75	0.60	0.59	0.59	0.64
C	0.25	0.40	0.41	0.41	0.36
<i>PONI</i> (192)					
Q	0.67	0.56	0.65	0.73	0.65
R	0.33	0.44	0.35	0.27	0.35
<i>PONI</i> (55)					
L	0.77	0.80	0.60	0.99	0.78
M	0.23	0.20	0.40	0.01	0.22

Fuente: este estudio.

Prácticamente, el genotipo heterocigoto CT de *PONI* (-108) es el más frecuente en la población panameña, a juzgar por los cuatro grupos raciales estudiados (Tabla No. 2).

En relación con el polimorfismo *PONI* (192) observamos que la frecuencia genotípica QQ fue mayor para los grupos étnicos Ngöbé-Bugle y negro, mientras que la frecuencia genotípica QR fue mayor en los grupos de blancos y mestizos (Tabla No. 2).

Con respecto al polimorfismo *PONI* (55), el genotipo homocigoto LL presentó la mayor frecuencia para los grupos mestizos, Ngöbé-Bugle y blanco, e interesantemente, el grupo negro presentó una mayor frecuencia para el genotipo heterocigoto LM. Curiosamente, no se observó el genotipo homocigoto MM en los cuatro grupos estudiados de la población panameña.

Es importante resaltar el resultado obtenido para la población Ngöbé-Bugle. Tal como se observa en la Tabla No. 2, la frecuencia genotípica LL fue de 0.97 para este grupo. Existen diferencias entre nuestro resultado y el obtenido por Campos et al. (2004) en la población Siciliana donde encontraron una frecuencia de 0.42 para este genotipo. Campos et al. coincide con el estudio de Yan Lin Kao et al. (2006) en donde la frecuencia de LL fue de 0.50 en pacientes diabéticos con retinopatías pertenecientes a la población Australiana. Investigaciones llevadas a cabo por Furlong et al. (2001) han revelado que este genotipo está asociado con mayor nivel de la enzima *PONI*.

4.2. Comparación de los resultados de este estudio con otros estudios.

Las frecuencias alélicas totales de los polimorfismos 192, 55 y -108 de *PONI* de nuestra población fueron comparadas con frecuencias de otros grupos raciales mediante el programa EPIDAT.

A través de este análisis encontramos que la población panameña (Q 0.65) presenta diferencias estadísticamente significativas en la posición 192 de *PONI* con las siguientes poblaciones de América (28): afroamericana (Q 0.37), hispánica caribeña (Q 0.54),

costarricense (Q 0.76), mexicanas (0.51), afrobrazileñas (0.47), indias Cayapa (Q 0.21), pero interesantemente no encontramos diferencia significativa con las poblaciones chilena (Q 0.66) y peruana (Q 0.54). Al comparar con la población europea, solamente encontramos diferencias con la población francesa (Q 0.76). Con respecto a la población de Asia, la población panameña es diferente a la población de Japón (Q 0.40), China (Q 0.35) y la India (Q 0.82) (Tabla No.4 en anexo).

El análisis del polimorfismo de *PONI* (-108) muestra que nuestra población (C 0.36) es diferente a las poblaciones del Perú (C 0.61), Canadá (C 0.48), y a los afroamericanos (C 0.85) (28). (Tabla No. 4 en anexo), pero similar a la población mexicana (C 0.45).

En el análisis estadístico de las frecuencias alélicas de *PONI* (55) nos permite inferir que la población panameña (L 0.78) presenta diferencias estadísticamente significativas con respecto a los estudios realizado por Brophy et al. (2001) en la población caucásica de Estados Unidos (L 0.64) y con Hollard et al. 2006 en trabajadores agrícolas de origen hispánico de Estados Unidos (L 0.82) (Tabla No. 4 en anexo 2).

4.3 Resultados de la combinación de los tres polimorfismos en los cuatro grupos estudiados.

La Tabla No. 5 (Anexo) muestra la combinación de los tres polimorfismos agrupados por fenotipo. La combinación que se encuentra en mayor porcentaje en la población estudiada es 192: QR, -108: CT y 55: LL. Estudio realizado por Leviev et al. (2006) en una población del Hospital Universitario de Ginebra, Suiza mostraron una mayor frecuencia para la combinación QQ, CT y LM. El estudio de Campos et al. (2004) en la

población Siciliana mostró una mayor frecuencia para la combinación de las tres isoformas heterocigotas.

4.4 Análisis polimórfico mediante la determinación de dos actividades enzimáticas de *PONI*.

En este estudio determinamos dos actividades enzimáticas de *PONI* sérica pertenecientes a los grupos con fenotipo blanco y negro.

- **Actividad Arilesterasa:** se utilizó el fenilacetato como sustrato y se midió el aumento de absorbancia provocado por la liberación del fenol mediante un método cinético a 270 nm.
- **Actividad Diazoxonasa:** se utilizó el diazoxón como sustrato y se midió el aumento de absorbancia provocado por la liberación del pirimidinol a 270 nm por un método cinético.

Por medio del programa Epiinfo 3.3.2 se calculó el valor promedio, la desviación estándar y se determinaron los intervalos de las actividades enzimáticas, por genotipo, para cada polimorfismo de *PONI* (192, -108 y 55) y por fenotipo. Los resultados de la determinación de la actividad arilesterasa se muestran en la Tabla No. 6 y Figura. No. 21 (anexo 6). El análisis del estudio de estas actividades enzimáticas los dividimos en las siguientes tres partes:

4.4.1 Actividad arilesterasa o diazoxonasa según el polimorfismo:

El análisis estadístico de *PONI* 192 nos indica que no existe diferencia significativa entre las actividades arilesterasa de los grupos con fenotipos blanco y negro, con el genotipo QQ ni QR. El análisis para el genotipo RR no se realizó por falta de valores. Igual resultado fue encontrado al comparar la actividad diazoxonasa (Tabla No.7) (Figura. No. 22 en anexo6). Los resultados de la actividad arilesterasa corresponden con los trabajos realizados por Rojas et al. (2005) en la población mexicana.

El análisis estadístico para *PONI* (-108) sólo se pudo realizar para el genotipo CT, en el cual no encontramos diferencia significativa entre las actividades enzimáticas arilesterasa y diazoxonasa para los fenotipos blanco y negro.

Al estudiar los genotipos LL y LM de *PONI* (55) el análisis estadístico muestra que solamente hay diferencia estadística significativas entre la actividad arilesterasa para LM de los grupos blanco y negro $P = 0.003$, siendo la población negra la que presenta la mayor actividad enzimática.

El mayor valor de actividad arilesterasa encontrada en este estudio fue de 229.65 U/mL que corresponde a un individuo blanco con la combinación genotípica de QR, CT y LL

Tabla No. 6: ACTIVIDAD ARILESTERASA SEGÚN 3 POLIMORFISMO PON1

PON1 (192) BLANCO	Frecuencia	Promedio Actividad Ariesterasa U/mL	Rango	P
QQ	17	127.75 ± 27.14	85.85 – 171.08	0.90
QR	31	129.98 ± 35.80	48.10 – 229.65	0.67
RR	0	--	--	--
NEGRO				
QQ	18	129.07 ± 36.14	66.69 – 193.16	0.90
QR	14	125.33 ± 28.38	76.26 – 170.90	0.67
RR	7	133.76 ± 20.70	93.83 – 152.58	--

PON1 (-108) BLANCO	Frecuencia	Promedio Actividad Ariesterasa U/mL	Rango	P
CC	1	134.50	134.50	--
CT	40	129.63 ± 34.40	48.10 – 229.65	0.840
TT	0	--	--	--
NEGRO				
CC	1	93.83	93.83 – 93.83	--
CT	29	128.05 ± 31.10	66.69 – 186.07	0.840
TT	8	136.91 ± 30.35	103.40 – 193.16	--

PON1(55) BLANCO	Frecuencia	Promedio Actividad Ariesterasa U/mL	Rango	P
LL	28	138.97 ± 38.10	48.10 – 229.65	0.600
LM	23	111.38 ± 19.78	85.85 – 161.69	0.003
MM	0	--	--	--
NEGRO				
LL	8	130.60 ± 48.40	66.69 – 193.16	0.600
LM	31	131.09 ± 25.03	85.42 – 186.07	0.003
MM	0	--	--	--

Fuente: este estudio

Tabla No. 7: ACTIVIDAD DIAZOXONASA SEGÚN 3 POLIMORFISMOS *PONI*

PON1-192 BLANCO	Frecuencia	Promedio Actividad Diazoxonasa U/mL	Rango	<i>P</i>
QQ	17	11.44 ± 3.35	6.52 – 17.44	0.53
QR	31	10.03 ± 3.23	2.38 – 16.73	0.38
RR	0	--	--	--
NEGRO				
QQ	16	10.74 ± 3.03	4.28 – 15.48	0.53
QR	14	9.19 ± 2.23	5.83 – 13.25	0.38
RR	7	9.14 ± 1.60	6.81 – 11.80	--

PON1-108 BLANCO	Frecuencia	Promedio Actividad Diazoxonasa U/mL	Rango	<i>P</i>
CC	1	11.45	11.45	--
CT	40	10.53 ± 3.48	2.38 – 17.44	0.48
TT	10	9.89 ± 2.69	7.26 – 14.01	0.95
NEGRO				
CC	1	6.81	6.81	--
CT	29	9.98 ± 2.70	8.63 – 15.48	0.48
TT	8	9.96 ± 2.31	7.26 – 12.55	0.95

PON1-55 BLANCO	Frecuencia	Promedio Actividad Diazoxonasa U/mL	Rango	<i>P</i>
LL	28	11.68 ± 3.42	2.38 – 16.73	0.08
LM	23	8.83 ± 3.16	6.47 – 17.44	0.21
MM	0	--	--	--
NEGRO				
LL	7	9.03 ± 3.70	4.28 – 15.48	0.08
LM	30	9.79 ± 2.32	5.83 – 14.48	0.21
MM	0	--	--	--

Fuente: este estudio.

4.4.2 Actividad arilesterasa o diazoxonasa combinando los tres polimorfismos.

En nuestro análisis agrupamos los tres polimorfismos con el valor promedio de las actividades arilesterasa (Tabla No.8) y diazoxonasa (Tabla No. 9) para los fenotipos blanco y negro.

La actividad arilesterasa sólo presenta diferencias estadísticamente significativas entre los fenotipos blanco y negro cuando la combinación de polimorfismos para *PONI* es QQ TT LM.

Tabla No. 8. ACTIVIDAD ARILESTERASA U/mL EN LA POBLACIÓN BLANCA Y NEGRA SEGÚN LA COMBINACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS

Polimorfismos	Blanco		Negro		P
	n	Promedio actividad Arilesterasa U/mL	n	Promedio actividad Arilesterasa U/mL	
QQ CT LM	6	120.59 ± 20.00	12	135.46 ± 27.30	0.8382
QR CT LM	11	130.84 ± 16.84	7	127.79 ± 27.16	0.2273
QR CT LL	14	135.0 ± 48.08	2	95.48 ± 19.22	0.5419
QQ CT LL	6	142.09 ± 26.00	3	98.48 ± 44.72	0.3614
QR TT LM	3	110.45 ± 11.00	5	133.83 ± 21.83	0.7900
RR CT LM	0	---	4	135.86 ± 10.52	---
QQ TT LM	2	99.21 ± 13.36	2	116.48 ± 3.12	0.0098
QQ TT LL	2	147.48 ± 9.28	1	193.16	0.1250
RR CT LL	0	---	2	149.53 ± 3.03	---
QR TT LL	2	139.34 ± 3.60	0	---	---
QR CC LL	1	134.50	0	---	---

Fuente: este estudio

Al analizar los resultados de la Tabla No. 9 encontramos que no hay diferencias significativas entre la actividad diazoxonasa de individuos a los que se le determinaron los tres polimorfismos de *PONI*.

Tabla No. 9. ACTIVIDAD DIAZOXONASA U/mL EN LA POBLACIÓN BLANCA Y NEGRA SEGÚN LA COMBINACIÓN DE LOS TRES POLIMORFISMOS.

Polimorfismo	Blanco		Negro		P
	n	Promedio Actividad Diazoxonasa U/mL	N	Promedio Actividad Diazoxonasa U/mL	
QQ CT LM	6	11.33 ± 3.75	12	11.03 ± 2.40	0.2560
QR CT LM	11	10.95 ± 2.88	7	9.59 ± 1.69	0.7710
QR CT LL	14	10.08 ± 3.81	2	8.33 ± 1.79	0.2809
QQ CT LL	6	12.42 ± 2.53	3	9.88 ± 5.60	0.0993
QR TT LM	3	9.15 ± 0.96	5	9.53 ± 2.20	0.1550
RR CT LM	0	---	4	9.85 ± 1.40	---
QQ TT LM	2	6.89 ± 0.37	2	9.52	---
QQ TT LL	2	13.49 ± 0.52	1	12.55	---
RR CT LL	0	---	2	8.90 ± 0.12	---
QR TT LL	2	9.73 ± 2.65	0	---	---
QR CC LL	1	11.45	0	---	---

Fuente: este estudio

4.5 Actividades arilesterasa y diazoxonasa para determinar los genotipos de *PON1* (192).

Furlong et al. (2001) demostraron que graficando la actividad paraoxonasa versus cualquier otra actividad de *PON1* en muestras de suero, una determinada población se segrega en tres grupos que corresponden a los tres posibles polimorfismos para la posición *PON1*: QQ, QR, RR. Este método permite ahorrar tiempo y dinero, pues el análisis enzimático es mucho menos costoso que el análisis polimórfico por PCR-RFLP.

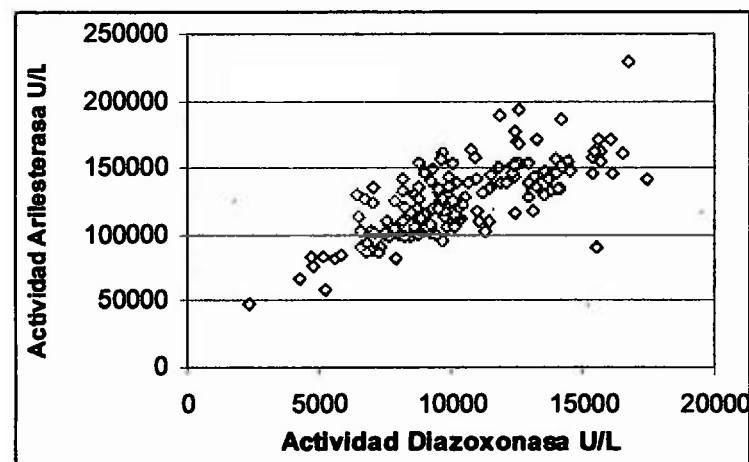
Con el propósito de explorar esta posibilidad, las actividades arilesterasa y diazoxonasa fueron medidas en 153 muestras de suero pertenecientes a los grupos blanco, negro y mestizo. Los valores en la Tabla No. 10 representan el promedio de dos determinaciones y el intervalo para cada actividad enzimática (Tabla No. 11 anexo 5). Los valores de la

Tabla No. 10 fueron utilizados para tratar de determinar los genotipos de *PONI* (192) mediante las siguientes dos formas:

4.5.1 Análisis enzimático bidimensional

Con los valores de las dos actividades enzimáticas para las 153 muestras se construyó el gráfico que se muestra en la Figura. 22. Este análisis enzimático bidimensional falló en segregar las muestras según el genotipo para *PONI* (192) debido probablemente a que la actividad arilesterasa es similar independientemente del polimorfismo *PONI* (192).

Actividad Arilesterasa U/mL versus Actividad Diazoxonasa U/mL en individuos panameños

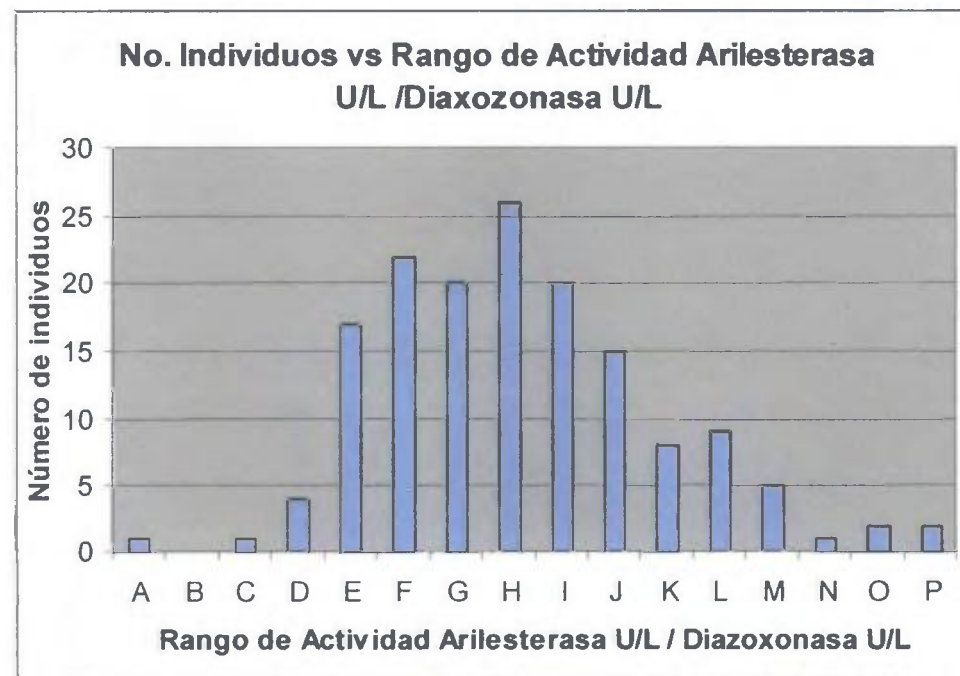


Fuente: esta investigación.

Figura 22: Actividad Arilesterasa versus actividad Diazoxonasa en 153 muestras de suero.

4.5.2 Análisis mediante el número de individuos y la relación de las actividades Arilesterasa/Diazoxonasa.

Los resultados de la dos actividades enzimáticas para las 153 muestras fueron utilizados para construir un segundo gráfico que relaciona los intervalos de actividad arilesterasa/ actividad diazoxonasa según el número de individuos (Tabla No. 10 en anexo 4). La gráfica se muestra en la Figura. No. 23. Tal como se muestra en la figura No. 23, este análisis generó un comportamiento unimodal que falla es segregar los diferentes genotipos *PONI*(192).



Fuente: esta investigación.

Figura. 23. Número de individuos versus el rango de la relación arilesterasa/diazoxonasa.

Ambos análisis no lograron diferenciar los genotipos para el polimorfismo *PONI* (192) debido, probablemente, a que las isoenzimas tienen actividades similares frente a estos dos sustratos.

CONCLUSIONES

- La frecuencia genotípica del *PON 1* en la población panameña para la posición 192 es $QQ = 0.42$, $QR = 0.47$ y $RR = 0.11$; para la posición 55, la frecuencia es $LL = 0.57$, $LM = 0.43$ y $MM = 0$, y para la posición -108 la frecuencia es $CC = 0.04$, $CT = 0.64$ y $TT = 0.32$.
- Las frecuencias alélicas del gen *PONI* en la población panameña son $Q = 0.65$, $R = 0.35$, $L = 0.78$, $M = 0.22$, $T = 0.64$ y $C = 0.36$.
- Con base en estos resultados, podemos concluir que la población panameña presenta un mayor factor protector contra el riesgo de desarrollar enfermedades aterogénicas debido a las altas frecuencias de dos alelos, Q y L, relacionados con productos de elevada actividad hidrolítica, en comparación con la alta frecuencia del alelo T relacionado con menores niveles plasmáticos de *PONI*.
- La baja frecuencia de los alelos R y la alta frecuencia del alelo T nos permite concluir que la población panameña presenta un mayor riesgo de sufrir una intoxicación con compuestos organofosforados.
- La actividad arilesterasa promedio fue de 126.17 U/mL y la actividad diazoxonasa fue de 10.26 U/mL en la población panameña. No se presentaron diferencias significativas al evaluar las actividades de ambas enzimas según el genotipo de los

tres polimorfismos estudiados debido, probablemente a que estas actividades son independientes del genotipo.

- Los valores de las actividades arilesterasa y diazoxonasa no pueden ser utilizados para determinar los genotipos del polimorfismo de *PONI* (192) mediante un análisis enzimático bidimensional.

RECOMENDACIÓN

- Realizar futuras investigaciones que permitan determinar la actividad y el genotipo del gen *PONI* en individuos de la población con predisposición genética a desarrollar eventos aterogénicos o que se dedican a labores agrícolas que involucren la utilización cotidiana de compuestos organofosforados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA

1. Rodríguez, F.; Rodríguez, J. **Sinergismo genético entre dos genes involucrados en la respuesta antioxidante. Demostración genética y fenotípica “El gen de la Paraoxonasa y el gen SRB1”.** *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 2005.
2. Informe Epidemiológico de Intoxicación por plaguicidas.2002. Ministerio de Salud de la República de Panamá.
3. Brophy, V.; Jampsa, J.; Clendenning, J.; Mckinstry, G.; Furlong, C. **Effects of 5' Regulatory-Region Polymorphisms on Paraoxonase-Gene (*PON1*) Expression.** *Am. J. Hum Genet.* 2001; 68; 1428-1436.
4. Costa, L.; Cole, T.; Jarvik, G.; Furlong, C. **Functional Genomics of the Paraoxonase (*PON1*) Polymorphisms: Effects on Pesticide Sensitivity, Cardiovascular and Drug Metabolism.** *Ann. Rev. Med.* 2003. 54: 371-392.
5. Aviram M.; Rosenblat, M. **Paraoxonase and cardiovascular diseases: pharmacological and nutritional influences.** *Current Opinion in Lipidology*. August 2005; 14: 393-399.
6. Harel, M.; Aharoni, A., Gaidukov, L.; Brumshtein, B.; Khersonsky, O.; Meged, R.; Dvir, H.; Ravelli, R.; McCarthy, A.; Toker, L.; Sussman, J.; Tawfik, D. **Structure and evolution of the paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes.** *Nature Structural & Molecular Biology*. 2004; vol. 11, num. 5: 412-419.
7. Rojas-García, A.; Solís-Heredia, M. **Genetic polymorphisms and activity of *PON1* in a Mexican population.** *Toxicology and Applied Pharmacology* 2005;205; 282-289.
8. Leviev, I; James, R. **Promoter polymorphisms of human paraoxonase *PON1* gene and serum paraoxonase activities and concentrations.** *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2000;20:516-521.
9. Campo, S.; Sardo, M.; Trimarch, G.; Bonaiuto, M.; Fontana, L.; Castaldo, M.; Bonaiuto, A.; Saitta, C.; Bitto, A.; Manduca, B.; Riggio, S.; Saitta, A. **Association between serum paraoxonase (*PON1*) gene promoter T(-107)C polymorphism, *PON1* activity and HDL levels in healthy Sicilian octogenarians.** *Experimental Gerontology*. 2004; 39; 1089-1094.

10. Watson AD, Berliner JA, Hama SY. **Productive effect of high density lipoprotein associated paraoxonase. Inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein.** *Journal Clin Invest* 1995; 96: 2882-2891.
11. Mackness B.; Durrington, P.; Boulton, A.; Hine, D.; Mackeness, M. **Polymorphisms of paraoxonase genes and low-density lipoprotein lipid peroxidation.** *Lancet* 1999; 353: 468-469.
12. Aviram, M.; Hardak, E.. **Human serum paraoxonase (PON1) Q and R selectively decrease lipid peroxides in human coronary and carotid atherosclerotic lesions. PON1 esterase and peroxidase like activities.** *Circulation* 2000; 101; 2510-2517.
13. Deakin, S.; James, R. **Genetic and environmental factors modulating serum concentrations and activities of the antioxidant enzyme paraoxonase-1.** *Clinical Science.* 2004, 107; 435-447.
14. Pérez, Oscar. **Lipoproteínas de alta densidad (HDL). Un objetivo terapéutico en la prevención de la aterosclerosis.** *Arch Cardiol. Méx.* 2004; 74 (1), 53-67.
15. Tomás, M. **Función Antioxidante de las HDL: Un Paradigma en la Aterosclerosis.** *Esp. Card.* 2004; 57: 557-569.
16. Boemi, M.; Siriolla, C.; Testa, R.; Fumelli, P.; James, RW. **Smoking is associated with reduced serum levels of the antioxidant enzyme paraoxonase in type 2 diabetic patients.** *Diabetic Medical* 2004 May; 21 (5): 427-7.
17. De Wikipedia, the free encyclopedia. Wikipedia. Org/wiki/sarin.
18. Leary, K.; Edwards, R.. **Genetic and other sources of variation in the activity of serum paraoxonase/diazoxonase in humans: consequences for risk from exposure to diazinon.** *Pharmacogenetics and Genomics.* 2005, 15: 51-60.
19. Ribas Serra, Vicent. **Estudio de la propiedades antiaterogénicas de las HDL de ratones transgénicos de apo A-II humana.** Marzo 2005. Barcelona. [http : // www.tdx.cesca.es](http://www.tdx.cesca.es).
20. Aviram, M.; Rosenblat, M. **The lipid research laboratory, technion faculty of medicina,** *Free Radical Biology & Medicine* 2004; 37: 1304 –1316.
21. Ordoñez LL., J.; Blanco V., F. **Las HDL ricas en Apo A-II no pueden inhibir la oxidación del LDL en ratones.** *Endocrinología.* 2004; 95:789-797.

22. Rosenblat, M.; Grunfeld, O.; Hayek, T.; Aviram, M. **Serum paraoxonase activity and extent of lipid peroxidation are not affected by increased levels of human apolipoprotein A-I: studies in transgenic mice.** *Clin. Chem. Lab. Med.* 2003; 40 (1): 9-14. 16.
23. Protocol Gentra Puregene (DNA Purification System)
24. Furlong, C.; Richter, R.; Seidel, S.; Motulsky, A. **Role of genetic polymorphism of human plasma paraoxonase/ arylesterase in hydrolysis of the insecticide metabolites clorpyrifosoxon and paraoxon.** *Am. J. Hum. Genet.* 1988; 43: 230-238.
25. Draganov, D. I.; La Du, B.N. **Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review.** *Pharmacology* 2004; 369: 78-88.
26. Sambrook, J.; Russell, D. **Molecular cloning a laboratory manual.** Third edition, Volumen 1 CSHL Press, 2001. U.S.A.
27. Ferré N.; Camps, J.; Joven, J. **Paraoxonasas, acción antioxidante de la HDL y respuesta inflamatoria.** *Cardiovascular Risk Factors* 2004;13: 2,106-114.
28. Cataño, H.; Cuevas, J.; Cárdenas, A.; Izaguirre, V.; Zavaleta, A.; Carranza, E.; Hernández, A. **Distribution of Paraoxonase-1 Gene Polymorphisms and Enzyme Activity in a Peruvian Population.** *Environmetal and Molecular Mutagenesis* 2006 47:699-706.
29. Holland, N.; Furlong, C.; Bastaki, M.; Richter, R.; Bradman, A.; Huen, K.; Beckman, K.; Eskernazi, B. **Paraoxonase Polymorphisms, Haplotypes, and Enzyme Activity in Latino Mothers and Newborns.** *Environmental Health. Perspectives* 2006 114; 7: 985-991.
30. Kao, Y.; Donaghue, K. . **A variant of Paraoxonase (PON1) gene is associated with Diabetic Retinopathy in IDDM.** *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* 2006; 83; 7: 2589-2592.
31. Takeshi, K.; Tomoichiro, O.; Ishihara, M.; Egashira, T.; Fujioka, T.; Saito, E.; Saito, S.; Miller, N.; Hattori H. **A sandwich enzyme linked immunosorbent assay for human serum paraoxonase concentration.** *Journal of lipid research.* August 2004:1358–1363.
32. Tanja, W.; Cadellas, M. **High oxidative stress in patients with stable coronary Herat disease.** *Atherosclerosis* 2003:168; 99 – 106.

ANEXOS

ANEXO 1: MATERIALES Y REACTIVOS:**Materiales para la extracción de sangre**

- Alcohol
- Algodón
- Jeringuillas 21GX1½
- Tubos de plasma
- Tubos para suero
- Marcador
- Plumas
- Torniquete

Reactivos para determinar las actividades Arilesterasa y Diazoxonasa

- Suero
- Tris (trishidroxiaminometano) 200 mM, pH 8: pesar 1.21 gramos de tris disolver en 40 mL de agua, ajustar el pH con HCl 6.N y aforar hasta 50 mL con agua.
- Cloruro de calcio 9 mM: disolver 0.99 gramos de cloruro de calcio en agua y a aforar a un litro.
- Diazoxón 100 mM: agregar 3.26 mL de metanol en un tubo que contiene 0.1g de diazoxón 97%.
- Fenilacetato 10 mM: agregar 127 µL de fenilacetato en un matraz de 100 mL, aforar con agua y agitar hasta disolver.
- Mezcla de reacción para la determinación de la actividad Arilesterasa
 - 300 µL fenilacetato 10 mM
 - 300 µL Tris 200 mM
 - 300 µL cloruro de calcio 9 mM
 - 30 µL suero diluido
 - 2070 µL agua
- Mezcla de reacción para la determinación de la actividad Diazoxonasa
 - 30 µL diazoxón 100 mM
 - 750 µL Tris 200 mM
 - 30 µL cloruro de calcio 100 mM
 - 30 µL suero diluido

- 2160 μL agua

Reactivos para la extracción de ADN: kit de Gentra Systems Puregene.

Preparación de Cebadores: se debe utilizar guantes, centrifugar el vial antes de abrirlo y agregar la cantidad indicada de TE (tris- EDTA) según el cebador.

Reactivos para la electroforesis:

- Gel de agarosa 3% para muestras amplificada y digeridas: pesar 1.2 gramos de agarosa, agregar 40 mL de TBE 0.5X, calentar hasta disolver; cuando disminuye la temperatura agregar en el molde y colocar el peine.
- Muestras: ADN extraído, fragmento de ADN amplificado, fragmento de ADN digerido.
- Marcadores de peso de 100 pb y de 50 pb: Fermenta.
- Bromuro de etidio 10 mg/dL: después de terminada la electroforesis, colocar el gel de agarosa en una solución que contenga 2 μL de bromuro de etidio en 100 mL de agua durante 30 minutos y luego lava durante 20 minutos en agua destilada.

Reactivos para determinar el polimorfismo *PONI*(-108)

- | PCR | Digestión |
|---|--------------------------------|
| • dNTPs 10 mM | • Buffer 2X |
| • MgCl_2 25 mM | • Enzima: <i>Bst</i> UI |
| • Buffer 10X | • Fragmento amplificado de ADN |
| • Agua | |
| • Taq | |
| • ADN (1:1) | |
| • Cebadores: | |
| 1: 5'- GACCGCAAGCCACGCCTTCTGTGCACC-3' | |
| 2: 5'-TATATTTAATTGCAGCCGCAGCCCTGCTGGGGCAGCG | |
| CCGATTGGC-3' | |

Reactivos para determinar el polimorfismo *PONI*(192)

PCR	Digestión
<ul style="list-style-type: none"> • DNTPs 10 mM • MgCl₂ 25 mM • Buffer 10X • ADN • Agua • Taq polimerasa • Cebadores <ul style="list-style-type: none"> ○ 1: 5'-TATTGTTGCTGTGGGAC CTGAG-3' ○ 2: 5'-GACATACTTGCCATCGGGTGAA-3' 	<ul style="list-style-type: none"> • Buffer 4X • Enzima: • Fragmento amplificado de ADN

Reactivos para determinar el polimorfismo *PONI*(55)

PCR	Digestión
<ul style="list-style-type: none"> • dNTPs 10 mM • MgCl₂ 25 mM • Buffer 10X • Agua • Taq • ADN (1:1) • Cebadores: <ul style="list-style-type: none"> 1: 5'-CCTGCAATAATATGAAACAACCTG-3' 2: 5'- TGAAAGACTTAAACTGCCAGTC-3'. 	<ul style="list-style-type: none"> • Buffer 4X • Enzima: <i>NlaIII</i> • Fragmento amplificado de ADN • BSA 100mg/dL

Instrumentos

- Centrífuga refrigerada IEC Centra MP4R.
- Centrífuga 5410 para tubos ependorf
- Congelador -20°C Forma Scientific
- Vortex Heidolph
- Transiluminador UV Vilber Lourmat
- Espectrofotómetro: SHIMATZU con baño de recirculación a 25°C
- Pipetas
- Microonda LG
- Nevera 4°C P-Selecta Climalow L
- Baño Thelco Modelo 83. 25°, 37° y 60°C
- Termociclador GenAmp 2400 Perkin-Elmer
- Fuente de poder EC-135
- Cámara de electroforesis 370 FBS
- Cámara de flujo laminar Telstar AV-100
- Micropipetas ependorf
- Balanza COBOS A-230-CSI
- Plato caliente con agitador Barnant Co. Modelo 700-5011
- Volumétricos
- Medidor de pH Crison GLP-24

ANEXO 2: TABLA No. 4. COMPARACIÓN DE LAS FRECUENCIAS DE LOS ALELOS DE *PONI* 192, -108 Y 55 OBTENIDAS EN DIFERENTES ESTUDIO

Población o lugar	<i>PONI</i> 192			<i>PONI</i> -108		
	Q	R	<i>P</i>	C	T	<i>P</i>
Panamá ^a n=186	0.65	0.35	n=188	0.36	0.64	
Afroamericano ^b n=117	0.370	0.63	< 0.0001	0.85	0.15	< 0.0001
Hispánicos-caribeños ^b n=203	0.540	0.46	0.0378	0.65	0.35	< 0.0001
Costa Rica ^b n=518	0.757	0.243	0.0070	---	---	---
Perú ^b n=89	0.539	0.461	0.1000	0.613	0.388	0.0001
México ^b n=214	0.510	0.490	0.006	0.45	0.55	0.0955
Canadá ^b n=865	---	---	---	0.48	0.52	0.0042
Afrobrazileños ^b n=70	0.471	0.529	0.0137	---	---	---
Cayapa ^b n= 83	0.211	0.789	< 0.0001	---	---	---
Francia ^b n= 125	0.765	0.235	0.037	---	---	---
Japón ^b n=132	0.402	0.591	< 0.0001	0.48	0.52	0.0507
China ^b n=475	0.352	0.648	< 0.0001	---	---	---
India ^b n=80	0.82	0.17	0.0126	--	--	--
<i>PONI</i> 55	L	M	<i>P</i>			
Panamá ^a n=176	0.78	0.22				
México ^c n=214	0.84	0.16	0.1472			
Washington ^d EU n=376	0.64	0.36	0.0017			
California ^e EU n=260	0.82	0.18	0.0353			

Fuente: este estudio.

El valor de p se determinó comparando la frecuencia alélica de este estudio con las frecuencias de otras poblaciones mediante el programa de EPIDAT.

^aEste estudio

^bCataño et al 2006

^cRojas et al 2005

^dBrophy et al 2001

^eHolland et al 2006

ANEXO 3:

Tabla No. 5: CANTIDAD DE INDIVIDUOS CON POLIMORFISMOS *PONI*

POLIMORFISMOS	BLANCOS	NEGROS	NGOBE- BUGLE	MESTIZOS	TOTAL
QQ CT LL	6	3	10	1	20
QQ CC LL	0	0	1	0	1
QQ CT LM	6	12	0	4	20
QQ TT LL	2	1	6	3	12
QQ TT LM	2	2	0	4	8
QR CC LL	1	0	0	0	1
QR CT LL	14	2	5	8	29
QR CT LM	11	7	1	1	20
QR TT LL	2	0	5	4	11
QR TT LM	3	4	0	6	13
RR CC LM	0	0	1	0	1
RR CT LL	0	2	2	4	8
RR CT LM	0	4	0	2	6
RR TT LL	0	0	2	2	4
RR TT LM	0	0	0	1	1
TOTAL	47	37	33	40	157

Fuente: esta investigación.

ANEXO 4:
Tabla No. 10. ACTIVIDADES ARILESTERASA Y DIAZOXONASA EN 153
MUESTRAS DE SUERO

Arilesterasa	Diazoxonasa	Aeasa/Doasa	No.individuos	Rango
U/L	U/L			
115267	9005	12.80	1	5.81-6.71
82442	7875	10.47	0	6.72-7.61
101370	9250	10.96	1	7.62-8.51
99036	7500	13.20	4	8.52-9.41
				9.42-
117557	13124	8.96	17	10.31
113360	9750	11.63	22	10.32-11.21
141985	11000	12.91	20	11.22-12.11
128000	10500	12.19	26	12.12-13.01
106107	9874	10.75	20	13.02-13.91
112210	10374	10.82	15	13.92-14.81
160305	16500	9.72	8	14.82-15.71
90076	15500	5.81	9	15.72-16.61
160960	9719	16.56	5	16.62-17.51
81906	5597	14.63	1	17.52-18.41
76565	4777	16.03	2	18.42-19.31
102805	7609	13.51	2	19.32-20.21
83751	5132	16.32		
131350	9531	13.78		
109905	7564	14.53		
88511	6998	12.65		
139640	9244	15.11		
90982	6624	13.74		
100900	8025	12.57		
135015	11490	11.75		
117665	10953	10.74		
145310	15343	9.47		
99741	8018	12.44		
158055	15377	10.28		
137850	11887	11.60		
142840	13194	10.83		
115925	12409	9.34		
152955	12570	12.17		
145825	16100	9.06		
109810	10291	10.67		
105895	8859	11.95		
120370	8294	14.51		
110255	11411	9.66		
152575	8779	17.38		
142160	9935	14.31		
93830	6814	13.77		
169400	12483	13.57		

121500	10483	11.59
103400	7001	14.77
86100	6852	12.57
152600	10044	15.19
146600	14512	10.10
99409	9468	10.50
140735	17441	8.07
117755	9762	12.06
171075	15617	10.95
156765	14009	11.19
138195	12973	10.65
125650	7845	16.02
119560	9351	12.79
125110	9584	13.05
105785	9057	11.68
145290	13982	10.39
229650	16732	13.73
135200	13292	10.17
142920	12393	11.53
57685	5244	11.00
125880	6708	18.77
98660	8454	11.67
99692	8773	11.36
142160	9935	14.31
134500	11454	11.74
93827	6814	13.77
169400	12483	13.57
121500	10483	11.59
161690	15660	10.33
144200	11509	12.53
103400	7001	14.77
86100	6852	12.57
109800	11085	9.91
152900	12979	11.78
138700	10714	12.95
131700	13774	9.56
156700	9621	16.29
164200	10775	15.24
158300	10898	14.53
170900	13248	12.90
119600	9523	12.56
155000	14477	10.71
158300	10898	14.53
168700	12592	13.40
125900	9725	12.95
147220	13560	10.86
83400	4733	17.62
132600	8192	16.19
134800	8803	15.31
186075	14181	13.12
91300	7311	12.49

151505	12311	12.31
118510	8749	13.55
127740	12957	9.86
123190	10042	12.27
140995	13690	10.30
148455	9302	15.96
111530	8721	12.79
140945	8154	17.29
155345	15708	9.89
95973	9668	9.93
145110	12371	11.73
139075	12138	11.46
48103	2384	20.18
151975	12462	12.20
129665	8668	14.96
176490	12411	14.22
102210	6576	15.54
188250	11840	15.90
126645	8792	14.40
138870	10257	13.54
129275	6472	19.97
134525	14140	9.51
113657	10253	11.09
98863	7664	12.90
102410	11257	9.10
104815	7867	13.32
98005	8287	11.83
135540	9970	13.59
171365	16062	10.67
107065	9230	11.60
133965	9519	14.07
104890	8621	12.17
131090	11195	11.71
130435	13448	9.70
85848	7266	11.82
123125	7064	17.43
112570	6525	17.25
193155	12549	15.39
161735	15480	10.45
106130	8624	12.31
85418	5835	14.64
115860	8484	13.66
105715	10126	10.44
66685	4280	15.58
146500	9027	16.23
135735	7080	19.17
110595	8148	13.57
101573	7534	13.48
100727	7090	14.21
111375	8830	12.61
129715	13585	9.55

para que en los centros educativos oficiales se cubra la planta de docentes capacitados para la enseñanza del idioma inglés que se requiera en el primer y segundo nivel de enseñanza.

Artículo 16. Esta Ley comenzará a regir desde su promulgación y deroga cualquier disposición que le sea contraria

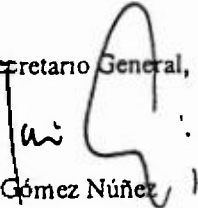
COMUNÍQUESE Y CÚMPLASE.

Aprobada en tercer debate, en el Palacio Justo Arosemena, ciudad de Panamá, a los 26 días del mes de noviembre del año dos mil dos.

El Presidente,


Carlos R. Alvarado A.

El Secretario General,


José Gómez Núñez