

TESI DOCTORAL

**Factors genètics, ambientals i les seves  
interaccions com a determinants de l'efecte  
protector de la Paraoxonasa1 en la malaltia  
cardiovascular.**

Marta Tomás i Mestres

2003

Dipòsit legal: B.36320-2003  
ISBN: 84-688-3013-5

Departament de Ciències Experimentals i de la Salut  
Programa de Doctorat en Ciències de la Salut i de la Vida  
Universitat Pompeu Fabra (UPF)

**Factors genètics, ambientals i les seves interaccions  
com a determinants de l'efecte protector de la  
Paraoxonasa1 en la malaltia cardiovascular.**

Memòria presentada per la Marta Tomás i Mestres per optar a títol de doctor per la Universitat Pompeu Fabra. Treball realitzat sota la direcció de Mariano Sentí i Clapés, en la Unitat de Lípids i Epidemiologia Cardiovascular (ULEC), de l'Institut Municipal d'Investigació Mèdica (IMIM). Programa de Doctorat de la Universitat Pompeu Fabra, bienni 1999-2001.

Signatura del director de tesi  
(Dr. Mariano Sentí)

Signatura de la doctoranda  
(Marta Tomás i Mestres)



## **AGRAÏMENTS**

Voldria expressar el meu agraïment a totes les persones amb qui he treballat i conviscut aquests anys inicials de la vida investigadora, sense la col·laboració de les quals hagués estat totalment impossible realitzar aquesta tesi. En especial, dono les gràcies a :

El Mariano Sentí, director de tesi, per la confiança dipositada en mi ja des del principi, per ser pacient i escoltar les meves teories per explicar els resultats i fer-me tocar de peus a terra després, el seu interès en que jo participés en congressos sobre l'aterosclerosi i realitzés estades o cursos fora del centre i, sobretot, el conduir-me a col·laborar en l'elaboració dels manuscrits i posteriorment també en la seva redacció. També voldria agrair-li el fet d'entendre que el programa de doctorat de la UPF implica considerables hores de treball després de les classes (per altra banda profitoses, al meu entendre).

El Jaume Marrugat, cap de la Unitat de Lípids i Epidemiologia Cardiovascular (ULEC), per brindar-me la possibilitat de treballar en el seu grup, pel seu constant optimisme i capacitat d'engrescar al personal, pel seu rigor en el treball i per les grans dots pedagògiques, a nivell científic i també humà.

El Roberto Elosua per confiar en mi i convidar-me, juntament amb el Lluís Molina, a participar en l'estudi Robertitos i treballar-hi tant activament, per l'enorme i costosa tasca que realitza en gairebé tots els estudis de la unitat, per la bona predisposició a donar un cop de mà en tot moment. En fi, per la gran qualitat humana i científica.

La Maribel Covas per la bona relació a tots nivells, i més encara des de Estocolm.

Els estadístics del grup, Joan Vila, Marco Pavesi i Josep M<sup>a</sup> Manresa, per la seva voluntat didàctica i per recordar-me sempre que el factor humà és el més important.

El Roger i la Glòria per la seva empenta i rigor en el treball de laboratori, bàsic en la recerca del nostre grup grup. La Montse i la Sílvia per la feinada que comporta la implementació de nous mètodes en el Cobas i el seu manteniment, en absolut senzill. La Teresa, sobretot per l'eficiència amb el RefMan. El Dave per l'assessorament informàtic tan disposat i efectiu i, juntament a la Stephanie, per les correccions de l'anglès. Tots ells i la resta de les persones de la unitat, del Despatx dels Grans Becaris (Helena, Susanna, Helmut, Miguel Ángel), de les Olives (Montse, Tanja, Mercedes, Dani i Yolanda), d'enquestes (Marta, Carolina i Natalia), els que han marxat (Miguel i Clara) i del Hospital Josep Trueta de Girona (Joan Sala, Rafel Masià, Izabela, Isabel i demés components del grup REGICOR a Girona) pel extraordinari clima de treball i relació personal aconseguits.

El John Lyo i els seus amics per ampliar els meus horitzons.

Els membres del departament CEXS-UPF (del grup de Biologia Evolutiva i del grup de Canals Iònics) i als Serveis per la gran voluntat de col·laboració.

Els membres de la companyia de teatre La IMIMitable per fer-me passar moments tan divertits sobre un escenari.

Els generosos participants dels estudis, sense els quals cap d'ells hagués estat factible.

L'institució de l'IMIM i les grans persones que el componen. Agraixo també l'ajut donat per l'Institut per l'enquadració d'aquesta tesi, així com els ajuts per estades a l'estranger i les beques anuals que, juntament al Instituto de Salud Carlos III, em van ser concedides. Respecte a aquestes últimes, confio que aviat esdevindran contractes pels investigadors en formació.

Els meus amics de BQ (Charo, Neus, Jordi i Anna) i els de tota la vida (Gluri i Joan) per ser-hi en tot moment. Al Xavi haig d'agrair-li especialment l'ajut en la confecció final del present manuscrit.

La meva família i al Xavi, per tot el que m'ensenyen cada dia i el seu inestimable suport.

# ÍNDEX

## 0. Acrònims

|   |          |
|---|----------|
| <b>1. Introducció</b>   | <b>1</b> |
| 1.1 Malaltia cardiovascular   | 1        |
| 1.2 Paradoxa del sud del Mediterrani  | 2        |
| 1.3 Fisiopatologia de l'arteriosclerosi   | 5        |
| 1.4 Lipoproteïnes d'alta densitat (HDL), els seus enzims i l'arteriosclerosi                    | 6        |
| 1.4.1 El transport revers de colesterol de les cèl·lules perifèriques al fetge                  | 7        |
| 1.4.2 Propietats antioxidants i antiinflamatòries de la HDL                                     | 10       |
| 1.5 La paraoxonasa1 (PON1)  | 12       |
| 1.5.1 Inicis  | 13       |
| 1.5.2 El gen PON1   | 14       |
| 1.5.2.1 El polimorfisme PON1-192  | 14       |
| 1.5.2.2 El polimorfisme PON1-55   | 16       |
| 1.5.2.3 Els polimorfismes descrits recentment   | 17       |
| 1.5.2.4 Altres gens de la família de les PON.   | 18       |
| 1.5.2.4.1 El gen PON2   | 18       |
| 1.5.2.4.2 El gen PON3   | 19       |
| 1.5.3 Activitats enzimàtiques de la PON1  | 19       |
| 1.5.3.1 Activitat paraoxonasa (respecte paraoxó)  | 20       |
| 1.5.3.2 Activitat arilesterasa (respecte fenilacetat)   | 22       |
| 1.5.3.3 Activitat lactonasa (respecte lactones)   | 23       |
| 1.5.3.4 Activitat antioxidant (de protecció contra l'oxidació de les LDL) i relació amb les HDL | 24       |
| 1.5.4 Comparació de les activitats enzimàtiques de la PON1                                      | 29       |
| 1.5.4.1 Expressió gènica  | 29       |
| 1.5.4.2 Genotips de PON1-192  | 29       |
| 1.5.4.3 Genotips de PON1-55   | 31       |
| 1.5.4.4 Dependència a la Cys283   | 32       |
| 1.5.4.5 Dependència al Ca <sup>2+</sup>   | 32       |
| 1.5.4.6 Inhibició de les activitats   | 32       |
| 1.5.4.7 Altres factors que modifiquen l'activitat de la PON1                                    | 33       |
| 1.6 Patologia orgànica relacionada amb la PON1  | 34       |
| 1.6.1 Malalties cardiovasculars (CHD)   | 34       |
| 1.6.2 Hipercolesterolèmia familiar (HF)   | 39       |
| 1.6.2.1 Perfil lipídic  | 40       |
| 1.6.2.2 Fàrmacs hipolipemians   | 42       |
| 1.6.3 Diabetis  | 45       |
| 1.6.4 Malalties neuronals   | 48       |
| 1.6.5 Insuficiència renal   | 49       |
| 1.7 Factors ambientals relacionats amb la PON1  | 50       |
| 1.7.1 Activitat física  | 50       |
| 1.7.1.1 Activitat física regular  | 50       |
| 1.7.1.2 Activitat física aguda  | 51       |
| 1.7.2 Dieta   | 52       |
| 1.7.3 Tabaquisme  | 56       |
| 1.7.4 Edat  | 57       |
| 1.7.5 Estrògens   | 58       |
| 1.7.6 Resposta inflamatòria   | 59       |

|  |            |
|--|------------|
| <b>2. Objectius</b>  | <b>61</b>  |
| <b>3. Mètodes</b>  | <b>63</b>  |
| 3.1 Subjectes i intervenció                                    | 63         |
| 3.2 Anàlisi de l'activitat paraoxonasa (respecte paraoxó)      | 64         |
| 3.3 Anàlisi de l'activitat arilesterasa (respecte fenilacetat) | 67         |
| 3.4 Determinació dels polimorfismes PON1-192 i PON1-55         | 71         |
| 3.5 Anàlisi de lípids, lipoproteïnes i apoproteïnes            | 72         |
| 3.6 Anàlisi de TBARS   | 72         |
| 3.7 Anàlisi de LDL oxidada                                     | 72         |
| 3.8 Ajustament per canvis de volum plasmàtic                   | 72         |
| 3.9 Obtenció de dades antropomètriques i qüestionaris          | 72         |
| 3.10 Anàlisi estadística                                       | 73         |
| <b>4. Resultats</b>  | <b>75</b>  |
| 4.1 Capítol I  | 77         |
| 4.2 Capítol II   | 87         |
| 4.3 Capítol III  | 97         |
| <b>5. Discussió</b>  | <b>107</b> |
| 5.1 Capítol I  | 107        |
| 5.2 Capítol II   | 110        |
| 5.3 Capítol III  | 114        |
| <b>6. Conclusions</b>  | <b>119</b> |
| 6.1 Capítol I  | 119        |
| 6.2 Capítol II   | 119        |
| 6.3 Capítol III  | 119        |
| <b>7. Annex</b>  | <b>121</b> |
| <b>8. Bibliografia i adreces electròniques</b>                 | <b>139</b> |



# **0. Acrònims**



## **0. ACRÒNIMS**

|                 |  |
|-----------------|--|
| 8-OHdG:         | 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina   |
| ABCA1:          | <i>ATP-binding cassette subfamily A, member 1</i>                        |
| AFCAPS/TexCAPS: | <i>Air Force / Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study</i>       |
| Apo:            | Apoproteïna  |
| CARE:           | <i>The Cholesterol and Recurrent Events</i>                              |
| CETP:           | <i>Cholesterol ester transfer protein</i>                                |
| c-HDL:          | Colesterol-HDL   |
| CI:             | Cardiopatia isquèmica  |
| c-LDL:          | Colesterol-LDL   |
| CV:             | Coeficients de variació  |
| CHD:            | <i>Coronary heart diseases / Malalties cardiovasculars</i>               |
| EC:             | Èsters de colesterol   |
| HDL:            | <i>High density lipoprotein / Lipoproteïna d'alta densitat</i>           |
| HL:             | <i>Hepatic lipase / Lipasa hepàtica</i>                                  |
| HMG-CoA:        | 3-hidroximetilglutaril-Coenzim A   |
| IAM :           | Infart agut de miocardi  |
| IC95%           | Interval de confiança del 95%  |
| IDDM:           | Diabetis mellitus tipus I  |
| IL-6:           | Interleucina-6   |
| IMC:            | Índex de massa corporal  |
| LDL:            | <i>Low density lipoprotein / Lipoproteïna de baixa densitat</i>          |
| LIPID:          | <i>Long-term Intervention with Pravastatin in Ischemic Disease Study</i> |
| LPL:            | <i>Lipoprotein lipase</i>  |
| MANOVA:         | Anàlisi de la variança multivariant                                      |
| MUFA:           | Àcids grassos monoinsaturats   |
| NIDDM:          | Diabetis mellitus tipus II   |
| OLAB:           | <i>oxidized-LDL antibodies</i>   |
| OR:             | <i>odds ratio</i>  |
| oxPAPC:         | 1-palmitoil-2-araquidonil-sn-glicero-3-fosforilcolina oxidada            |

|                    |  |
|--------------------|--|
| PAF :              | <i>Platelet Activating Factor</i> / Factor activador de plaquetes  |
| PAF-AH:            | PAF-acetilhidrolasa  |
| PAI-1:             | Inhibidor de l'activador del plasminogen   |
| PCR :              | Reacció en cadena de la polimerasa   |
| PEIPC:             | 1-palmitoil-2-(5,6-epoxiisoprostà E2)-sn-glicero-3-fosforilcolina  |
| PGE-2:             | Prostaglandina E-2   |
| PGI <sub>2</sub> : | Prostaciclina  |
| PGPC:              | 1-palmitoil-2-glutaroil-sn-glicero-3-fosforilcolina  |
| PhAc :             | Fenilacetat  |
| PHMB:              | P-hidroximercuribenzoat  |
| PON1:              | Paraoxonasa1   |
| POVPC:             | 1-palmitoil-2-(5)oxovaleroil-sn-glicero-3-fosforilcolina   |
| PPAR alfa:         | <i>Peroxisome proliferator-activated receptors alpha</i> /<br>Receptors activats per proliferadors peroxisomals alfa |
| PUFA:              | Àcids grassos poliinsaturats   |
| REGICOR:           | Registre Gironí del Cor  |
| RHT:               | <i>Replacement hormone therapy</i> / Teràpia hormonal substitutòria  |
| SFA :              | Àcids grassos saturats   |
| SR-BI:             | <i>Scavenger receptor class B type I</i>   |
| TBARS:             | <i>Thiobarbituric Acid Reactive Substances</i>   |
| TG:                | Triglicèrids   |
| VLDL:              | <i>Very low density lipoprotein</i> / Lipoproteïnes de molt baixa densitat   |
| WOSCOPS:           | <i>The West of Scotland Coronary Prevention Study</i>  |

# **1. Introducció**



## 1. INTRODUCCIÓ

### 1.1 Malaltia cardiovascular (CHD)

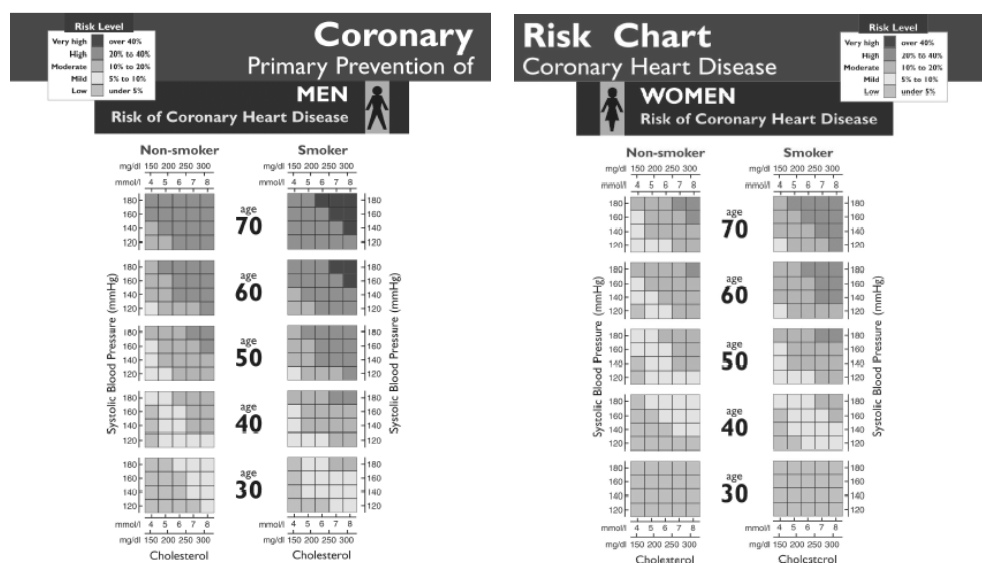
Les malalties cardiovasculars (*coronary heart diseases, CHD*) es poden classificar en quatre grups: a) les malalties cerebrovasculars, directament relacionades amb la hipertensió; b) arteriopatia perifèrica, que és la manifestació perifèrica de l'arteriosclerosi; c) cardiopatia reumàtica, d'incidència baixa actualment en els països desenvolupats, però encara la cardiopatia més freqüent en els països subdesenvolupats; i d) cardiopatia isquèmica (CI), la principal causa de mort en els països desenvolupats en l'actualitat. L'arteriosclerosi és la base etiopatogènica de la CI.

Les CHD esdevenen la primera causa de mortalitat en els països desenvolupats a mitjans del segle XX <sup>1;2</sup>. Això és degut a que les mesures higièniques, vacunes i antibiòtics pal·lien en gran mesura els efectes de les malalties infeccioses, de manera que l'esperança de vida en néixer supera els 50 anys.

L'any 1932 es realitza el primer estudi on s'analitza la relació entre les diferències geogràfiques de freqüència de CI i les diferències en la dieta, especialment el seu contingut en greix <sup>3</sup>. El 1953, el *Seven Countries Study* observa per primera vegada la relació que hi ha entre les diferències geogràfiques i la concentració plasmàtica de colesterol en l'aparició de la CI <sup>4</sup>. Basant-se en els resultats d'aquest estudi, el 1970 es demostra que el risc de presentar una CI està relacionat amb el colesterol plasmàtic i amb la proporció de calories de la dieta provinents d'àcids grassos saturats <sup>5-12</sup>.

Els primers estudis prospectius van servir per identificar factors relacionats amb un major risc de presentar una CI: *Cooperative Study on Lipoproteins* <sup>13</sup>, *Minnesota Business men study* <sup>14</sup> i l'estudi de Framingham <sup>15</sup>. El 1956 ja s'identifiquen els tres factors de risc principals: colesterol plasmàtic elevat, la hipertensió arterial i l'hàbit tabàquic <sup>16</sup>. Aquests factors de risc més el sexe s'utilitzen actualment per construir les taules de risc en prevenció primària i secundària (vegeu taules següents extretes de <sup>17</sup>).

Actualment les CHD ocasionen entre el 12 y el 45% de totes les defuncions en els països industrialitzats <sup>18</sup>.



Les manifestacions clíniques de la CI són l'àngor, l'infart agut de miocardi (IAM) i la mort sobtada. L'IAM és produït per una isquèmia miocàrdica, que és un dèficit d'oxigen com a conseqüència d'un desequilibri entre les necessitats i l'aportació d'oxigen d'un segment de la massa muscular del cor. Generalment aquesta situació és conseqüència de l'arteriosclerosi coronària, procés arterial obstructiu fonamental en l'etiopatogènia de la CI.

La incidència de IAM en una regió geogràfica es determina mitjançant registres poblacionals, que en utilitzar un disseny comú permeten la comparació entre diferents zones geogràfiques. La incidència d'IAM a Catalunya es descriu en 2 estudis:

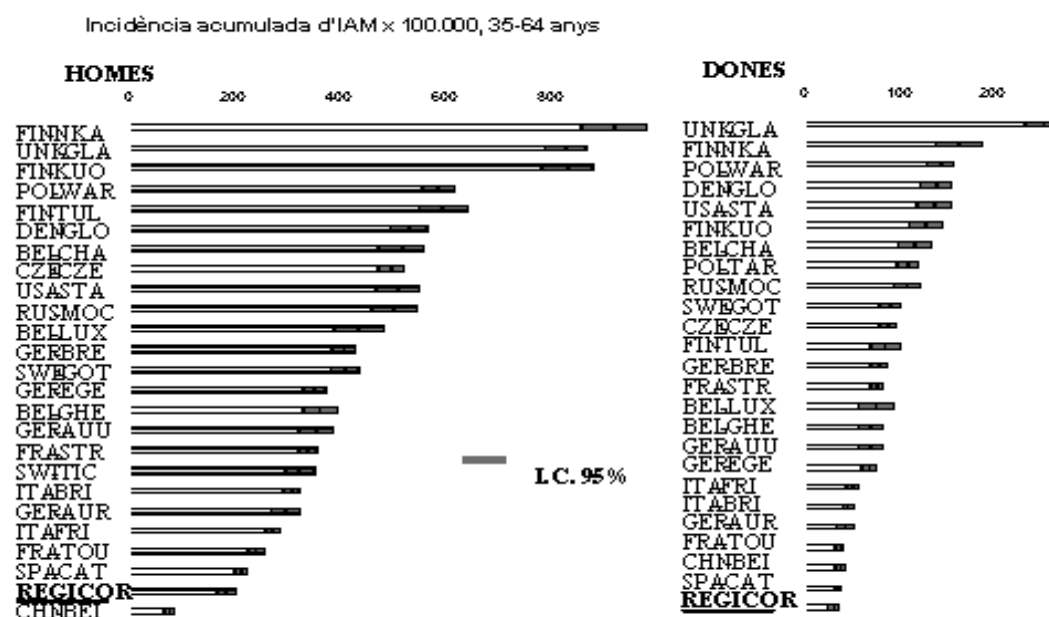
OMS-MONICA-Catalunya realitzat entre 1985-94<sup>19</sup> i REGICOR (registre gironí del cor) realitzat entre 1990-2<sup>20</sup>.

Les taxes d'incidència acumulada (casos nous més casos recorrents) estandarditzada per edat, entre 35 i 74 anys, i per 100.000 habitants, que es descriuen són de 210 en homes i 34 en dones en el MONICA-Catalunya, i de 200 homes i 31 dones en el REGICOR.

## 1.2 Paradoxa del sud del Mediterrani

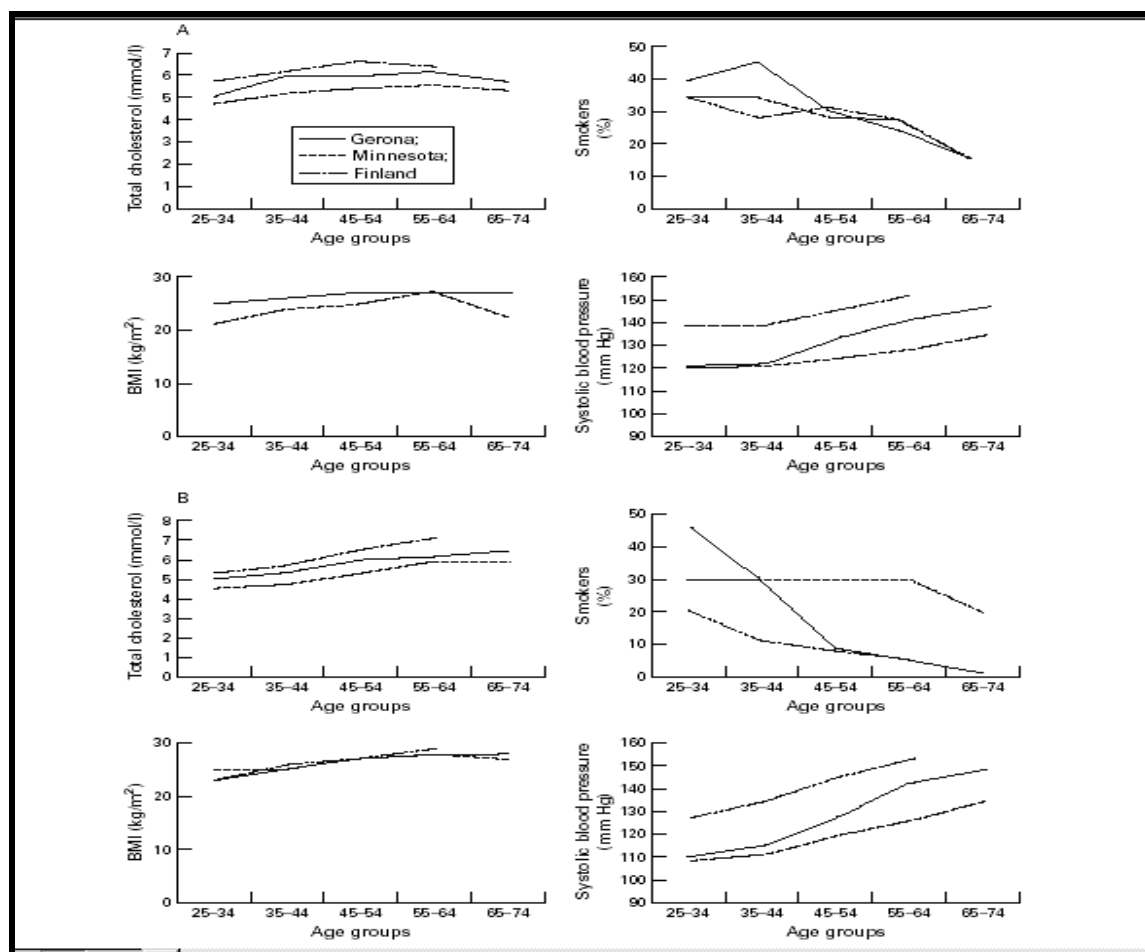
Segons les dades dels estudis MONICA i REGICOR, la incidència de IAM a Catalunya és inferior a la dels països del nord d'Europa, Estats Units o Austràlia<sup>21-23</sup> i similars a la d'altres països mediterranis industrialitzats<sup>24;25</sup>. Vegeu gràfiques següents extretes de<sup>19;20</sup>.





El 1993 es descriu la “paradoxa francesa”, que en síntesi, consisteix en la presència d’una baixa incidència de CHD a França, malgrat una dieta elevada en colesterol i greixos saturats en aquest país <sup>26</sup>. D’una manera semblant es pot descriure una paradoxa en d’altres països del sud d’Europa, com Espanya, on es troba una baixa incidència d’IAM juntament amb una elevada prevalença dels clàssics factors de risc de CHD. Per exemple, la incidència d’IAM a Minnesota és tres cops superior a la de Girona, com es pot observar en la taula següent, tot i que la prevalença de factors de risc cardiovascular és més gran a Girona que a Minnesota. Vegeu figura següent extreta de <sup>27</sup>

| Incidència d’IAM acumulada<br>x100.000 |       |       |
|--|-------|-------|
|  | Homes | Dones |
| Girona                                 | 207   | 48    |
| Minnesota                              | 613   | 203   |
| Finlàndia                              | 915   | 165   |

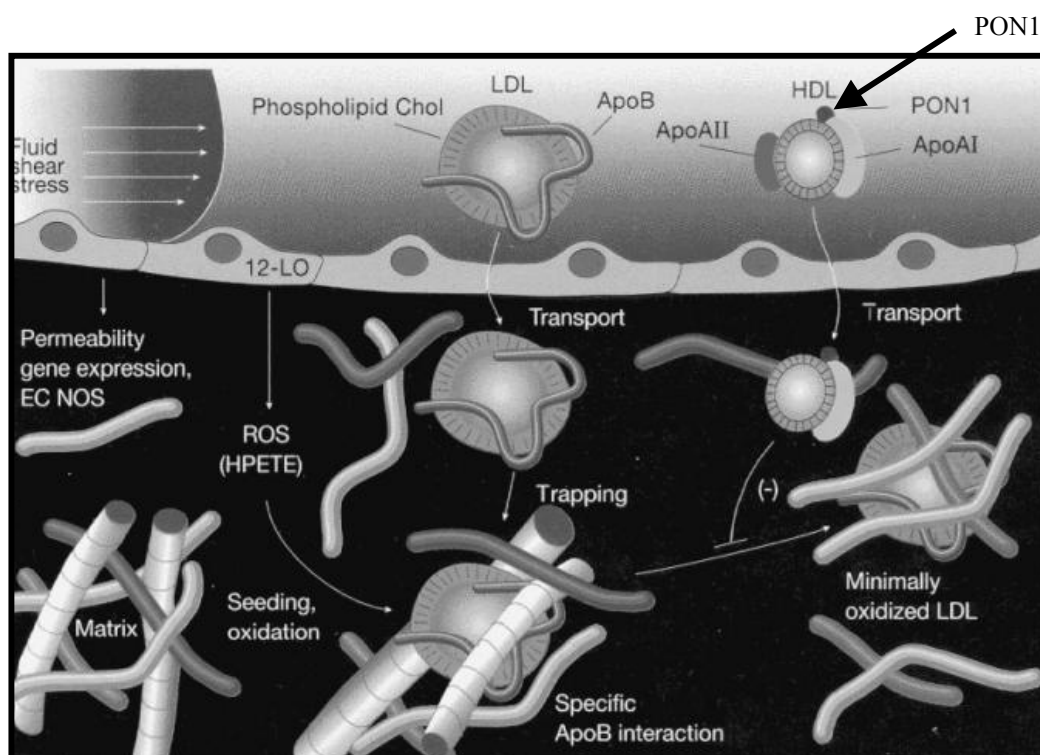


En algun cas, s'ha explicat aquesta paradoxa per un elevat consum de fruita i peix <sup>28</sup>. El nivell elevat del colesterol contingut en les lipoproteïnes d'alta densitat (HDL) es descrit àmpliament com un factor protector contra les CHD en estudis epidemiològics realitzats arreu del món, on l'increment de 1mg/dl del colesterol-HDL (c-HDL) s'associa a una disminució de la mortalitat cardiovascular del 1-3.6% <sup>29;30</sup>. Malgrat que la concentració de HDL en el nostre medi és similar a la d'altres zones geogràfiques amb molt més elevada incidència de CHD <sup>31</sup>, es pot hipotetitzar que la HDL en la nostra població pot tenir la seva capacitat protectora incrementada per mecanismes qualitius. Un determinant de la composició qualitativa de la HDL és l'enzim Paraoxonasal (PON1), responsable de l'activitat antioxidant de la HDL. Així doncs, factors ambientals (dieta, activitat física, tractament amb fàrmacs, etc.) i també factors genètics relacionats amb la PON1, poden modular la composició quantitativa i qualitativa de la lipoproteïna i, consegüentment, contribuir a protegir de CHD al nostre medi.

### 1.3 Fisiopatologia de l'arteriosclerosi

L'arteriosclerosi ha estat definida per Ross <sup>32</sup> com una malaltia inflamatòria caracteritzada per una disfunció endotelial, causada per diferents agents (LDL oxidades, radicals lliures, homocisteïna, microorganismes, etc.). En condicions normals, l'arteriosclerosi és un mecanisme de defensa de la paret arterial contra les agressions que consisteix en la formació de lesions fibroadiposes o fibroses que precedeixen o acompanyen als processos inflamatoris <sup>33</sup> i que poden provocar disfunció endotelial. Aquestes agressions no són un fet aïllat o esporàdic en condicions com la hipercolesterolèmia, la hipertensió i el tabaquisme, que constitueixen processos d'agressió permanents <sup>33</sup>. Per altra banda, el desenvolupament de l'aterosclerosi està fortament lligat a l'estrès oxidatiu <sup>34</sup>.

La fisiopatologia del procés arterioscleròtic comença amb l'acumulació de lipoproteïnes a la paret endotelial i de proteoglicans a la superfície endotelial, on s'hi uneixen monòcits i limfòcits T circulants. Vegeu figura següent extreta de <sup>35</sup>.



Aquestes cèl·lules migren a l'espai subendotelial per acció de les substàncies quimiotàctiques, produïdes per cèl·lules endotelials, leucòcits i cèl·lules del múscul llis <sup>36</sup>. Els limfòcits T i els monòcits diferenciats a macròfags rics en colesterol (cèl·lules escumoses), formen inicialment les estries grasses en l'íntima de la paret arterial. Si se segueix desenvolupant la lesió, cèl·lules musculars llises migren de la media a la íntima i proliferen formant plaques grasses que rodegen una acumulació extracel·lular de lípids en presència de macròfags rics en greixos. El següent estadi és el de placa fibrosa, que es caracteritza per l'aparició d'una càpsula de teixit fibrós i muscular que creix cap a la llum arterial produint una obstrucció del flux sanguini. La ruptura o fissura de la placa fibrosa pot produir una hemorràgia a la placa, trombosi i, secundàriament, oclusió de l'artèria que produeixi una isquèmia del teixit irrigat per aquest vas sanguini, amb risc de necrosi si es manté durant un temps suficient <sup>36</sup>.

Dels agents que contribueixen a l'arteriosclerosi, l'oxidació de les LDL sembla tenir un paper important, independentment de l'efecte deleteri de la seva concentració absoluta <sup>37,38</sup>. Les LDL oxidades poden 1) produir una agressió sobre l'endoteli, 2) augmentar l'adherència de monòcits i limfòcits T a la paret endotelial, i la posterior migració cap a l'espai subendotelial (agent quimiotàctic per monòcits i limfòcits T), 3) activar la diferenciació de monòcits a macròfags, que posteriorment acumularan LDL oxidades a través dels receptors *scavenger* fins convertir-se en cèl·lules escumoses, i 4) activar la producció local de factors de creixement, citocines i mediadors inflamatoris secretats pels macròfags, que potencien la proliferació de les cèl·lules musculars llises.

#### **1.4 Lipoproteïnes d'alta densitat (HDL), els seus enzims i l'arteriosclerosi**

El 1975 es descriu per primer cop l'associació entre el c-HDL i la CI <sup>39</sup>. Varis estudis de cohort confirmen la relació entre el baix nivell de c-HDL i l'elevat risc de CHD, independentment del c-LDL. Entre ells, el *Framingham Heart Study* <sup>40</sup>, i el *Honolulu Heart study* <sup>41</sup>. Posteriorment, dos assaigs clínics de prevenció primària amb fàrmacs hipolipemiants, el *Helsinki Heart Study* <sup>42</sup>, amb gemfibrozil, i el *Lipid Research Clinics Primary Prevention Trial*, amb colestiramina <sup>43</sup>, demostren que un increment de c-HDL disminueix l'incidència d'esdeveniments de CHD, independentment de la disminució del c-LDL. Un increment d'1 mg/dl de c-HDL suposa una disminució d'entre el 1-3.6 % de mortalitat per CHD i d'un 3.7% de presentar un IAM fatal <sup>44</sup>.

A part de les evidències epidemiològiques, experiments amb animals també donen suport a la idea de que la HDL exerceix una funció protectora contra la CHD pròpia d'aquesta lipoproteïna. S'ha observat que els nivells de HDL dels animals d'experimentació es correlacionen inversament amb el desenvolupament de l'arteriosclerosi <sup>45,46</sup> i que quan, *in vivo*, s'eleva els nivells de HDL, s'aconsegueix una regressió de la lesió <sup>47</sup>.

A més, pacients amb alteracions genètiques que provoquen nivells de HDL disminuïts, acostumen a desenvolupar arteriosclerosi prematura i CI <sup>48-50</sup>. Exemples de deficiència de HDL de base genètica són les mutacions en el gen *ApoA1*, la malaltia de Tangier, la deficiència de LCAT, i la malaltia de l'ull de peix (*fish-eye disease*).

S'han descrit dos mecanismes principals pels quals les HDL poden exercir aquesta funció protectora.

#### **1.4.1-El transport revers de colesterol de les cèl·lules perifèriques al fetge**

LA HDL és la lipoproteïna responsable del transport revers de colesterol de les cèl·lules perifèriques al fetge, és a dir, promou la sortida de colesterol de cèl·lules, com podrien ser els macròfags o les cèl·lules que formen la paret vascular, i el transporta fins als hepatòcits <sup>51,52</sup>. S'ha descrit que l'oxidació de HDL redueix la seva capacitat per promoure l'eflux de colesterol de diverses cèl·lules <sup>53-57</sup>.

En aquesta funció hi tenen un paper principal les següents proteïnes:

**Apo (apoproteïna) AI:** L'apoAI promou l'eflux de colesterol de les cèl·lules. L'apoAI és la principal apoproteïna de les HDL <sup>58</sup> i actua com a cofactor de l'enzim LCAT, i també uneix a l'enzim PON1.

La sobreexpressió d'apoAI en animals d'experimentació, inhibeix la progressió de les lesions <sup>59-61</sup>.

En humans, els nivells de ApoAI, estan inversament relacionats amb el risc de CHD <sup>44,62</sup>.

A més de promoure l'eflux de colesterol de les cèl·lules, l'apoAI també envia colesterol a les cèl·lules, sense que la partícula de HDL sigui captada ni degradada. En els teixits esteroïdogenics aquest mecanisme aporta el 90% de colesterol necessari i els animals *knock-out* pel gen de l'apoAI són incapaços d'acumular èsters de colesterol (EC) en cèl·lules esteroïdogeniques <sup>63</sup>.

Els gens de 3 apoproteïnes formen el cluster *ApoA1-CIII-AIV*, de manera que els gens de *apoA1* i *apoCIII* estan col·locats en posició cua-cua <sup>64</sup>.

**ABCA1 (ATP-binding cassette subfamily A, member 1):** L'ABCA1 és un transportador localitzat en la membrana citoplasmàtica i aparell de Golgi de cèl·lules perifèriques. És dependent d'AMPc i té la funció de transportar colesterol cel·lular cap a l'apoA1 lliure de lípids, per formar HDL. Per tant és una proteïna implicada en el transport revers de colesterol <sup>65;66</sup>. S'ha especulat que més que activitat de canal, l'ABCA1 tingui una funció de proteïna reguladora o que necessiti d'altres proteïnes per tenir una funció completa <sup>67</sup>.

En pacients amb hipoalfalipoproteinèmia tipus 1 (malaltia de Tangier) i tipus 2, portadors de mutacions en el gen *ABCA1* <sup>65;68;69</sup>, s'ha descrit una deficiència de l'eflux de colesterol cel·lular i un hipercatabolisme subseqüent d'apoA1 que dona lloc a nivells baixos de HDL. Mutacions en el gen *ABCA1* s'associen a un eflux del colesterol cel·lular anormal i nivells de c-HDL propers a zero, i a deposició massiva d'èsters de colesterol en els teixits, hepatoesplenomegàlia, neuropatia perifèrica, i CHD prematura. L'eflux de colesterol dels macròfags està danyat en els pacients amb malaltia de Tangier la qual cosa dona lloc a l'acumulació massiva de cèl·lules escumoses.

**LCAT (EC 2.3.1.43) (lecitin:colesterol acil transferasa):** El colesterol lliure de les HDL es troba a la superfície de la lipoproteïna i en esterificar-se passa al seu nucli <sup>70</sup>. La LCAT catalitza aquesta esterificació de colesterol lliure en les HDL, transferint l'àcid gras de la posició *sn*-2 del fosfolípid fosfatidilcolina al grup hidroxil del colesterol generant-se liso-fosfatidilcolina <sup>71</sup>. La LCAT s'activa per l'apoA1, sent factors clau la conformació i càrrega de l'apoproteïna <sup>72</sup>. La liso-fosfatidilcolina generada és pro-aterogènica, ja que es pot transferir a l'endoteli i allí inhibir l'alliberament de NO <sup>73;74</sup>. La LCAT és considerat un enzim clau en el transport revers de colesterol <sup>75</sup>. A més, la LCAT pot hidrolitzar i transesterificar factor activador de plaquetes i així inactivar-lo, o fosfatidilcolina truncada (polar) generada durant la oxidació de les lipoproteïnes <sup>76-78</sup>. De fet, en condicions d'estrès oxidatiu, la LCAT perd la capacitat d'esterificar colesterol lliure i en canvi s'estimula l'activitat d'esterificació de liso-fosfatidilcolina usant fosfatidilcolines oxidades amb àcids grassos curts <sup>77</sup>.

**SR-BI (Scavenger receptor class B type I):** El receptor SR-BI és responsable de la captació selectiva d'EC de les HDL <sup>79</sup> per part del fetge, dels teixits esteroidegènics (gònades, glàndules adrenals) <sup>80;81</sup> i dels macròfags <sup>82</sup>. Les HDL no són captades com una partícula sencera per la cèl·lula, sinó que el seu colesterol, però no la proteïna, és selectivament enviat a la cèl·lula <sup>79</sup>. El SR-BI també sembla estar involucrat en l'eflux de colesterol de les cèl·lules cap a les lipoproteïnes <sup>83;84</sup>. S'expressa en els macròfags i pot reconèixer LDL natives i LDL modificades <sup>82</sup>.

**ApoAIV:** L'apoAIV està associada a la HDL, però pot ser fàcilment dissociada de la lipoproteïna mitjançant ultracentrifugació <sup>85</sup>. Quan està en forma de liposomes, l'apoAIV promou tan bé com l'apoAI o l'apoE l'eflux de colesterol de fibroblasts <sup>86</sup>, adipòcits <sup>87</sup>, macròfags i cèl·lules musculars llises <sup>88</sup>. Els animals transgènics que sobreexpressen apoAIV presenten una certa protecció contra el desenvolupament de lesions arterioscleròtiques induïdes per la dieta <sup>89</sup>.

**ApoAII:** L'apoAII no interfereix amb l'acció de l'apoAI o apoAIV en l'eflux del colesterol *in vitro*. L'apoAII és tant eficient com l'apoAI en promoure l'eflux de colesterol de cèl·lules de múscul llis o fibroblasts, però no tan eficient en el cas dels macròfags <sup>88</sup>.

*In vivo*, animals transgènics pel gen de l'*apoAI* humana desenvolupen en baix grau l'arteriosclerosi induïda per dieta <sup>59;60;90-93</sup>, en canvi els transgènics d'*apoAII* desenvolupen una arteriosclerosi més ràpidament <sup>94</sup> que els transgènics d' *apoAI* o *apoAI/apoAII*. Les HDL aïllades d'aquests transgènics per *apoAII* no presenten un eflux de colesterol deficient, atribuint-se el desenvolupament accelerat d'arteriosclerosi al seu contingut disminuït de l'enzim antioxidant Paraoxonasa1 <sup>95</sup>.

**ApoE:** L'apoE té una funció essencial en el catabolisme de remanents de lipoproteïnes per part del fetge. En segon lloc, té un paper molt important en l'eflux de colesterol de les cèl·lules perifèriques. S'ha utilitzat sovint ratolins *knock-out* pel gen de l'*apoE* com a models animals d'aterogènesi perquè desenvolupen arteriosclerosi fins i tot seguint una dieta control (4% de greix) (*chow diet*) <sup>96;97</sup>. Aquests animals presenten dues característiques pro-aterogèniques: nivells elevats de remanents de lipoproteïnes i nivells baixos de HDL <sup>96;97</sup>. Els macròfags només secreten el 5% de l'apoE circulant en plasma, però aquesta és suficient per restablir la capacitat d'eflux de colesterol en ratolins deficients en apoE <sup>98</sup>.

**CETP (cholesterol ester transfer protein):** L'enzim CETP, unit a l'apoAI, forma part de la HDL. Catalitza la reacció d'intercanvi d'EC de les HDL a les lipoproteïnes riques en triglicèrids (TG) (quilomicrons i lipoproteïnes de molt baixa densitat, VLDL), i de TG dels quilomicrons i VLDL cap a les HDL. Posteriorment, la lipasa hepàtica catalitza la hidròlisi de TG i fosfolípids de les HDL en el teixit hepàtic. La CETP pot transportar EC de les LDL oxidades a les HDL, tot i que a una velocitat menor que si es tractés de LDL natives. Sembla doncs, que la CETP pot disminuir l'efecte aterogènic de LDL oxidades <sup>99</sup>.

La deficiència de CETP (principalment deguda a mutacions en el gen de *CETP*) produeix un marcat increment de c-HDL, a més d'un increment en el tamany de partícula de la HDL <sup>100</sup>, que retarda el seu catabolisme. <sup>101</sup>.

La deficiència de CETP s'associa a una major prevalença de CHD, tot i els elevats nivells de c-HDL, especialment en individus hipertriglicèridèmics <sup>102;103</sup>. En canvi, nivells elevats d'activitat CETP, s'associen a baixos nivells de c-HDL i major gruix de l'artèria caròtida, el que indicaria que els nivells elevats de CETP són aterogènics <sup>104</sup>.

En models animals, la sobreexpressió de CETP és pro-aterogènica <sup>105;106</sup> i la deficiència o inhibició de CETP produeix un augment del c-HDL i inhibeix la progressió aterosclerosa <sup>107;108</sup>.

S'ha descrit que la CETP podria estar en excés en individus normolipèmics, on la velocitat de transferència d'EC estaria limitada per la concentració de TG; però en individus hipertriglicèridèmics la velocitat estaria limitada per la concentració de CETP <sup>109</sup>. Aquesta idea estaria recolzada pel fet que, *in vivo*, la CETP sembla inhibir la progressió de l'arteriosclerosi en animals hipertriglicèridèmics, però no en animals normolipèmics <sup>108</sup>.

**HL (EC 3.1.1.3) (lipasa hepàtica):** La HL es localitza a la superfície endotelial del teixit hepàtic, gònades i glàndules adrenals <sup>110</sup>; s'uneix a heparina, i té una alta homologia amb la *lipoprotein lipase* (LPL), tant pel que fa a la seqüència nucleotídica com de residus <sup>111</sup>.

La HL és una lipasa que actua sobre la HDL, hidrolitzant els fosfolípids de la superfície i TG del nucli <sup>112</sup>.

La gran quantitat de TG acumulats en el nucli de HDL, concretament en les partícules esfèriques anomenades HDL<sub>2</sub>, provenen de l'acció de la CETP. A més, la HL promou l'entrada d'EC de les HDL<sub>2</sub> als hepatòcits actuant possiblement com a lligand de SR-BI). El receptor SR-BI promou l'entrada d'EC de les HDL al fetge i òrgans esteroidogènics; i allí el colesterol lliure, fosfolípids i apoE i apoCII sobrants passen a formar les HDL<sub>3</sub> (discoidals) <sup>113</sup>. La HL és responsable de la disminució de tamany de les HDL, és a dir, de la transformació de les partícules esfèriques HDL<sub>2</sub> grans a les petites i discoidals HDL<sub>3</sub> <sup>114</sup>.

Hi ha certa controvèrsia sobre la relació entre la HL i l'aterosclerosi. Alguns estudis associen deficiència humana d'HL amb l'aterosclerosi, però altres estudis no ho troben <sup>113</sup>. Els nivells baixos d'activitat HL s'associen a concentracions augmentades de c-HDL, LDL grans i hipertriglicèridèmia, i en alguns estudis, un major risc de CHD <sup>112;115</sup>.

### **1.4.2 Propietats antioxidants i antiinflamatòries de la HDL**

Els lípids oxidats poden ser transferits de les LDL a les HDL, fet que pot inhibir la propagació en cascada de l'oxidació en les LDL <sup>116</sup>. Aquest és, per tant, un mecanisme pel qual les HDL protegeixen les LDL de la oxidació en la íntima <sup>117;118</sup>. Les HDL poden eliminar liso-fosfolípids i colesterol oxidat de les LDL oxidades, molècules que inhibeixen la relaxació vascular endotelial <sup>119</sup>.



<sup>122</sup>. La HDL és el portador predominant d'hidroperòxids d'EC en humans <sup>123</sup>. Aquests hidroperòxids d'EC de les HDL són captats pels hepatòcits més eficientment que no pas els EC nadius <sup>124;125</sup>. A més, *in vitro*, la HDL també inhibeix l'oxidació de les LDL causada per ions metàl·lics <sup>126;127</sup>.

Els animals transgènics deficients en apoE o apoAI presenten un augment de la concentració de c-HDL i una disminució important en la formació de estries grasses. La inhibició de la formació de les cèl·lules escumoses es produeix en un estadi posterior al dipòsit de lípids, de l'activació endotelial o de l'adherència de monòcits <sup>128</sup>.

A més, la HDL presenta altres funcions que li confereixen la seva capacitat protectora: a) prevé la mort cel·lular induïda per les LDL oxidades <sup>129</sup>, b) inhibeix l'expressió de molècules d'adhesió <sup>130;131</sup>, c) protegeix la paret vascular contra diverses formes de lesió <sup>129;130</sup>, d) regula la producció de prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) per cèl·lules endotelials i cèl·lules musculars llises vasculars <sup>132-134</sup>.

Les apoproteïnes i enzims units a la HDL són els principals responsables de la protecció contra l'oxidació.

**ApoAI:** L'apoAI és idèntica al factor estabilitzador de PGI<sub>2</sub> sèric. La PGI<sub>2</sub>, o prostaciclina, és sintetitzada a l'endoteli vascular i les cèl·lules del múscul llis, i actua com un potent vasodilatador regulant el to vascular i inhibidor de l'agregació plaquetària <sup>135</sup>. A més, la PGI<sub>2</sub> inhibeix el creixement de cèl·lules musculars llises vasculars, l'adhesió de leucòcits i l'acumulació d'EC a la paret cel·lular <sup>136-138</sup>. L'estabilització de PGI<sub>2</sub> per la HDL i l'apoAI pot protegir contra la formació de trombus plaquetaris en zones de dany vascular. L'efecte beneficiós de les HDL en la prevenció de CHD podria explicar-se en part per aquest efecte. Així doncs, l'apoAI també promou la relaxació vascular endotelial. L'apoAI de la HDL és la responsable d'absorbir els liso-fosfolípids de les LDL oxidades, disminuint així la transferència d'aquestes molècules de les LDL oxidades a la superfície de les cèl·lules endotelials, i suprimint o minimitzant la desregulació del to arterial endotelial induït per LDL oxidades <sup>139</sup>.

**PON1 (3.1.8.1/3.1.1.2) (Paraoxonasa1):** Tractarem la PON1 més extensament en el següent apartat.

**ApoJ (o clusterina):** L'apoJ és una lipoproteïna associada a la HDL en plasma humà, específicament unida a l'apoAI i la PON1, amb una raó molar constant apoJ/PON1 de  $8.2 \pm 2.1$  <sup>140</sup>. L'apoJ és considerada un reactant de fase aguda, i es troba a la subfracció de partícules de HDL que contenen PON1 i apoAI, però també en aquelles que contenen PON1 però no apoAI <sup>140</sup>.

L'apoJ inhibeix l'oxidació de les LDL i l'activitat quimiotàctica de les LDL cap als monòcits <sup>141</sup>.

S'ha comprovat que la relació entre apoJ/PON1 esta incrementada en ratolins susceptibles a desenvolupar estries grasses alimentats amb una dieta aterogènica o alimentats amb dieta control i injectats amb LDL mínimament oxidades, en *knock-outs* per apoE alimentats amb dieta control (4% de greix) i en *knock-outs* de receptor de LDL alimentats amb dieta enriquida en colesterol <sup>142</sup>. Els estudis en humans mostren que la raó apoJ/PON1 és significativament més gran en pacients normolipèmics amb CHD que en controls.

**PAF-AH (EC.3.1.1.47) (PAF-acetilhidrolasa):** El factor activador de plaquetes (*Platelet Activating Factor*, PAF) és un potent agregant plaquetari generat per les cèl·lules endotelials en resposta a dany oxidatiu i pot induir els macròfags a produir anions superòxid, contribuint així a la progressió de l'aterosclerosi <sup>143;144</sup>. La hidròlisi del grup acetil en posició *sn-2* del PAF el transforma en productes biològicament inactius (liso-PAF i acetat) que ja no són reconeguts pel receptor del PAF. Aquesta reacció està catalitzada per la PAF-AH <sup>145</sup>. La PAF-AH és sintetitzada majoritàriament pels macròfags <sup>146</sup> i es creia que era un enzim associat a les LDL i HDL <sup>147</sup> ja que s'havia trobat activitat PAF-acetilhidrolasa en aquest dos tipus de lipoproteïnes. Un estudi recent qüestiona l'existència de PAF-AH a les HDL per falta d'evidències concloents, i postula que la PON1 és l'únic enzim de les HDL responsable de la hidròlisi del PAF <sup>148</sup>.

La PAF-AH, a part de catalitzar la hidròlisi de l'enllaç en posició *sn-2* del PAF, també hidrolitza àcids grassos oxidats de cadena curta en la posició *sn-2* dels fosfolípids <sup>149</sup>, àcids grassos que tenen un potent efecte pro-inflamatori <sup>150</sup>.

L'efecte protector de les HDL pot ser degut no només a la concentració de la lipoproteïna en sang, sinó també a la raó entre la concentració de HDL que conté enzims protectors i la concentració de LDL mínimament oxidades. Aquesta raó està determinada per factors genètics, com els gens de la *PON1*, de la PAF-AH, HL, CETP i el loci apoA1/CIII/AIV <sup>151</sup>, i per factors ambientals, com la concentració de LDL, el tabac o la diabetis, que augmenten l'estrès oxidatiu <sup>152</sup>.

### **1.5 La Paraoxonasa1**

La paraoxonasa1 (PON1) és un enzim de 43kDa <sup>153</sup>, que comprèn 354 residus i se sintetitza en el fetge dels mamífers <sup>154</sup>. Segons el Protein Data Bank, no es coneix l'estructura tridimensional de la PON1, doncs no hi ha dades cristal·logràfiques ni té homologia amb cap família o proteïna d'estructura ja descrita <sup>155</sup>. Es coneix però, que la PON1 conté tres residus cisteïna, dos formant un

pont disulfur intramolecular i l'altre, la Cys 283, presentant el grup tiol lliure <sup>155</sup>. Un 76% dels residus de les PON1 d'humans, ratolins i conills són idèntics, i concretament totes 3 Cys estan conservades <sup>155</sup>.

La PON1 circula pel torrent sanguini específicament unida a les apoproteïnes apoA1 <sup>156</sup> i apoJ <sup>140</sup> de les HDL.

La PON1 confereix característiques antioxidants a les HDL. *In vitro*, la PON1 és capaç d' hidrolitzar certs substrats endògens (p.e. peròxids lipídics, hidroperòxids d'EC, peròxid d'hidrogen, lactones, èsters cíclics,...), substrats exògens (p.e. organofosfats de toxines naturals) o substrats sintètics (p.e. paraoxó, gas sarín, fenilacetat,...).

L'activitat d'hidròlisi de paraoxó (activitat paraoxonasa) s'ha trobat disminuïda en pacients amb malalties d'elevat estat oxidatiu, com les CHD, les dislipèmies i la diabetis. Els ratolins *knock-out* pel gen *PON1* desenvolupen aterosclerosi de manera accelerada <sup>157</sup>.

L'activitat paraoxonasa, la seva concentració i probablement la seva capacitat antioxidant estan modulades per polimorfismes localitzats en les regions promotora i codificant del gen *PON1*.

Tots aquests punts seran revisats en els següents apartats.

### **1.5.1 Inicis**

En el camp de la toxicologia, l'enzim PON1 ha tingut cert interès degut a la seva capacitat d'hidrolitzar organofosfats sintètics, que actuen com a pesticides (p.e. metabòlits oxons de paratió, de clorpirifós i de diazinó) o gasos nerviosos (p.e. sarín i soman) <sup>154;158</sup>. El paper de la PON1 en la detoxificació d'organofosfats és important fisiològicament, ja que injectar PON1 en models animals els protegeix de l'enverinament, i les diferències d'activitat paraoxonasa interespecies correlacionen bé amb la dosi letal mitja (revisat en <sup>159</sup>).

La majoria d'organofosfats són neurotoxines: s'uneixen de forma reversible a la PON1, que els hidrolitza, però de forma irreversible a l'enzim acetilcolinesterasa i a altres esterases sèriques. Aquesta unió inactiva l'acetilcolinesterasa en els punt de sinapsi i les terminals neuromusculars <sup>160</sup> i l'enzim és incapaç de catalitzar la hidròlisi del neurotransmissor acetilcolina. Les transmissions neuromusculars queden bloquejades, si l'efecte de l'organofosfat és agut, i es poden produir neuropaties i efectes neuropsiquiàtrics, si l'efecte és crònic <sup>161</sup>.

Així doncs, la PON1 protegeix el sistema nerviós dels mamífers eliminant els organofosfats que arriben a la circulació. Tot i que inicialment s'estudià la PON1 per aquestes implicacions toxicològiques, actualment ha guanyat molt d'interès degut al paper antioxidant que se li atribueix, especialment respecte les lipoproteïnes oxidades.

Tot i eliminar organofosfats sintètics i també donar protecció contra l'arteriosclerosi, es creu que la funció de PON1 s'ha conservat evolutivament per altres raons <sup>160</sup>:

- 1) Existeixen toxines naturals d'organofosfats, èsters exògens i endògens (tiolactones d'homocisteïna, altres lactones, carbonats cíclics,...) que la PON1 és capaç d'hidrolitzar.
- 2) La composició de les LDL és similar a la de les membranes cel·lulars, de manera que la PON1 podria ser important per a mantenir l'estructura i funcionalitat de les membranes cel·lulars, i més concretament, les del sistema nerviós central, on les HDL són les úniques lipoproteïnes presents.

### **1.5.2 El gen *PON1***

El gen *PON1*, que codifica per la PON1, conté 9 exons, unes 26kb <sup>162</sup> i es localitza en el braç llarg del cromosoma 7 entre q21.3 i q22.1 en el genoma humà <sup>163</sup>. Aquest locus se situa en una regió propera a la dels gens *PDK4* (en el locus 7q21.3-q22.1), *ABCA1* (en el locus 7q21.1 i responsable de la malaltia de Tangier), i *CFTR* (en locus 7q31.2 i responsable de la fibrosi quística). De fet, el 1985 es va descriure que hi havia un lligament genètic entre el locus de la fibrosi quística i un locus polimòrfic que controlava l'activitat arilesterasa sèrica de l'enzim PON1<sup>164</sup>. De fet, el mateix any es confirmà que el lligament era entre el gen *PON1* i el *CFTR*, ja que es trobà que el locus de *PON1* estava lligat a un marcador de DNA lligat a fibrosi quística <sup>165</sup>. Aquesta informació, juntament amb experiments d'hibridació *in situ* <sup>159</sup>, van situar en els inicis el locus de *PON1* en 7q21-q22.

El gen *PON1* forma un cluster amb dos gens de la mateixa família: *PON2* i *PON3* <sup>163</sup>, els quals comentarem posteriorment.

L'anàlisi de la regió promotora del gen, descriu a *PON1* com un gen *TATA-less* <sup>163</sup>, sense caixa CAAT, un promotor que és ric en GCs <sup>166</sup>, amb un lloc d'unió al factor de transcripció repressor Sp1, i una zona homòloga a un element de resposta a IL-6 <sup>167</sup>. L'intró 8 conté una seqüència Alu i l'intró 5 una repetició dinucleotídica CA de 46 repeticions <sup>163</sup>.

#### **1.5.2.1- El polimorfisme *PON1-192***

El polimorfisme *PON1-192* comprèn els al·lels Q i R que corresponen a una glutamina (CAA) i una arginina (CGA) en el residu 192 de la PON1 <sup>168</sup>.

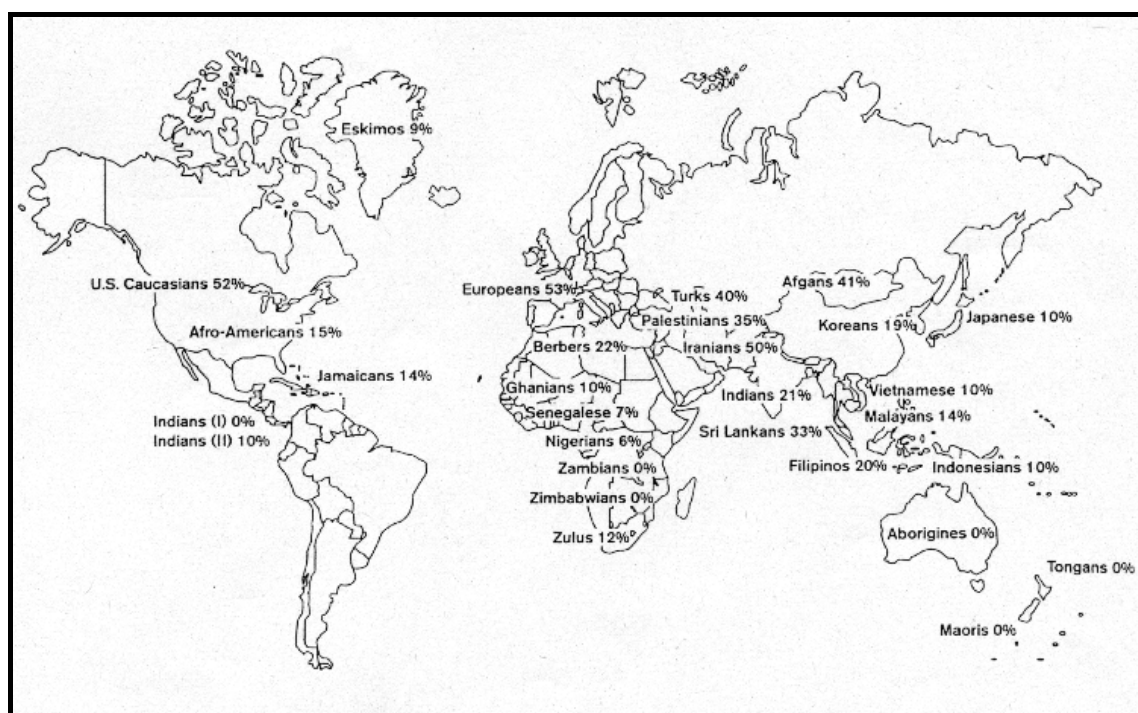
Aquest polimorfisme va ser identificat l'any 1993 com la base molecular responsable de les diferències en l'activitat paraoxonasa dels al·loenzims de la PON1 <sup>159</sup>, és a dir, el polimorfisme *PON1-192* modula l'activitat paraoxonasa <sup>168</sup>. En els inicis, els fenotips de l'activitat paraoxonasa s'anomenaven fenotips A i B, i corresponien als al·loenzims Q i R del polimorfisme *PON1-192*, respectivament. El canvi de residu, i conseqüent canvi de càrrega de l'enzim, poden afectar al

número de recanvi de substrat, el qual és elevat tant en l'al·loenzim R de la PON1 humana com en la PON1 del conills, on hi ha una lisina (de mateixa càrrega que l'arginina) en la posició 192 <sup>159</sup>.

El polimorfisme fenotípic d'activitat paraoxonasa va ser el primer marcador a trobar-se associat al gen *CFTR* <sup>164</sup>.

La freqüència al·lèlica del polimorfisme *PON1*-192 d'algunes poblacions ha estat inferida a partir del fenotip, i en resum, s'ha suggerit que la freqüència de l'al·lel Q disminueix en desplaçar-nos des d'Europa cap a Àfrica i Àsia. Tot i així, alguns estudis cas-control mostren discrepàncies a l'hora de descriure el genotip a partir del fenotip en poblacions malaies, xineses i japoneses <sup>169</sup>.

Vegeu en la següent figura la distribució mundial del fenotip de baixa activitat, originàriament extreta de <sup>170</sup>.



Pel que fa a la distribució fenotípica de l'activitat paraoxonasa, les poblacions europees segueixen una distribució trifàsica, d'acord amb la distribució genotípica del polimorfisme *PON1*-192 <sup>171</sup>, que és aproximadament de 50:40:10 respecte a QQ:QR:RR <sup>172</sup>, amb una freqüència al·lèlica al voltant d'un 0.30 per l'al·lel R del polimorfisme *PON1*-192 <sup>158;173</sup>. En població espanyola, la freqüència al·lèlica de R trobada pel nostre grup és 0.31 <sup>174</sup>, mentre que per un altre grup és una mica superior, 0.41, amb una distribució genotípica 35:48:17 <sup>158</sup>.

En un estudi recent, s'ha descrit en població negra que la freqüència de l'al·lel R del polimorfisme *PON1-192* és de 0.64, és a dir, una distribució genotípica de QQ:QR:RR del 12:49:39 % <sup>173</sup>. Aquestes freqüències concorden amb la distribució fenotípica d'activitat paraoxonasa en població negra (la distribució al·lèlica en negres no ha estat descrita en cap altre estudi) <sup>172</sup>.

En la població Inuit de Canadà, de forma similar a la negra, la freqüència de l'al·lel R del polimorfisme *PON1-192* és de 0.70, amb una distribució genotípica de QQ:QR:RR del 9:42:49 % <sup>175</sup>.

Les poblacions de Malàisia, la Xina i d'Àfrica, en canvi, presenten distribucions fenotípiques unimodals, on gairebé no hi ha individus amb baixa activitat paraoxonasa i el valor de la mediana és més alt que per les poblacions europees, encara que la seva freqüència de l'al·lel de baixa activitat paraoxonasa, el *PON1-192Q*, no sigui zero <sup>170;172</sup>. En col·lectius mongols i negroides, menys d'un 10% de la població es pot incloure en el grup de baixa activitat, i no és ni tan sols demostrable en els aborígens d'Austràlia <sup>170</sup>.

Recentment <sup>176</sup>, s'han trobat tres polimorfismes en el gen *rPON1* de conill (P82S,K93E i S101G) que segreguen amb els fenotips A i B de la *rPON1*, els quals presenten característiques físiques i d'especificitat de substrat semblants a la *PON1* humana. El fenotip A de conill també protegeix millor de les LDL contra l'oxidació que el B, com se sospita que succeeix amb la *PON1* humana. Aquest animal podria doncs esdevenir un bon model per estudiar l'efecte del polimorfismes en el desenvolupament de les malalties.

#### 1.5.2.2 El polimorfisme *PON1-55*

El polimorfisme *PON1-55* comprèn els al·lells L i M que corresponen a una leucina (TTG) i una metionina (ATG) en el residu 55 de la *PON1* <sup>159;168</sup>.

Aquest polimorfisme modula els nivells de mRNA <sup>177</sup> i proteïna de la *PON1* <sup>178</sup>, de manera que l'al·lel L correspon a concentracions de *PON1* més elevades que l'al·lel M. Això es pot explicar en part perquè 1) hi ha un cert grau d'equilibri de lligament entre l'al·lel L del polimorfisme *PON1-55* i l'al·lel C del polimorfisme *PON1(-108)*, que és un polimorfisme funcional de la regió promotora del gen *PON1* <sup>167</sup>; i 2) l'al·loenzim L presenta una major estabilitat a nivell de proteïna, possiblement degut a una major resistència a la proteòlisi <sup>179</sup>.

S'ha descrit també que el polimorfisme *PON1-55* modula l'activitat paraoxonasa independentment del polimorfisme *PON1-192*, però no n'altera l'activitat específica <sup>180</sup>.

S'ha descrit que la freqüència de l'al·lel L del polimorfisme *PON1-55* és de 0.82 en població negra i de 0.64 en blanca, és a dir, una distribució genotípica de LL:LM:MM del 67:30:3 % en negres i 47:38:15 % en blancs <sup>173</sup>. Altre cop, aquestes freqüències concorden amb la distribució fenotípica

d'activitat paraoxonasa en població negra. la distribució al·lèlica en negres no ha estat descrita en cap altre estudi <sup>172</sup>, i amb la distribució al·lèlica en població blanca d'altres estudis <sup>159;172</sup>.

### 1.5.2.3 Els polimorfismes descrits recentment

L'any 2000 es descriuen 3 nous polimorfismes en la regió promotora del gen *PON1*:

*PON1*-(-107), *PON1*-(-824) i *PON1*-(-907) <sup>181</sup>. La nomenclatura varia lleugerament segons els autors, però es refereixen tots als mateixos polimorfismes <sup>167</sup>.

Estudis de expressió gènica determinen que el polimorfisme *PON1*-(-107) modula l'expressió de la proteïna, fins a 2 cops segons l'estudi <sup>181;182</sup>, i el *PON1*-(-824) també ho fa, però en menor grau. De fet, el *PON1*-(-107) es localitza en un lloc d'unió pel factor de transcripció repressor Sp1, lloc important per un gen *TATA-less* com el *PON1* <sup>181;182</sup>. Aquests dos polimorfismes *PON1*-(-107) i *PON1*-(-824) es correlacionen amb les diferències de concentració <sup>183</sup> i d'activitat paraoxonasa en sèrum <sup>181</sup>.

A més, els tres polimorfismes *PON1*-(-107), *PON1*-(-824) i *PON1*-(-907) es troben fortament associats al *PON1*-55, però no al *PON1*-192 <sup>181</sup>, cosa que pot explicar perquè el *PON1*-55 modula la concentració de *PON1*, però només en part (*PON1*-55 segueix quedant com a factor independent en el model). Un altre estudi del mateix any també troba que *PON1*-55 i *PON1*-(-108) estan en equilibri de lligament <sup>182</sup>.

L'anàlisi posterior de cinc polimorfismes, 3 polimorfismes de la regió promotora (*PON1*-(-108), *PON1*-(-162) i *PON1*-(-909), i els *PON1*-55 i *PON1*-192 de la regió codificant, indica que tots estan en equilibri de lligament i, a més, expliquen la variabilitat d'activitat arilesterasa en un percentatge elevat, activitat que és explicativa de la concentració de la *PON1* <sup>167</sup>. Segons els mateixos autors, tots tres polimorfismes de la zona promotora modulen l'expressió de *PON1* en l'ordre de dos cops cada polimorfisme <sup>166</sup>. De fet, el polimorfisme *PON1*-(-162) es localitza dins un lloc d'unió per factor de transcripció NF-1 <sup>166</sup> i dins d'una regió molt homòloga a un lloc de resposta a la citocina pro-inflamatòria IL-6, la qual disminueix la expressió de *PON1* en cèl·lules HepG2 i l'activitat paraoxonasa en ratolins <sup>184</sup>.

Haplotips de *PON1*-55 i *PON1*-192: Hi ha certa controvèrsia en l'existència de l'haplotip 55M/192R, que no ha estat detectat per dos estudis <sup>168;185</sup>, però sí per un tercer <sup>178</sup>. En la majoria de casos es troba que *PON1*-55 i *PON1*-192 estan en equilibri de lligament, concretament l'al·lel L amb el R <sup>167;178</sup>.

#### 1.5.2.4 Altres gens de la família de les PON

Com ja hem comentat, els gens de la mateixa família *PON1*, *PON2* i *PON3* formen un cluster en q21.3 del cromosoma 7<sup>163</sup>. L'ordre dels gens és *PON2*(28 kb)-*PON3*(22kb)-*PON1*(27kb), tots en la mateixa orientació, i separats per unes distàncies d'uns 25 kb i 20 kb<sup>186</sup>.

En humans, el gen *PON1* es diferencia dels gens *PON2* i *PON3* perquè posseeix 3 nucleòtids a l'exó 4 que codifiquen pel residu Lys105, inexistent en els altres dos gens<sup>163</sup>.

Els gens *PON1*, *PON2* i *PON3* dels mamífers tenen un alt percentatge d'identitat en les zones codificants i en les unions exó-intró (81-91% a nivell nucleotídic i 79-90% a nivell d'aminoàcids), fets que fan pensar l'origen d'aquests gens és la duplicació gènica<sup>163</sup>.

L'activitat lactonasa es conserva en les tres proteïnes, *PON1*, *PON2* i *PON3*, però en canvi no comparteixen la activitat paraoxonasa (inexistent en *PON2* i *PON3*) i activitat arilesterasa (gairebé inexistent en *PON2* i *PON3*). L'activitat paraoxonasa podria ser un marcador distintiu de l'origen més recent de la *PON1*, respecte les altres *PONs*<sup>187</sup>.

##### 1.5.2.4.1-El gen *PON2*

El gen *PON2* es troba ubíquament transcrit (fetge, cor, cervell)<sup>163,188</sup> i en diferents formes de mRNA degut a *splicing* alternatiu o a l'ús de un segon inici de transcripció<sup>188</sup>.

A diferència de les proteïnes *PON1* i la *PON3*, la *PON2* no està associada a la HDL, sinó que sembla realitzar una acció antioxidant a nivell cel·lular, on podria unir-se als hostes dels enzims antioxidants intracel·lulars que protegeixen la cèl·lula de l'estrès oxidatiu<sup>189</sup>. En cultius cel·lulars, s'ha descrit que *PON2* prevé la peroxidació lipídica de les LDL, reverteix l'oxidació de les LDL parcialment oxidades i inhibeix la capacitat de les LDL parcialment oxidades d'induir quimiotaxi de monòcits<sup>189</sup>.

S'han descrit dos polimorfismes en la zona codificant del gen *PON2* que condueixen als canvis d'aminoàcids A148G i S311C<sup>188</sup>.

L'al·lel G de *PON2*-148 s'associa a un augment de la hiperglicèmia en dejú en població aborigen canadenca Oji-Cree amb NIDDM, però no s'associa directament a NIDDM o a intolerància a la glucosa<sup>190</sup>. Aquest al·lel també es troba associat a nivells de c-HDL més elevats en Hutterites<sup>191</sup> i nivells de colesterol-LDL (c-LDL) més baixos en aborígens canadencs<sup>192</sup>.

L'haplotip *PON2*-148A/311S s'ha trobat associat a un reduït pes en néixer en població asiàtica, però no en població africana<sup>193</sup>.

L'al·lel S de *PON2*-311 s'ha trobat associat a major risc de CHD en Indis asiàtics i podria actuar sinèrgicament amb el R de *PON1*-192, independentment del perfil lipídic<sup>194</sup>. Aquest al·lel també sembla interaccionar amb l'apoE4 pel risc de sofrir malaltia d'Alzheimer o demència vascular<sup>195</sup>.



En canvi, en pacients caucàsics amb hipercolesterolèmia familiar, s'ha trobat que l'al·lel C de *PON2-311* podria ser protector contra CHD <sup>196</sup>.

#### 1.5.2.4.2-El gen *PON3*

EL producte de *PON3* en conills és una lactonasa d'uns 40 kDa, que conserva les 3 Cys com la *PON1* (la Cys 283 amb el grup sulfur lliure i les altres dues formant el pont disulfur intramolecular) i també circula unida a les HDL <sup>197</sup>. L'expressió de *PON3* es dona principalment en el fetge i, a diferència de la *PON1*, s'ha observat en cultius cel·lulars que l'expressió de *PON3* no està regulada per fosfolípids oxidats, ni per dietes riques en greix en ratolins <sup>197</sup>. Segons Reddy i cols. <sup>197</sup>, la *PON3* podria exercir una funció ateroprotectora constitutiva basal, mentre que la funció protectora de *PON1* seria més variable, donat que l'expressió de *PON1* es reprimeix per estímuls pro-aterogènics <sup>197</sup>. De fet, la *PON3* protegeix contra l'oxidació de LDL amb Cu<sup>2+</sup>, fins i tot millor que la *PON1*, però presenta una baixa activitat arilesterasa i nul·la activitat paraoxonasa <sup>198</sup>.

#### 1.5.3-Activitats enzimàtiques de la *PON1*

La *PON1* té diverses activitats enzimàtiques, que catalitzen la transformació de diferents substrats que nomenem a continuació:

##### **1- Organofosfats:**

Paraoxó (**activitat paraoxonasa**) <sup>154;159;168</sup>

sarín <sup>199</sup>

soman <sup>158</sup>

diisopropilfluorofosfat <sup>199</sup>

diazoxó <sup>158</sup>

##### **2- Arilèsters:**

Fenilacetat (**activitat arilesterasa**) <sup>158</sup>

4-nitro-fenilacetat,

2-nitro-fenilacetat,

2-naftilacetat <sup>158</sup>

feniltioacetat <sup>199</sup>

oxó de clorpirifós <sup>158</sup>

##### **3- Lactones (**activitat lactonasa**) <sup>200</sup>**

Estatines

Tiolactones d'homocisteïna cel·lulars endògenes.

**4- Capacitat de protecció de LDL enfront de l'oxidació (activitat antioxidant):**Peròxids lipídics(2): <sup>201</sup>

fosfolípids peroxidats i hidroperoxidats

EC peroxidats i hidroperoxidats

peròxid d'hidrogen (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)PAF (activitat PAF-acetilhidrolasa) <sup>148</sup>

Aquestes activitats varien tant pel que fa a la dependència al Ca<sup>2+</sup> o a la Cys283 de l'enzim, com pel comportament segons el genotip dels polimorfismes *PON1-192* (al·lel Q o R) i *PON1-55* (al·lel L o M). Vegeu la següent taula resum.

| Substrat hidrolitzat o activitats de PON1  | Magnitud d'hidròlisi dels al·lels de <i>PON1-192</i> / <i>PON1-55</i> | Dependència de   |         |
|--|---|------------------|---------|
|  |   | Ca <sup>2+</sup> | Cys 283 |
| Paraoxó  | Q<R / L>M   | Sí               | No      |
| Fenilacetat  | Q=R   | Sí               | No      |
| 2-Naftilacetat   | Q=R   |                  |         |
| oxó de clorpirifós   | Q=R   |                  |         |
| Lactones   | Depèn de la molècula  | Sí               | Sí      |
| Sarín  | Q>R   |                  |         |
| Soman  | Q>R   |                  |         |
| Diazoxó  | Q>R   | Sí               | No      |
| Protecció de LDL enfront l'oxidació  | Q>R * / L<M   | No               | Sí      |
| Grau d'Inhibició degut a estrès oxidatiu de les activitats paraoxonasa, arilesterasa i de protecció enfront l'oxidació | Q<R *   |                  |         |
| * hi ha discordances a la literatura   |   |                  |         |

**1.5.3.1 Activitat paraoxonasa (respecte paraoxó)**

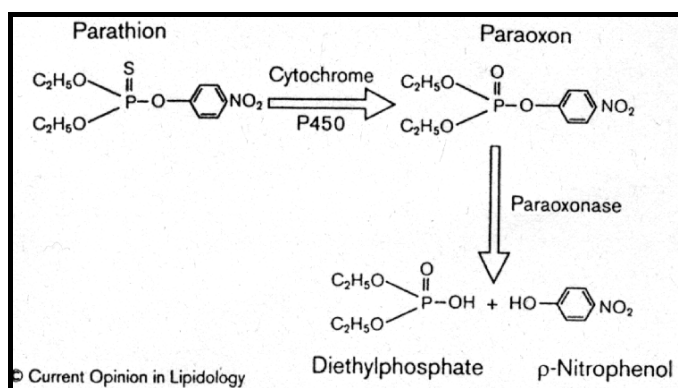
L'activitat d'hidròlisi de paraoxó de l'enzim PON1 s'anomena activitat paraoxonasa.

El paratió és un compost tió relativament poc tòxic en la seva forma original, però en el fetge és convertit en un altre compost molt més tòxic, el paraoxó. Aquesta reacció és catalitzada per les monoxigenases microsomals dependents de Citocrom P<sub>450</sub> del fetge <sup>172</sup>, i el seu producte oxó resultant, el paraoxó (O,O-dietil-O-p-nitrofenilfosfat), pot ser detoxificat en el mateix fetge per més enzims (p.e. glutatión-S-transferasa en el cas dels mamífers). Si certa quantitat d'oxó escapa a la detoxificació hepàtica, la PON1 de la sang pot hidrolitzar-lo. No succeeix així en les aus <sup>202</sup>, peixos

i invertebrats (p.e. insectes), que generalment no disposen de PON1 i s'intoxiquen amb aquests compostos.

De forma similar al paratió, els insecticides clorpirifós i diazinó són bioactivats a productes oxó inhibidors de la colinesterasa per l'acció del sistema Citocrom P<sub>450</sub><sup>158</sup>. Aquest productes són l'oxó de clorpirifós i el diazoxó, respectivament, i com el paraoxó, poden ser hidrolitzats per la PON1.

Quan es realitza la determinació de l'activitat paraoxonasa en el laboratori, es parteix directament del substrat paraoxó i no del seu precursor, el paratió. Com es comenta en l'apartat 3. Mètodes, la mesura d'activitat paraoxonasa es realitza seguint la formació de p-nitrofenol a  $\lambda$  405 nm. Aquest, juntament amb el dietilfosfat, són els productes de la hidròlisi del paraoxó. Vegeu figura següent extreta de<sup>175</sup>.



S'ha descrit que l'albúmina també té certa activitat paraoxonasa, i per tant s'ha suggerit que el més òptim fóra realitzar l'anàlisi de l'activitat paraoxonasa relacionada amb la proteïna PON1 en una fracció de sèrum que no contingui albúmina<sup>203</sup>.

En els nostres estudis hem analitzat l'activitat paraoxonasa (usant paraoxó com a substrat) ja que és un paràmetre que s'ha trobat disminuït en pacients amb malalties relacionades amb l'arteriosclerosi, com IAM<sup>204;205</sup>, diabetis mellitus<sup>206</sup> o hipercolesterolèmia familiar<sup>207;208</sup>. A més, l'activitat paraoxonasa es correlaciona fortament amb la concentració PON1, de manera que és representativa de la quantitat de proteïna<sup>209</sup>, i les mostres conservades a  $-20^{\circ}\text{C}$  presenten una concentració PON1 i activitats paraoxonasa i arilesterasa, activitat també analitzada en un estudi nostre<sup>208</sup>, no alterades durant almenys un any<sup>210</sup>.

L'activitat paraoxonasa està molt modulada pels polimorfismes *PON1-192* i *PON1-55* descrits anteriorment. L'al·loenzim R del polimorfisme *PON1-192* i l'al·loenzim L del *PON1-55* semblen ser els més actius enfront la hidròlisi del paraoxó tant a nivell de PON1 purificat com de les seves HDL aïllades<sup>159</sup>, tot i que *PON1-55* no altera l'activitat específica<sup>168;180</sup>. En concret, els al·loenzims Q i R per *PON1-192* de diabètics tipus 2, difereixen uns 6 cops respecte l'activitat paraoxonasa sèrica,

i uns 5 cops respecte la raó [activitat paraoxonasa/activitat arilesterasa], indicadora de l'activitat específica <sup>211</sup>. A més, factors ambientals també modulen l'activitat paraoxonasa de manera que la variació inter-individual observada en poblacions sanes és deguda també a factors independents del genotip <sup>175</sup>. Expliquem més extensament aquest punt en els següents apartats.

L'activitat paraoxonasa és fortament dependent de la concentració de  $\text{Ca}^{2+}$ , doncs pot arribar a inhibir-se un 90% per quelació amb EDTA <sup>212</sup>, s'inhibeix per lípids oxidats <sup>213</sup> i no és gens dependent de la presència de la Cys 283 de l'enzim <sup>155</sup>, característiques que tenen importants implicacions analítiques.

### 1.5.3.2 Activitat arilesterasa (respecte fenilacetat)

L'any 1983 es va determinar que el locus que determinava l'activitat arilesterasa era el mateix que el de l'activitat paraoxonasa. En efecte, el grau d'estimulació amb NaCl de l'activitat paraoxonasa cosegrega amb la raó de les activitats [paraoxonasa/arilesterasa], les correlacions entre les activitats paraoxonasa basal o estimulada amb NaCl i l'activitat arilesterasa són molt elevades, i el fenilacetat actua com a inhibidor de l'activitat paraoxonasa en ambdós fenotips A i B de la PON1 <sup>214</sup>. Expliquem l'estimulació de l'activitat paraoxonasa amb NaCl més endavant.

L'activitat arilesterasa de l'enzim PON1, anomenada activitat arilesterasa, catalitza la reacció d'hidròlisi de fenilacetat a fenol i àcid acètic. Com s'explica en l'apartat 3. Mètodes, la determinació experimental d'aquesta activitat es realitza seguint la formació de fenol, que absorbeix de forma important a  $\lambda$  270 nm, que també absorbeix el substrat fenilacetat en part. La tècnica de determinació d'activitat arilesterasa no s'ha pogut automatitzar, entre altres raons perquè és més laboriosa que la d'activitat paraoxonasa.

Igual que l'activitat paraoxonasa, l'activitat arilesterasa és representativa de la concentració de proteïna <sup>178;209</sup> i també es manté sense variacions durant un any si les mostres es conserven a  $-20^{\circ}\text{C}$  <sup>210</sup>. L'activitat arilesterasa, com l'activitat paraoxonasa, és dependent de la concentració de  $\text{Ca}^{2+}$  <sup>213</sup>, també s'inhibeix per lípids oxidats <sup>213</sup> i tampoc és dependent de la presència de Cys 283 en l'enzim. De fet, l'activitat arilesterasa es veu inhibida si l'enzim és atacat en la Cys 283 per peròxids lipídics (lliures o continguts en LDL oxidades), però l'activitat arilesterasa no és dependent de la Cys283, ja que no resulta alterada si es canvia la natura del residu en la posició 283 per mutagènesi dirigida o es pretracta l'enzim bloquejant el grup sulfur de la Cys amb un agent com el p-hidroximercuribenzoat (PHMB)<sup>215</sup>. L'atac de peròxids lipídics podrien comportar un canvi conformacional de l'enzim o un impediment estèric que alterés l'activitat arilesterasa. La presència d'antioxidants redueix la quantitat de peròxids lipídics formats i preserva l'activitat arilesterasa <sup>215</sup>.

L'activitat arilesterasa no sembla estar tan fortament modulada pels polimorfismes *PON1*-192 ni *PON1*-55 com ho està l'activitat paraoxonasa <sup>158</sup>, però hi ha certa contradicció dependent dels autors. De fet, l'activitat arilesterasa sèrica es troba en una distribució unimodal en humans <sup>171</sup>. La seva heredabilitat estudiada en bessons s'estima en un 74% <sup>171</sup>. Recentment, Brophy i cols.<sup>167</sup>, descriuen que els tres polimorfismes del promotor del gen *PON1*, *PON1*-(-108), *PON1*-(-162) i *PON1*-(-909), més els dos de la zona codificant, *PON1*-55 i *PON1*-192, expliquen la variabilitat d'activitat arilesterasa en un percentatge elevat. Concretament, *PON1*-(-108)(22%)> *PON1*-192(5%)> *PON1*-55(4%)> *PON1*-(-162)(1%)> *PON1*-(-909)(0.1%). En canvi en rates, sí que s'han trobat variants genètiques que modulen fortament l'activitat arilesterasa <sup>216</sup>.

El valor de l'activitat arilesterasa és substancialment major que el de l'activitat paraoxonasa, sent de l'ordre de micromols de substrat hidrolitzat per mil·lilitre de sèrum per minut (U/ml) per l'activitat arilesterasa, enfront de l'ordre de nanomols de substrat hidrolitzat per mil·lilitre de sèrum per minut (U/l) per l'activitat paraoxonasa <sup>213</sup>.

#### 1.5.3.3 Activitat lactonasa (respecte lactones)

Les tiolactones d'homocisteïna són uns compostos endògens presents en totes les cèl·lules que són nocius per les proteïnes. Les tiolactones d'homocisteïna són uns tioèsters cíclics que es produeixen en la formació d'aminoacil-tRNA a partir de l'homocisteïna. Aquests composts N-homocisteïnilen a les proteïnes pels residus lisina, aquestes multimeritzen i precipiten tot inactivant-se <sup>217</sup>.

Recentment, s'ha descrit que la *PON1* és capaç d'hidrolitzar més de 30 lactones i èsters cíclics (EC3.1.1.25), entre els quals es troben 1) lactones de compostos endògens, com la mencionada tiolactona d'homocisteïna <sup>200</sup>, gama-lactones de glucocorticoids <sup>218</sup> i 2) compostos exògens que contenen un anell lactònic, com els fàrmacs simvastatina, mevastatina i lovastatina <sup>200</sup>.

Així doncs, s'ha descrit que la *PON1* exerceix l'activitat homocisteïna-tiolactonasa <sup>217</sup>, en catalitzar la hidròlisi de tiolactona d'homocisteïna cap a homocisteïna. Com més gran és l'activitat homocisteïna-tiolactonasa, millor és la protecció contra l'homocisteïnilació de proteïnes <sup>173</sup>. L'activitat tiolactonasa és dependent de  $Ca^{2+}$  <sup>200;217</sup> i de la Cys 283, per tant es deu inhibir durant l'oxidació de les LDL <sup>200</sup>. A més, l'activitat homocisteïna-tiolactonasa es correlaciona amb l'activitat paraoxonasa <sup>173</sup>.

Els dos al·loenzims respecte el polimorfisme *PON1*-192 són capaços d'hidrolitzar els substrats de lactones comentats, però la velocitat en fer-ho és més gran per un o altre al·loenzim dependent de la lactona substrat <sup>200</sup>. Per exemple, el substrat tiolactona d'homocisteïna és hidrolitzat en major grau pels al·loenzims R del polimorfisme *PON1*-192 i L del polimorfisme *PON1*-55, respecte als

corresponents Q i M <sup>173</sup>. Pel nostre coneixement actual, no s'ha descrit si l'activitat lactonasa s'inhibeix en igual mesura pels dos al·loenzims.

El sèrum dels conills posseeix una de les activitats homocisteïna-tiolactonasa majors entre els vertebrats, i paral·lelament protegeix de la homocisteïnilació millor que el sèrum humà <sup>173</sup>.

A part de la capacitat per inhibir la homocisteïnilació de proteïnes, l'interès per aquesta nova activitat lactonasa de la PON1 es deu al seu efecte sobre fàrmacs *soft* o *antedrugs*. Aquests fàrmacs són els que tenen un efecte a nivell local, però no a nivell sistèmic perquè s'inactiven en passar a la circulació <sup>219</sup>. El fet d'afegir un grup lactona a una molècula com un glucocorticoid, provocaria que en aplicar-se tòpicament fos activa a nivell local, però en passar a la circulació fos hidrolitzada per la PON1 i, per tant, inactivada <sup>218</sup>. En efecte, les lactones i carbonats cíclics de glucocorticoids són hidrolitzats d'una forma extremadament ràpida per la PON1 <sup>218</sup>.

Recentment, també s'ha observat activitat lactonasa en la PON3 de conill <sup>198</sup>.

#### 1.5.3.4 Activitat antioxidant (de protecció contra l'oxidació de les LDL) i relació amb les HDL

S'ha descrit que la PON1 és la responsable de les propietats antioxidants de les HDL sobre l'oxidació de les LDL <sup>118;220</sup>. El fet d'afegir HDL en un medi oxidant on hi ha LDL, no afecta a la formació de diens conjugats, però en canvi disminueix en un 90% la formació de peròxids lipídics en LDL oxidades d'una manera dependent de la concentració de HDL <sup>117</sup>. En canvi, si s'afegeix un inhibidor de la PON1 en experiments fets amb HDL, s'observa un augment de les *Thiobarbituric Acid Reactive Substances* (TBARS) (indicadores d'estrès oxidatiu) <sup>215</sup>.

La PON1 pot inhibir l'oxidació de les LDL <sup>118</sup> i també la de les HDL <sup>221</sup>, processos fortament involucrats en el desenvolupament de l'arteriosclerosi <sup>222</sup>.

La PON1 protegeix de l'oxidació de LDL induïda per Cu<sup>2+</sup> o per radicals lliures. Quan s'incuben LDL amb Cu<sup>2+</sup> durant 4h a 37 °C, la PON1 és capaç de reduir la formació de peròxids i aldehids en un 61% i 58% , respectivament <sup>213</sup>. A més, en afegir PON1 (10 U/ml d'activitat arilesterasa) a les HDL, la fase de latència o "lag-phase" d'oxidació induïda per Cu<sup>2+</sup> es veu perllongada, l'acumulació de peròxids i aldehids en les HDL es redueix en un 95%, i aquesta acumulació es correlaciona inversament amb l'activitat paraoxonasa <sup>221</sup>.

Com s'ha comentat, aquest enzim està unit a apoAI <sup>156</sup> i apoJ <sup>140</sup> de les HDL, i la seva activitat paraoxonasa es correlaciona tant amb la concentració de HDL, com amb la d'apoAI en moltes poblacions estudiades, tot i que la relació no sembla ser gaire forta <sup>223</sup>. Les apoAI <sup>224</sup> i apoAII <sup>225</sup> són capaces de reduir peròxids a hidroperòxids en suspensió, i un altre component de les HDL, l'apoJ, sembla prevenir la formació de lipoperòxids induïda per LDL en cèl·lules de la paret arterial en cultius <sup>140</sup>. Tot i així, s'ha suggerit que la protecció exercida per les HDL està més fortament

l·ligada a la PON1 de les HDL que no pas a la quantitat de partícules HDL o a qualsevol altre component d'elles. En efecte, les HDL dels conills, que presenten una activitat paraoxonasa entre 8-16 cops més elevada que les HDL humanes, tenen una capacitat màxima de protecció contra l'oxidació dins el mateix rang d'activitat paraoxonasa (entre 75-150 U) que els humans i no dins el rang de concentració humana de HDL <sup>211</sup>. Existeixen malalties que provoquen una deficiència de HDL i s'associen a decrement d'activitat o concentració de la PON1 (malaltia de Tangier i malaltia d' "ull de peix") <sup>226;227</sup>, mentre que altres situacions, tenint el mateix efecte sobre les HDL, no s'associen a decrement de la PON1 <sup>210</sup>. Per exemple, el vegetarianisme amb dieta baixa en greixos, provoquen hipoalfaproteinèmia però estan associades a menor incidència de malaltia isquèmica coronària, de manera que l'estat funcional de les HDL pot ser més important que no pas la seva quantitat <sup>228</sup>. I a la inversa, rates diabètiques induïdes amb estreptozocina presenten nivells de les HDL normals o augmentats, però una PON1 sèrica reduïda <sup>229</sup>. La PON1 està unida principalment (en un 80% en les rates) a les HDL de major densitat (VHDL), que tenen el seu origen en la secreció del fetge i no el catabolisme de les VLDL i constitueixen un 10 % del total de les HDL, basat en el contingut de colesterol <sup>230</sup>. Les VHDL poden ser les partícules específiques responsables del transport de la PON1 en sang, almenys en les rates <sup>209</sup>. Això podria explicar que variacions en el conjunt general de HDL no repercutissin directament en la PON1, sinó més aviat ho fessin variacions d'una determinada subclasse de HDL, de manera que la relació entre PON1 i HDL o apoA1 no fos gaire robusta.

*In vitro*, la PON1 pot metabolitzar les següents biomolècules:

- 1) peròxid d'hidrogen fins un 25% <sup>221</sup>.
- 2) fosfolípids peroxidats o hidroperoxidats (p.e. 1-palmitoil-2-(5)oxovaleroil-sn-glicero-3-fosforilcolina(POVPC), 1-palmitoil-2-glutaroil-sn-glicero-3-fosforilcolina (PGPC), 1-palmitoil-2-(5,6-epoxiisoprostà E2)-sn-glicero-3-fosforilcolina (PEIPC), 1-palmitoil-2-araquidonil-sn-glicero-3-fosforilcolina oxidada (oxPAPC) <sup>231 212;232</sup>.
- 3) EC peroxidats o hidroperoxidats (p.e.linoleat de colesterol hidroperoxidat <sup>221</sup> ).  
Aquestes molècules són destruïdes tant si estan lliures, com si pertanyen a lesions ateroescleròtiques o a LDL parcialment oxidades aïllades <sup>212</sup>. La magnitud de la destrucció és d'un 19% si parlem de peròxids lipídics en general, però d'un 90% si parlem concretament d'hidroperòxids de linoleat de colesterol <sup>212</sup>.
- 4) PAF (**activitat PAF-acetilhidrolasa**) <sup>148</sup>: A més de ser capaç de destruir fosfolípids oxidats, la PON1 també té propietats antiinflamatòries pel fet de presentar una activitat PAF-acetilhidrolasa, és a dir, és capaç d'hidrolitzar el factor pro-inflamatori PAF i convertir-lo en liso-

PAF<sup>148</sup>, que ja no és reconegut pel receptor de PAF. Sempre s'havia postulat que l'enzim PAF-AH es trobava en les LDL i HDL<sup>147</sup>, ja que s'havia trobat activitat PAF-acetilhidrolasa en aquest dos tipus de lipoproteïnes. De totes maneres, no hi ha evidències que confirmin l'existència de l'enzim PAF-AH en les HDL, i un article recent postula que la PON1 sembla ser l'únic enzim responsable de la hidròlisi de PAF en les HDL<sup>148</sup>.

**Experiments *in vivo*:** Un estudi amb ratolins *knock-out* dobles per *PON1/apoE*, demostra per primer cop, *in vivo*, que PON1 protegeix contra l'oxidació de les LDL i IDL. En efecte, els animals dobles *knock-out* presenten un increment de fosfolípids peroxidats (POVPC, PGPC, PEIPC) i liso-fosfatidilcolina en les LDL (39-107%) i en les IDL (17-85%), comparats amb els animals només *knock-out* per *apoE*<sup>233</sup>. A més a més, ratolins *knock-out* per *PON1* presenten més aterosclerosi que els *wild-type* quan s'alimenten amb dieta rica en greixos i colesterol<sup>157</sup>, les seves HDL són incapaces de prevenir l'oxidació de LDL en un model de cultiu cel·lular de paret arterial<sup>157</sup> i les seves HDL i LDL són més susceptibles a oxidació en aquest model de cultiu<sup>157</sup>. En concordància amb aquestes troballes, ratolins que sobreexpressen 5 cops aproximadament la PON1 murina conserven l'activitat LCAT (molt sensible a l'estrès oxidatiu) un 30-40% més que animals controls quan s'incuba el seu plasma en Cu<sup>2+</sup> durant 2h<sup>234</sup>. A més, s'observa una inhibició de la formació d'hidroperòxids lipídics en les HDL, però cap alteració en la concentració d'aquestes lipoproteïnes, el seu tamany o la seva càrrega<sup>234</sup>. Curiosament, la PON1 murina conserva la Cys 283<sup>234</sup>. Un estudi amb ratolins *knock-out* per l'*apoE*, descriu una disminució (40-65%) dels peròxids lipídics continguts en els macròfags peritoneals en injectar-los PON1 humana<sup>235</sup>. Paral·lelament, hi ha un decrement d'entre el 30-40% de l'expressió de mRNA del receptor *scavenger* CD36 i de la captació de LDL oxidades per part dels macròfags<sup>235</sup>.

La raó [apoJ/PON1] es troba incrementada en ratolins susceptibles a desenvolupar estria grassa alimentats amb una dieta pro-aterogènica o amb dieta de pinso als que se'ls ha injectat LDL parcialment oxidades, i també en ratolins deficients en apoE o deficients en el receptor de les LDL amb dieta rica en colesterol. En humans, aquesta raó és significativament més elevada en pacients normolipèmics amb CHD respecte als controls<sup>142</sup>.

**Mecanismes:** Fa uns anys es creia que les HDL protegien contra l'oxidació de les LDL perquè transferien els fosfolípids oxidats de les LDL cap a les HDL i en la superfície d'aquestes últimes s'hidrolitzaven aquests compostos<sup>127</sup>. Actualment, es creu que les HDL no actuen hidrolitzant en la seva superfície els peròxids que li han estat transferits des de les LDL, sinó que les HDL hidrolitzen aquests fosfolípids peroxidats en les mateixes LDL i HDL<sup>117</sup> i que els fragments resultants



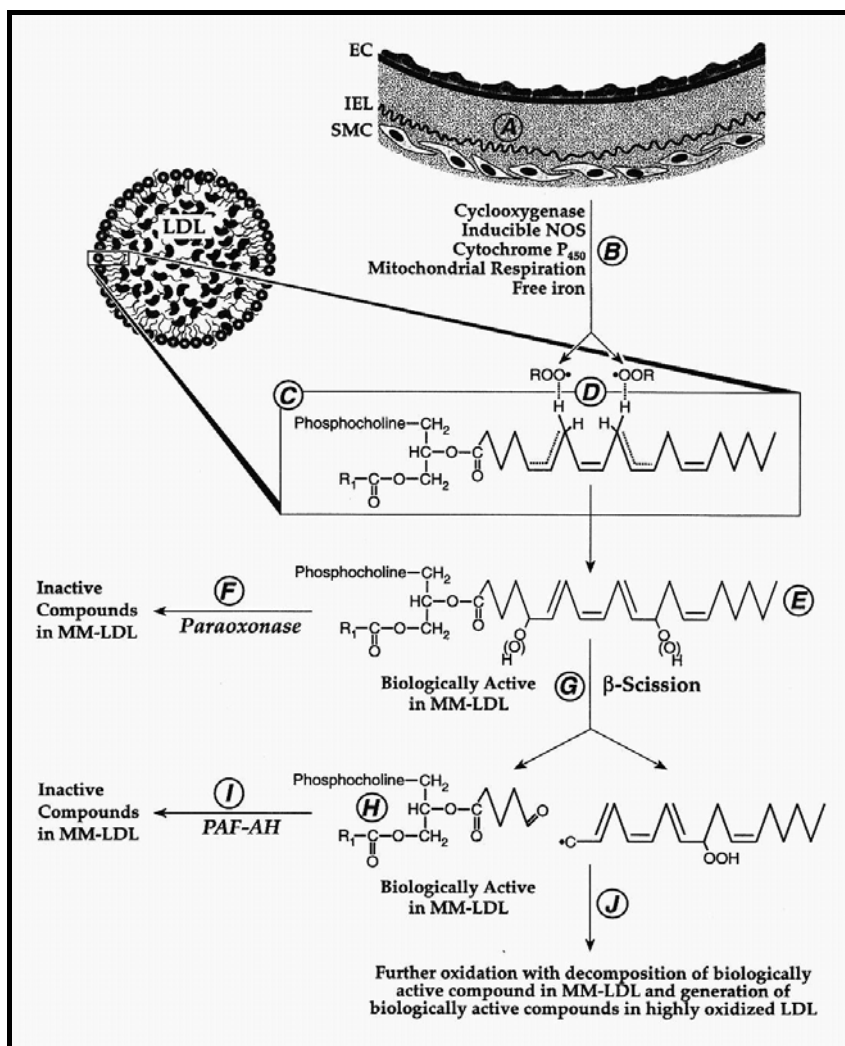
(majoritàriament, liso-lectina i fragments de l'àcid gras de la posició *sn-2*) són transferits de les LDL a les HDL, on el seu efecte és menys citotòxic que en les LDL. Aquesta teoria té el suport de que, si es preincuben les HDL amb  $\text{Cu}^{2+}$ , els lípids d'aquestes lipoproteïnes es peroxiden i s'hi acumulen, però la capacitat de les lipoproteïnes de protegir contra l'oxidació les LDL afegides posteriorment no es veu alterada <sup>211</sup>.

La capacitat antioxidant o de protecció contra l'oxidació de les LDL que exerceix la PON1 sembla ser deguda a dues activitats enzimàtiques sobre les lesions ateroscleròtiques: una **activitat peroxidase-like**, que transforma hidroperòxids de linoleat de colesterol (CL-OOH) i de linoleat lliure (L-OOH) en els seus corresponents hidròxids menys reactius (CL-OOH en CL-OH i L-OOH en L-OH) <sup>236</sup> i que també destrueix el  $\text{H}_2\text{O}_2$  <sup>221</sup>; i una **activitat esterase-like**, que pot convertir hidroperòxids i hidròxids de linoleat de colesterol en hidroperòxids i hidròxids d'àcid linoleic lliure, respectivament (CL-OOH en L-OOH i CL-OH en L-OH, respectivament) <sup>236</sup>. Curiosament, *in vitro* la PON1 no actua sobre EC no oxidats, és a dir, no presenta activitat esterasa sobre substrats que no estan oxidats <sup>236</sup>.

Els fosfolípids més susceptibles de ser oxidats són els que contenen un àcid gras poliinsaturat en la posició *sn-2*. En la LDL humana, el lípid més abundant és el linoleat de colesterol, i el fosfolípid poliinsaturat més abundant és el linoleat de fosfatidilcolina <sup>70</sup>. Aquest últim pot ser peroxidat en el  $\text{C}_9$  de l'àcid linoleic, produint-se una escissió de fragments més curts que se segueixen oxidant fins a aldehids o cetones, que s'uneixen covalentment a l'apoB de les LDL, fent que aquesta sigui reconeguda pel receptor *scavenger* <sup>70</sup>.

Les HDL probablement actuen abans de l'escissió, hidrolitzant l'àcid linoleic ( $\text{C}_{18:2}$ ,  $\Delta_{9,12}$ ) pel punt on està hidroperoxidat, és a dir en el  $\text{C}_9$ , i alliberant-ne un fragment de 9 carbonis, i posteriorment hidrolitzant el fragment restant de 9 carbonis que quedava unit a la posició *sn-2* <sup>70</sup>. La molècula de liso-lectina resultant (sense grup acil en la posició *sn-2*) és molt citotòxica en les LDL, però no en les HDL, on és un producte fisiològic de l'activitat de la LCAT <sup>160</sup>.

S'ha proposat que la PAF-AH i la PON1 podrien tenir funcions coordinades sobre els àcids grassos en posició *sn-2* dels fosfolípids oxidats. Mentre la PAF-AH, present en les LDL, només actuaria sobre àcids grassos curts (de com a màxim 9 carbonis), la PON1 podria actuar també sobre cadenes de més de 9 carbonis <sup>212</sup> (Vegeu figura següent extreta de <sup>212</sup>. Sembla que la PAF-AH no és la responsable de protegir contra l'oxidació de les LDL en les HDL, ja que en ratolins *knock-out* per PON1, l'activitat PAF-AH sèrica no es veu alterada però en canvi les seves HDL no poden protegir contra l'oxidació <sup>157</sup>. Vegeu la figura següent extreta de <sup>212</sup>.



La determinació d'estrès oxidatiu s'ha realitzat en el nostre laboratori amb dues tècniques, TBARS i LDL oxidada, que detallem en l'apartat 3: "Mètodes".

Altres mètodes per determinar l'estat oxidatiu sovint emprats consisteixen en la determinació dels anticossos contra LDL oxidades, anomenats *oxidized-LDL antibodies* (OLAB) i mètodes per avaluar l'oxidació a nivell de DNA, mesurant la concentració de 8-OHdG (8-hidroxi-2'-desoxiguanosina) en orina .

#### **1.5.4 Capacitat o activitat enzimàtica de la PON1 segons factors genètics, químics o bioquímics**

##### **1.5.4.1 Expressió el gen *PON1***

Els estímuls pro-aterogènics, com per exemple la presència de fosfolípids oxidats en cultius cel·lulars, reprimeixen l'expressió del gen *PON1*. També el consum de dietes riques en greix produeix el mateix efecte sobre l'expressió gènica de *PON1* en ratolins. S'ha suggerit, doncs, que la *PON1* podria ser un enzim induïble <sup>197</sup>.

Experiments amb hepatòcits i amb ratolins han descrit que la transcripció del gen *PON1* està modulada per fosfolípids oxidats, com el OX-PAPC que disminueix l'expressió gènica de la *PON1* però augmenta la de l'apoJ <sup>184</sup>. Aquesta modulació es dona via la citocina IL-6 quan la modulació és a curt termini, però per un altre mecanisme a llarg termini <sup>184</sup>.

Com hem comentat, el polimorfisme *PON1*(-107) del promotor es localitza en un lloc d'unió pel factor de transcripció repressor Sp1, lloc important per un gen *TATA-less* com el *PON1* <sup>181;182</sup>, i es relaciona perfectament amb la concentració de la *PON1* <sup>183</sup>. De fet aquest polimorfisme podria explicar el 22% de variabilitat de la concentració de la *PON1* <sup>167</sup>. Dos altres polimorfismes del promotor, *PON1*(-162) i *PON1*(-909), també poden variar, en un ordre de dos cops, la concentració de *PON1* <sup>166</sup>. Coincideix que el polimorfisme *PON1*(-162) es localitza dins un lloc d'unió per factor de transcripció NF-1 <sup>166</sup> i dins d'una regió molt homòloga a un lloc de resposta a la citocina pro-inflamatòria IL-6, la qual disminueix la expressió de *PON1* en cèl·lules HepG2 i l'activitat paraoxonasa en ratolins <sup>184</sup>.

##### **1.5.4.2 Genotips de *PON1*-192**

La capacitat de *PON1* de catalitzar la hidròlisi de diazoxó, de soman i de sarín sembla ser major per part de l'al·loenzim Q que pel R <sup>158</sup>. Contràriament, la capacitat d'hidròlisi de paraoxó i de tiolactona d'homocisteïna és major en el R que en el Q <sup>173</sup>, i la d'hidròlisi de l'oxó de clorpirifós i de fenilacetat no difereix entre al·loenzims <sup>158</sup>. El canvi de residu Q per R, i conseqüent canvi de càrrega de l'enzim, podrien afectar al número de recanvi de substrat paraoxó, el qual és elevat tant en al·loenzim R com en la *PON1* del conills, que tenen una lisina (de càrrega similar a la de l'arginina) en la posició 192 <sup>159</sup>. Els al·loenzims Q i R podrien actuar sobre diferents metabòlits dins la cadena de reaccions per metabolitzar un mateix substrat <sup>213</sup>.

Les activitats paraoxonasa i arilesterasa de la *PON1* humana purificada es poden estimular amb alguns fosfolípids (augment de les  $V_{max}$  però no de les  $K_M$ ), essent la dilauroilfosfatidilcolina el d'efecte més estimulador <sup>237</sup>. L'estimulació és diferent segons els al·loenzims Q i R de *PON1*-192, i

aquestes diferències són substrat-dependents <sup>200</sup>. S'ha suggerit que la interacció entre la PON1 i els fosfolípids pot ser important ja que la PON1 sèrica està associada als lípids de les HDL <sup>238</sup>.

Hi ha molta controvèrsia sobre l'efecte del genotip en la capacitat de la PON1 de protegir contra l'oxidació de LDL. Alguns autors consideren que l'al·loenzim Q pel polimorfisme *PON1*-192 i el M del polimorfisme *PON1*-55 protegeixen millor contra l'oxidació de les LDL que el R i l'L, respectivament. Una revisió del tema publicada l'any 2001 <sup>160</sup> també li dóna suport a aquesta idea <sup>213;236;239</sup>. En efecte, ajustant la quantitat d'enzim per l'activitat arilesterasa, l'al·loenzim Q té major capacitat i rapidesa reduint lipoperòxids de la lesió ateroscleròtica que l'al·loenzim R <sup>236</sup>. Tot i així, en els experiments <sup>201</sup> s'utilitzen LDL pròpies de cada individu, enlloc de LDL estandarditzades per totes les mostres. A més, aquestes observacions són fetes en condicions de concentració baixa de proteïna. En canvi, la concentració de proteïna de les HDL és més elevada en condicions fisiològiques i llavors no s'observen diferències, respecte al genotip, de la capacitat de protecció de la PON1 contra l'oxidació de les LDL ni del grau d'inactivació de la PON1 <sup>211</sup>. En experiments amb fosfolípids oxidats que indueixen la migració de monòcits en cultius de cèl·lules de paret arterial, la PON1 redueix la migració també sense diferències segons el genotip <sup>201</sup>. S'ha descrit que l'al·loenzim Q és més eficient inhibint l'oxidació de les LDL si s'afegeix en l'etapa d'iniciació de l'oxidació, mentre que l'al·loenzim R mostra major eficiència si s'afegeix en la fase de propagació, és a dir, una hora després de l'inici de l'oxidació <sup>213</sup>.

Com ja hem dit, durant l'oxidació lípídica es produeix la inhibició de les activitats paraoxonasa, arilesterasa i de protecció contra l'oxidació de les LDL, però hi ha també discrepàncies sobre si algun dels al·loenzims conserva millor que l'altre aquestes activitats després de l'oxidació. Per una banda, alguns autors creuen que l'al·loenzim Q de la PON1 conserva millor que el R les activitats paraoxonasa, arilesterasa i de protecció contra l'oxidació de les LDL <sup>201;236</sup>. Pel nostre coneixement, no s'ha estudiat el que li succeeix a l'activitat lactonasa <sup>213;239</sup>.

En efecte, en experiments *in vitro* on es provoca l'oxidació de LDL amb  $\text{Cu}^{2+}$  (incubació durant 4h i ajustant la quantitat de proteïna PON1 amb l'activitat arilesterasa) <sup>213</sup> o en experiments on s'incuben les HDL amb homogenats de lesions de l'artèria caròtida o coronària i es mesura l'eliminació de lipoperòxids (incubació durant 24h i ajustant la quantitat de proteïna PON1 amb l'activitat arilesterasa) <sup>236</sup>, s'observa que les activitats paraoxonasa i arilesterasa es redueixen de forma més exagerada en el cas de l'al·loenzim R que en el de l'al·loenzim Q. Per exemple en el primer cas <sup>213</sup>, la reducció de l'activitat arilesterasa és d'un 55% i 28% per l'al·loenzim R i el Q, respectivament, i pel segon cas <sup>236</sup>, d'un 45% i 15%, respectivament. En experiments similars, on

s'incuben conjuntament HDL i LDL pròpies de cada individu amb  $\text{Cu}^{2+}$  durant 6h, la capacitat de protegir contra l'oxidació es conserva millor en les HDL d'individus QQ (57%), que dels QR (25%) i dels RR (1%)<sup>201</sup>.

Per l'altra banda, un estudi amb pacients amb NIDDM mostra que la reducció de l'activitat paraoxonasa deguda a l'oxidació (incubació amb LDL i  $\text{Cu}^{2+}$  durant 6 h i ajustant per mg de HDL) resulta ser d'un 70% de forma similar en ambdós genotips QQ i RR<sup>211</sup>. Cal tenir en compte, però, que en aquest estudi l'ajust es fa per quantitat de HDL i no de la PON1, i que a més, la diabetis confereix un estat oxidatiu basal incrementat en comparació amb individus sans<sup>211</sup>.

S'ha descrit que l'al·loenzim R presenta una quantitat de la PON1 ajustant per les HDL 1.3 cops major que el Q, una activitat paraoxonasa també 6 cops major i una activitat específica paraoxonasa igualment 5 cops major en pacients diabètics tipus 2<sup>211</sup>.

Antigament els fenotips de la PON1 es determinaven amb l'estimulació de l'activitat paraoxonasa amb NaCl i la raó [activitat paraoxonasa/activitat arilesterasa]<sup>199</sup>. El grau d'estimulació és consistent i reproducible en mostres congelades durant almenys dos anys<sup>240</sup>. L'al·loenzim R presenta una activitat paraoxonasa superior i s'estimula en major grau enfront NaCl 1 M que l'al·loenzim Q. La raó [activitat paraoxonasa/activitat arilesterasa] de l'al·loenzim R té un valor aproximat de 8, mentre que la del Q és de 1<sup>199</sup>. Sembla que els 2 al·loenzims tenen un nombre de recanvi similar per l'activitat arilesterasa però força diferent per l'activitat paraoxonasa<sup>199</sup>.

#### 1.5.4.3 Genotips de *PON1-55*

En experiments on s'incuben conjuntament HDL i LDL amb  $\text{Cu}^{2+}$  durant 6h, la capacitat de protegir contra l'oxidació es conserva millor en les HDL d'individus MM (49%) que no pas els LL(22%) o LM (29%) pel que fa al polimorfisme *PON1-55*<sup>201</sup>. Però, com hem comentat en l'apartat anterior, hi ha controvèrsia sobre el tema ja que les LDL utilitzades en aquest assaig són les pròpies de cada individu. Pels nostres coneixements, no s'ha estudiat si l'oxidació lipídica altera de forma diferent les activitats paraoxonasa, arilesterasa o lactonasa segons el polimorfisme *PON1-55*.

Aquest polimorfisme determina en gran part la concentració enzimàtica de PON1 per varies raons. Primer, el polimorfisme *PON1-55* es troba en equilibri de lligament amb un polimorfisme del promotor del gen, el *PON1-(-108)*, que controla l'expressió gènica. Segon, *PON1-55* independentment dels altres polimorfismes de PON1, encara explica un 4% de la variabilitat de l'activitat arilesterasa, representativa de la concentració. De fet, la proteïna corresponent a l'al·lel L de *PON1-55* és més estable que la M<sup>179</sup>.

#### 1.5.4.4 Activitat enzimàtica de la PON1 en funció de la presència de Cys 283

La presència de cisteïna en el residu 283 de l'enzim PON1 (Cys 283) és indispensable per exercir l'activitat tiolactonasa <sup>200</sup> i la protecció contra l'oxidació de LDL per part de l'enzim PON1. La Cys283 de la PON1 és indispensable per l'activitat antioxidant de la PON1, de manera que si el residu es muta per una alanina o una serina mitjançant mutagènesi dirigida, o es bloqueja utilitzant un agent bloquejant de grups sulfur, l'enzim passa a ser incapaç de reduir el contingut de peròxids lipídics en lesions a l'artèria caròtida <sup>236</sup>. Sembla ser que durant l'oxidació lipídica, els òxids lipídics justament ataquen aquesta Cys283.

La presència d'aquest residu intacte no té cap mena d'importància per les activitats d'hidròlisi d'organofosfats i arilèsters (activitats paraoxonasa i arilesterasa, respectivament), però aquestes activitats es veuen reduïdes si el grup sulfur de la Cys 283 és atacat per peròxids lipídics <sup>213;215</sup>.

Inicialment, es cregué que la hidròlisi del paraoxó per part de la PON1 comportava la fosforilació del residu Cys283 de l'enzim amb la conseqüent inactivació de la seva capacitat enzimàtica (model de Augustinsson) <sup>241</sup>. Contràriament i de forma més recent, Sorenson i cols. van observar que la substitució de la Cys 283 per una alanina no tenia cap efecte sobre l'activitat paraoxonasa <sup>155</sup>.

#### 1.5.4.5 Dependència al Ca<sup>2+</sup> de l'activitat enzimàtica de la PON1

Les activitats d'hidròlisi d'organofosfats (com l'activitat paraoxonasa <sup>213</sup> i la hidròlisi de diazoxó <sup>158</sup>, hidròlisi arilèsters (com l'activitat arilesterasa) <sup>213</sup> i activitats tiolactonases <sup>217 200</sup> són dependents de la concentració de Ca<sup>2+</sup>, mentre que la capacitat de protecció contra la oxidació de les LDL es considera que no en depèn <sup>213</sup>. De fet, la quelació de Ca<sup>2+</sup> amb EDTA inhibeix l'activitat paraoxonasa en un 90%, mentre que la capacitat protectora només disminueix entre un 73-46% <sup>212</sup>.

A partir de les diferències respecte al Ca<sup>2+</sup> i de les esmentades respecte la Cys283, s'ha suggerit que 1) el centre actiu responsable de les activitats arilesterasa i paraoxonasa no és el mateix que el centre actiu responsable de protegir contra l'oxidació; o bé 2) existeix un sol centre actiu responsable de totes les activitats enzimàtiques de la PON1, el qual sofreix canvis conformacionals que afecten només a certes activitats enzimàtiques <sup>213</sup>.

#### 1.5.4.6 Inactivació de l'activitat enzimàtica de la PON1 per oxidació

La capacitat de la PON1 de protegir contra l'oxidació de les LDL sembla que es veu acompanyada per una inactivació de l'enzim degut a les interaccions del grup sulfur de la Cys 283 de l'enzim amb els lípids oxidats formats durant l'oxidació de les LDL <sup>213;215</sup>.

Pel que fa a l'activitat paraoxonasa, l'augment de l'estrès oxidatiu, mesurat com a TBARS, produït en afegir un inhibidor de la PON1 en un medi amb HDL, provoca una reducció d'aquesta activitat <sup>215</sup>. En aquest mateix sentit, els ratolins *knock-out* per *apoE*, que presenten aterosclerosi prematura i estrès oxidatiu elevat, sofreixen un decrement accentuat de l'activitat paraoxonasa amb l'edat <sup>215</sup>. L'activitat arilesterasa s'inhibeix en un 35-61% <sup>215</sup> si l'enzim és atacat en la posició Cys283 per peròxids lipídics (lliures o continguts en LDL oxidades), però es considera que aquesta activitat no és dependent de la Cys283, ja que no resulta alterada si es canvia la natura del residu en la posició 283 per mutagènesi dirigida o es pretracta l'enzim bloquejant el grup sulfur de la Cys amb un agent com el PHMB <sup>215</sup>. L'atac de peròxids lipídics podrien comportar un canvi conformacional de l'enzim o un impediment estèric que alterés l'activitat arilesterasa.

Segons alguns autors, la inactivació de l'enzim no és la mateixa pels dos al·loenzims del polimorfisme *PON1*-192. La reducció de l'activitat paraoxonasa, l'activitat arilesterasa i la capacitat de protecció contra l'oxidació de les LDL, que té lloc durant l'oxidació, seria menor per l'al·loenzim Q que l'al·loenzim R, i alhora el primer protegiria millor contra l'oxidació. Però altres estudis indiquen que l'oxidació inactiva en igual mesura a ambdós al·loenzims respecte l'activitat paraoxonasa i respecte la capacitat de protecció contra l'oxidació, avaluada com l'acumulació de peròxids durant la incubació de LDL amb  $\text{Cu}^{2+}$  i l'increment de mobilitat electroforètica de les LDL, conservant només al voltant d'un 30% de les activitats inicials <sup>211</sup>.

Respecte les activitats paraoxonasa, arilesterasa i lactonasa, s'ha descrit que tant el paraoxó, el fenilacetat o la tiolactona d'homocisteïna no són inhibidors competitius de les altres dues activitats, suggerint-se que els centres actius podrien ser diferents per cada activitat <sup>217</sup>.

#### 1.5.4.7-Altres factors que modifiquen l'activitat de la PON1

Com s'ha comentat en l'apartat "Relació amb HDL i capacitat antioxidant", la concentració de la PON1 pot estar limitada per la quantitat de HDL existent, i més concretament, per la subfracció de HDL que conté PON1. Així doncs, s'ha observat que pacients amb la malaltia de Tangier o malaltia d' "ull de peix" <sup>226;227</sup>, que provoquen hipoalfaproteinèmia, conserven la funcionalitat de la PON1, tot i que presenten una activitat paraoxonasa reduïda causada per una disminució en la concentració de la PON1 i no per una inactivació de l'enzim <sup>210</sup>. Altres malalties que no són deficiències congènites de les HDL, sinó trastorns que cursen amb concentracions baixes de HDL com la diabetis, l'IAM i la insuficiència renal, també presenten disminucions de PON1 com expliquem més detalladament en el següent apartat.

Resumint el que s'ha dit en aquest apartat, els peròxids lipídics inhibeixen les activitats paraoxonasa, l'arilesterasa, la lactonasa i la de protecció contra l'oxidació.

La quelació de  $\text{Ca}^{2+}$  inhibeix les tres primeres activitats <sup>211</sup>.

La temperatura elevada d'uns 60 °C inhibeix a les activitats paraoxonasa, arilesterasa i de protecció contra l'oxidació <sup>213</sup>, però la última no es veu afectada per temperatures de 56°C <sup>211;211;212</sup>.

## **1.6 Patologia orgànica relacionada amb la PON1**

Molts estudis han relacionat la PON1 amb patologies orgàniques com les malalties cardiovasculars, la hipercolesterolèmia familiar, la diabetis, les malalties neuronals o la insuficiència renal. A continuació descrivim la relació d'aquestes patologies amb a) l'enzim PON1, és a dir, la seva concentració de PON1 i les seves activitats enzimàtiques i b) els polimorfismes de *PON1*.

### **1.6.1 Malalties cardiovasculars (CHD)**

Les malalties cardiovasculars (CHD) s'associen sovint a nivells baixos de HDL, lipoproteïna on es localitza la PON1. A més, els nivells sèrics d'activitat paraoxonasa són significativament baixos després d'un IAM <sup>204</sup> i es mantenen reduïts durant les 2h – 42 dies després del començament dels símptomes <sup>205</sup>. Fins i tot abans del començament dels símptomes clínics de la CHD, l'activitat paraoxonasa està disminuïda en pacients diabètics <sup>242</sup>. Els nivells d'activitat paraoxonasa també es troben baixos en pacients amb malalties fortament associades a CHD com la hipercolesterolèmia familiar <sup>207</sup>, la insuficiència renal o la diabetis mellitus <sup>206</sup>. Totes aquestes premisses van portar a estudiar la relació entre la PON1 i les CHD.

Nombrosos articles apunten que l'associació entre CHD i nivells baixos d'activitat no és trivial, degut a que l'activitat paraoxonasa està fortament modulada pel genotip *PON1-192* i presenta una variabilitat inter-individual molt elevada. Així no sembla adequat utilitzar únicament l'activitat o concentració de la paraoxonasa <sup>201</sup>, ni tampoc els genotips de *PON1* per separat <sup>243</sup>, per predir directament el risc de CHD, però pocs estudis fins al moment determinen alhora la genètica de la PON1 i l'activitat paraoxonasa o l'activitat arilesterasa <sup>223;244-246</sup>. En definitiva, l'anàlisi del fenotip juntament amb el genotip semblen indispensables per a poder predir la CHD <sup>247</sup>, i mentre no es disposi d'un assaig de rutina basat en la hidròlisi de peròxids lipídics, Mackness i cols. aconsellen determinar l'activitat paraoxonasa, la d'hidròlisi de diazoxó o la concentració de PON1 en tots els estudis epidemiològics que tractin la relació de la PON1 i les CHD <sup>244</sup>.



### a) L'enzim PON1:

La concentració i l'activitat paraoxonasa es troben reduïdes fins a un 50% en pacients amb CHD, independentment del genotip *PON1-192* o *PON1-55*<sup>244;248</sup>. A més, alguns d'aquests pacients tenen valors normals de c-HDL, però les seves HDL protegeixen insuficientment contra la migració de monòcits induïda per LDL en cultius de cèl·lules de la paret arterial<sup>142</sup>. Comparant dues poblacions amb taxes de CHD diferents (Belfast i Toulouse), es troba que la concentració de PON1 és menor en la població de major taxa de CHD (56 enfront de 71 µg/ml) i l'activitat paraoxonasa de cada grup genotípic de *PON1-192* (QQ,QR i RR) és diferent en cada població, és a dir, l'activitat paraoxonasa dels individus QQ és menor i la dels RR és major, respectivament, en la població de taxa més elevada, que en l'altra<sup>223</sup>. No hi ha consens en l'afirmació que la raó [apoJ/activitat paraoxonasa] predigui la CHD millor que no pas la raó [colesterol total/c-HDL]<sup>142;244</sup>.

Els pacients amb CHD que a més presenten una altra patologia associada, tenen comportaments diversos. Per exemple, els que a més de CHD són trasplantats renals presenten activitats paraoxonasa i arilesterasa similars als trasplantats sense CHD<sup>246</sup>. Els que a més de CHD són diabètics presenten l'activitat paraoxonasa, arilesterasa i la concentració de PON1 més elevats que els seus homòlegs sense CHD<sup>178</sup>. Això s'ha explicat dient que l'homozigosi LL de *PON1-55* en la diabetis sembla ser un factor de risc independent per CHD, a més d'estar en equilibri de lligament amb l'al·lel R del *PON1-192*.

Alguns autors consideren que l'activitat paraoxonasa prediu millor el risc d'arteriosclerosi de l'artèria caròtida<sup>249</sup> o de CHD<sup>244</sup> que no pas els genotips *PON1-55* o *PON1-192*, considerats aïlladament, tot i que els nivells d'activitat enzimàtica se superposen considerablement entre genotips d'un polimorfisme<sup>247</sup>.

### b) Polimorfismes de PON1:

Ruiz i cols.<sup>250</sup> van descriure per primer cop la relació entre el genotip del polimorfisme *PON1-192* i les CHD en una població caucàsica diabètica. Concretament van trobar que tant l'al·lel R del polimorfisme *PON1-192*, com els genotips portadors d'aquest al·lel (RR o QR) augmentaven el risc de patir un IAM. Amb posterioritat, estudis cas-control han intentat replicar aquests resultats, obtenint-se discordances importants.

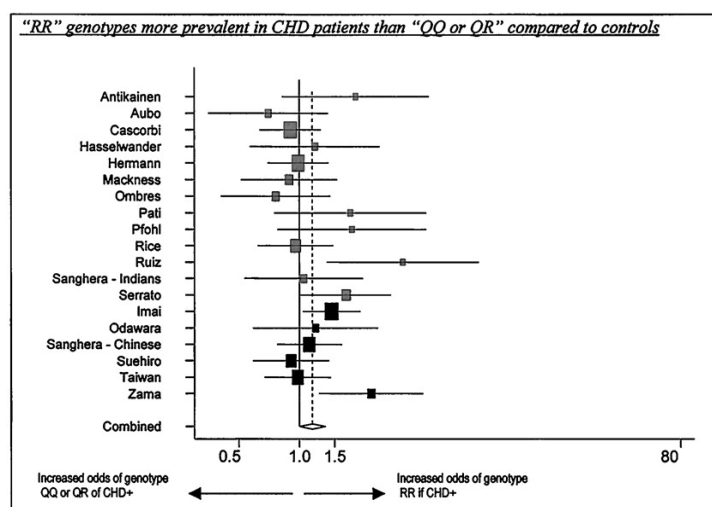
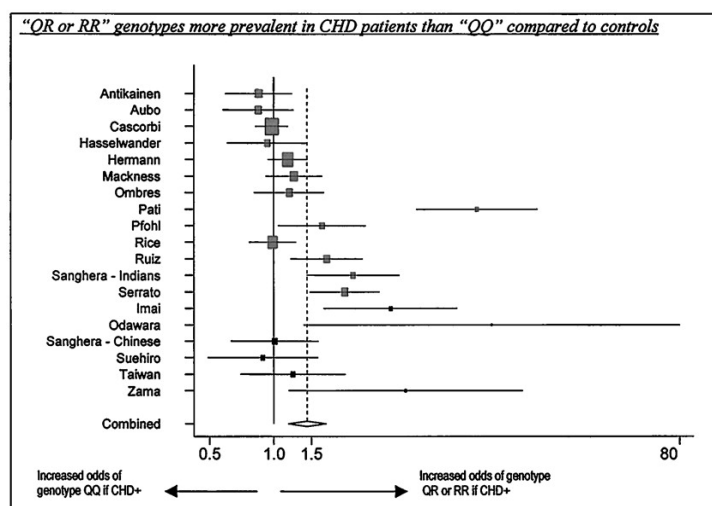
Per exemple, estudis portats a terme amb indis de Singapur (no xinesos)<sup>251</sup> i de la Índia<sup>245</sup>, amb japonesos<sup>252 253</sup>, i amb nord- i centre-americans<sup>254 245 255</sup> donen suport a l'associació del genotip del polimorfisme *PON1-192* i les CHD. Paral·lelament, la comparació de dues poblacions, la irlandesa de Belfast i la francesa de Toulouse, amb taxa de CHD molt diferent (a Belfast tres cops major que a Toulouse) indica que hi ha una major freqüència de l'al·lel R a la població irlandesa<sup>223</sup>.

Contràriament, altres estudis cas-control conduïts en població japonesa <sup>256</sup>, xinesa <sup>257</sup>, turca <sup>258</sup> i caucàsica <sup>185;244;259-263</sup> no poden demostrar l'associació. Un estudi prospectiu en individus majors de 84 anys seguits durant 10 anys no troba associació dels polimorfismes *PON1-192* i augment de mortalitat cardiovascular <sup>264</sup>. El genotip *PON1-192* tampoc no s'associa a la severitat, progressió o regressió de l'aterosclerosi coronària segons un altre estudi prospectiu <sup>265</sup>.

A la taula es mostren els principals estudis d'associació

| Estudi  | Població / patologies          | P      | CHD +<br>(†confirmats amb coronariografia) |                | CHD -           |                |
|---|--------------------------------|--------|--|----------------|-----------------|----------------|
|   |                                |        | N  | Freq. al·lel R | N               | Freq. al·lel R |
| (*diferència estadísticament significativa, ns no significatiu) |                                |        |  |                |                 |                |
| Ruiz <sup>*250</sup>  | Caucàsica, NIDDM               | 0.03   | 263  | 0.35           | 171             | 0.26           |
| Pfohl <sup>*266</sup>   | Caucàsica, NIDDM               | 0.02   | 170†                                       | 0.34           | 118             | 0.25           |
| Odawara <sup>*267</sup>   | Caucàsica, NIDDM               | 0.003  | 42   | 0.69           | 122             | 0.58           |
| Serrato <sup>*254</sup>   | USA                            | 0.0001 | 223†                                       | 0.44           | 247             | 0.31           |
| Mackness <sup>*223</sup>  | Caucàsica, Belfast vs Toulouse | 0.007  | Belfast<br>165                             | 0.33           | Toulouse<br>186 | 0.24           |
| Gardemann <sup>*268</sup>                                       | Caucàsica, <62 anys            | 0.015  | 760  | 0.30           | 304             | 0.25           |
| Hasselwander <sup>246</sup>                                     | Caucàsica, Trasplantats renals | ns     | 103  | 0.30           | 388             | 0.31           |
| Hermann <sup>259</sup>  | Caucàsica                      | ns     | 642†                                       | 0.31           | 701             | 0.30           |
| Antikainen <sup>260</sup>                                       | Caucàsica                      | ns     | 380  | 0.26           | 169             | 0.26           |
| Aubó <sup>269</sup>   | Caucàsica                      | ns     | 156  | 0.27           | 310             | 0.30           |
| Cascorbi <sup>185</sup>   | Caucàsica                      | ns     | 963†                                       | 0.27           | 971             | 0.27           |
| Rice <sup>262</sup>   | Caucàsica                      | ns     | 440†                                       | 0.30           | 527             | 0.30           |
| Ombres <sup>270</sup>   | Caucàsica                      | ns     | 472†                                       | 0.30           | 204             | 0.27           |
| Zama <sup>*252</sup>  | Japonesa                       | 0.002  | 75   | 0.74           | 115             | 0.59           |
| Imai <sup>*253</sup>  | Japonesa                       | <0.001 | 210  | 0.75           | 431             | 0.65           |
| Suehiro <sup>256</sup>  | Japonesa                       | ns     | 134  | 0.60           | 252             | 0.62           |
| Ko <sup>257</sup>   | Xinesa                         | ns     | 218  | 0.65           | 218             | 0.64           |
| Sanghera-Singapur <sup>251</sup>                                | Xinesa                         | ns     | 246  | 0.59           | 244             | 0.53           |
| Sanghera-Singapur <sup>*251</sup>                               | India                          | 0.014  | 122  | 0.43           | 165             | 0.33           |
| Pati <sup>*245</sup>  | India                          | 0.0001 | 120  | 0.45           | 80              | 0.17           |
| Aynacioglu <sup>258</sup>                                       | Turca                          | ns     | 96   | 0.38           | 105             | 0.31           |
| Sen-Banerjee <sup>*255</sup>                                    | Costa Rica                     | 0.008  | 492  | 0.27           | 518             | 0.24           |

Uns metaanàlisi publicat recentment ressaltava una certa heterogeneïtat de les *odds ratio* (OR) entre aquests estudis, i conclou que l'associació entre els genotips portadors de l'al·lel R de *PON1-192* i la presència de CHD és estadísticament significativa, amb una OR de 1.5 (interval de confiança del 95%, IC95% 1.17-1.77), com es pot veure en la següent figura extreta de <sup>244</sup>, sense evidència d'efecte de raça, però sí d'efecte de biaix de publicació (tots els estudis amb tamany de mostra petit presenten efectes grans, com si els estudis petits amb resultats no significatius no s'haguessin publicat) <sup>244</sup>. Quan el metaanàlisi avalua el genotip RR enfront la resta, la OR es manté significativa, essent de 1.16 (IC 95% 1.00-1.35) <sup>244</sup>. Cal tenir en compte les diferències ètniques de les poblacions estudiades, la varietat de les patologies analitzades i que els estils de vida són diferents segons els estudis.



Note: ■ Oriental Studies, ■ Caucasian Studies

Alguns autors, igual que nosaltres, consideren que el genotip *PON1-192* modula el risc de CHD només en presència d'altres factors de risc de CHD, com són la diabetis mellitus, el consum de tabac, l'edat o nivells baixos de c-HDL sèric.

Concretament, els individus portadors de l'al·lel R que, a més són diabètics, tenen un major risc d'IAM que els QQ, tant els caucàsics amb una OR de 2.65 (IC 95%1.04-6.75)<sup>266;269</sup>, com els japonesos<sup>267</sup>.

Altres factors poden ser importants en la modulació del risc. Tal és el cas de la edat, l'hàbit tabàquic o la concentració basal de c-HDL. En efecte, s'ha descrit que el risc de CHD és més gran en els individus homozigots QQ que en els portadors de l'al·lel R si són fumadors<sup>271</sup>, si tenen una edat avançada<sup>272</sup> o concentracions baixes de c-HDL<sup>273</sup>. Altres troballes indiquen en canvi que l'efecte deleteri correspon a l'al·lel R i es dona només en els individus amb c-HDL elevat<sup>261</sup>, que la freqüència de l'al·lel R dels octogenaris sense símptomes d'aterosclerosi sembla ser menor (13%) comparada amb els octogenaris amb aterosclerosi (37%) i amb controls no octogenaris (46%)<sup>274</sup>, i que els caucàsics joves portadors de l'al·lel R presenten un risc incrementat d'IAM<sup>268</sup> o de malaltia vascular cerebral<sup>275</sup>.

No s'ha pogut demostrar cap efecte de l'al·lel R respecte a les CHD en trasplantats renals<sup>246</sup>.

El polimorfisme *PON1-55* modula la concentració de PON1 i això podria explicar la seva associació amb el risc de patir CHD. Algunes referències indiquen que els polimorfismes *PON1-55* i *-192* es troben en desequilibri de lligament i aquest podria explicar la relació dels polimorfismes esmentats amb la CHD<sup>178</sup>.

S'han descrit associacions entre l'al·lel L i la CHD en població caucàsica<sup>276;276-278</sup>. En canvi, altres observacions en indis asiàtics, xinesos<sup>279</sup> i també en població caucàsica<sup>244;268;280</sup> són negatives. En el mateix sentit, un estudi prospectiu amb majors de 84 anys tampoc pot relacionar l'al·lel L amb més risc cardiovascular<sup>264</sup>.

Si s'avalua conjuntament amb altres factors de risc de CHD, com la diabetis<sup>178</sup> o la història familiar de CHD prematura<sup>281</sup>, el genotip LL resulta ser un factor de risc per CHD (independentment de l'equilibri de lligament amb el *PON1-192*)<sup>178</sup> o ser un factor de risc per tenir una baixa tolerància a la glucosa ( $p=0.0007$ )<sup>281</sup> respectivament.

Recentment s'ha descrit que el polimorfisme *PON1-55* sembla estar en equilibri de lligament amb el *PON1-(-108)* del promotor, la qual cosa que podria explicar l'efecte del primer<sup>183</sup>. El polimorfisme *PON1-(-108)* del promotor, que sembla modular l'expressió del gen, s'ha descrit com un factor de risc de patir CHD en diabètics tipus II, independent del polimorfisme *PON1-192*, de

manera que el genotip TT (determinant d'una baixa expressió de PON1) està sobrerrepresentat en diabètics tipus II amb CHD amb una OR de 1.64 (IC 95% 1.03-2.61) <sup>183</sup>. A més, aquest el polimorfisme *PON1*(-108) sembla modular el risc exercit pel *PON1*-192 <sup>183</sup>.

Pel que fa al polimorfisme *PON1*(-907), l'al·lel C d'expressió baixa de PON1, sembla associar-se a un augment de risc de CHD, però només en homes menors de 50 anys <sup>282</sup>.

### **1.6.2 Hipercolesterolèmia familiar**

La hipercolesterolèmia familiar (HF) és una malaltia monogènica autosòmica dominant que té una prevalença del 0.2% i que es caracteritza per presentar un nombre reduït o nul de receptors funcionals de les LDL, degut a mutacions en el gen del receptor de les LDL, de les quals se n'han descrit al voltant de 700 (J.L. Goldstein, *73rd European Atherosclerosis Society Congress*, Salzburg, Austria 8 de Juliol 2002). Els individus amb HF poden ser homozigots o heterozigots. Els homozigots, que presenten mutacions en les dues còpies del gen, acostumen a ser *compound heterozygotes*, és a dir, són heterozigots per 2 mutacions diferents (J.L. Goldstein, *73rd European Atherosclerosis Society Congress*, Salzburg, Austria 8 de Juliol 2002). Com a conseqüència de les mutacions en el receptor de les LDL, la majoria dels pacients amb HF presenten hiperlipidèmia del fenotip IIa (vegeu la taula següent), o el fenotip tipus IIb en algun cas. La HF no s'associa però a hipertensió, obesitat o diabetis.

Classificació de Fredrickson de les hiperlipidèmies adaptada per la OMS <sup>283;284</sup>.

| <b>Fenotip</b> | <b>Lipoproteïnes elevades</b><br>(mobilitat electroforètica) | <b>CT</b>  | <b>TG</b> | <b>Atero-geneïtat</b> | <b>Associada a trastorns genètics</b>  |
|----------------|--|------------|-----------|-----------------------|--|
| <b>I</b>       | Qm en dejuni   | Normal o ↑ | ↑↑↑↑      | no observ.            | defic. fam. de LPL<br>o de apoCII  |
| <b>IIA</b>     | LDL<br>(betalipoproteïnes)                                   | ↑↑         | Normal    | ++++                  | <b>HF</b><br>Rec de LDL anormal<br>Hiperlipidèmia familiar combinada<br>Hipercolesterolèmia poligènica |
| <b>IIB</b>     | LDL+VLDL (beta i prebetalipoproteïnes)                       | ↑↑         | ↑↑        | +++                   | <b>HF</b><br>Hiperlipidèmia familiar combinada   |
| <b>III</b>     | IDL<br>(banda beta ampla)                                    | ↑↑         | ↑↑↑       | +++                   | Disbetaproteinèmia familiar  |
| <b>IV</b>      | VLDL<br>(prebetalipoproteïnes)                               | Normal o ↑ | ↑↑        | +                     | Hipertrigliceridèmia familiar<br>Hiperlipidèmia familiar combinada                                     |
| <b>V</b>       | Qm en dejuni + VLDL<br>(prebetalipoproteïnes)                | Normal o ↑ | ↑↑↑↑      | +                     | Hipertrigliceridèmia familiar<br>Hiperlipidèmia de tipus familiar de múltiples lipoproteïnes.          |

La HF es detecta en néixer o poc després, arribant a uns nivells de CT de 350-500 mg/dl en els heterozigots i 700-1200 mg/dl en els homozigots. Sovint, en els homozigots, es presenta CHD abans dels 20 anys, i, entre els 30-50 anys d'edat en els homes heterozigots i una dècada més tard en les dones. Els pacients amb HF presenten xantomes i, concretament en els homozigots, els xantomes cutanis apareixen ja en els primers mesos de vida. En els homozigots, l'aterosclerosi precoç és greu i generalitzada i el seu tractament consisteix en plasmafèresi de les LDL i trasplantament de fetge, ja que els fàrmacs o la dieta hipolipemiant no són eficaços. L'aterosclerosi també afecta als heterozigots, que s'han de tractar amb dieta hipolipemiant i fàrmacs. En els familiars de primer grau la prevalença de la HF és del 50% <sup>284;285</sup>. Els individus amb HF heterozigota amb mutacions severes en el receptor de les LDL presenten valors de c-LDL més elevats que els de mutacions moderades, tant a l'inici com sota tractament farmacològic. En canvi, el percentatge de canvi del c-LDL degut al tractament no depèn de la gravetat de les mutacions <sup>286</sup>.

### **1.6.2.1 Perfil lipídic**

#### **a) L'enzim PON1:**

Els conills amb hipercolesterolèmia induïda per una dieta rica en colesterol presenten un augment del CT, cap canvi en el c-HDL, però una disminució de l'activitat paraoxonasa d'un 43% <sup>287</sup>. Tot i així, en el moment d'iniciar la dieta pro-aterogènica o en finalitzar-la s'ha observat que l'activitat paraoxonasa correlaciona positivament amb el c-HDL <sup>287</sup>. La disminució en l'activitat paraoxonasa també s'ha observat en conills transgènics per l'apoAI humana <sup>287</sup>.

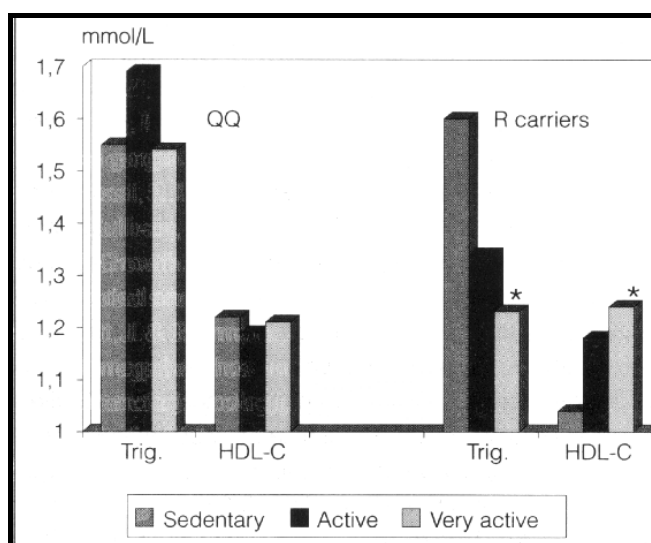
En humans sans, el c-HDL es pot predir per l'activitat arilesterasa (els dos correlacionen bé), però no per l'activitat paraoxonasa ni pel genotip *PON1-192* <sup>288</sup>. En humans amb HF, l'activitat paraoxonasa representa només un 52 % de la dels controls, tot i no haver diferències de c-HDL. Això pot indicar que la PON1 disminueix la seva activitat independentment de la quantitat de HDL, i que per tant, la PON1 no actua com una apoproteïna <sup>207</sup>.

#### **b) Polimorfismes de *PON1*:**

Hi ha discordances respecte a si els genotips de *PON1* afecten el perfil lipídic o el risc de CHD o de quin al·lel és el deleteri.

Mentre que alguns estudis afirmen que el perfil lipídic varia segons el genotip del polimorfisme *PON1-192* <sup>191</sup>, altres estudis no han trobat aquesta associació <sup>260</sup>. Per exemple, en població aïllada Hutterite, els paràmetres c-LDL, c-HDL, apoB, TG, i les raons de CT/c-HDL, c-LDL/c-HDL i apoB/apoAI són significativament menys aterogèniques en els individus QQ que en els QR o en els

RR<sup>289</sup>. La contribució de la variació genotípica de *PON1-192* sobre la variació fenotípica d'aquests paràmetres lipídics és significativa i tant gran com la del locus *apoE*. En les dones menopàusiques de la nostra població, l'al·lel Q presenta nivells de CT i c-LDL majors que el R amb efecte gen-dependent, de manera que les dones que són RR ja tenen nivells tant baixos com les dones premenopàusiques sigui quin sigui el seu genotip<sup>174</sup>. En la nostra població, els homes portadors de l'al·lel R, només si realitzen una quantitat elevada d'activitat física, presenten nivells tant alts de c-HDL com els QQ de qualsevol nivell d'activitat física, i a sobre, aquests primers presenten nivells de TG més baixos que els QQ de qualsevol nivell d'activitat física<sup>290</sup>. Vegeu següent figura.

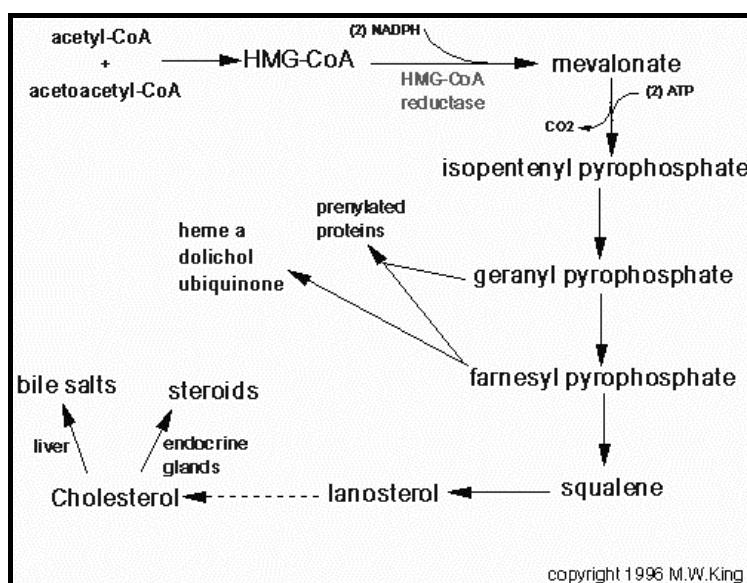


Respecte al risc de CHD, aterosclerosi o reactivitat vascular, sembla estar afectat per interaccions entre el perfil lipídic i el genotip de *PON1*. El nostre grup va trobar una interacció entre el nivells baixos de c-HDL i el genotip *PON1-192*, de manera que el risc d'IAM és significativament major quan el c-HDL és baix només en els individus QQ, però no en els individus QR o RR<sup>273</sup>. En la HF, la combinació LL/QQ dels genotips *PON1-55 /PON1-192* considerats alhora, poden representar un factor de risc independent per patir aterosclerosi de l'artèria caròtida<sup>291</sup>. Segons un altre estudi, l'efecte deleteri sobre la caròtida correspon a l'al·lel R i es dona només en els individus amb c-HDL elevat<sup>261</sup>. També s'ha descrit que la reactivitat vascular en resposta a una hipertrigliceridèmia transítoria (per infusió intralipídica) o en resposta a administració bucal de nitroglicerina és menor en els individus de genotip RR de *PON1-192*<sup>292</sup>.

### 1.6.2.2 Fàrmacs hipolipemiants

Els fàrmacs emprats més usualment pel tractament de les dislipèmies són les estatines i els fibrats. D'altres són, avui en dia, poc o gens utilitzats, com les resines d'intercanvi iònic, o es troben en fase d'estudi, com els inhibidors de l'absorció intestinal de colesterol.

**I) Les estatines:** Les estatines són inhibidors de la 3-hidroxiimetilglutaril-Coenzim A (HMG-CoA) reductasa, enzim limitant de la biosíntesi intracel·lular de colesterol. Vegeu la següent figura de la biosíntesi de colesterol.



Concretament, la simvastatina és una estatina derivada de la lovastatina i el seu efecte principal sobre el perfil lipídic és la disminució del CT i el c-LDL <sup>293;294</sup>, sense provocar canvis en la distribució del tamany de les lipoproteïnes LDL i HDL, efecte que s'ha demostrat en prevenció primària <sup>295</sup> i secundària <sup>296, 297</sup>.

L'estudi més extens realitzat amb la simvastatina és el *Heart Prevention Study*, un assaig clínic portat a terme en més de 20.000 individus d'edats compreses entre 40-80 anys, amb elevat risc de CHD, és a dir, amb història personal de CHD, malaltia oclusiva d'artèries no coronàries, diabetis mellitus o hipertensió <sup>298</sup>. Després de 5 anys de tractar-los amb 40 mg/dia de simvastatina s'observà una disminució de c-LDL (1mM, és a dir, 39 mg/dl), així com una reducció d'un 25% de la taxa d'aparició d'un primer esdeveniment cardiovascular i de la de mortalitat coronària. Aquests percentatges eren independents de les concentracions de CT i c-LDL basals, del sexe, edat, diabetis o CHD anterior.



El *Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S)* <sup>296</sup> avalua l'efecte de la simvastatina en prevenció secundària, en un assaig clínic amb 4444 pacients amb CHD, hipercolesterolèmics i normotrigliceridèmics, randomitzats a prendre simvastatina (20 o 40 mg/diaris) o placebo, els quals foren seguits durant més de 5 anys. Els resultats mostraren una disminució significativa de la incidència d'esdeveniments coronaris (del 28 al 19 %), que s'atribueix a un descens del CT, el c-LDL i l'apoB i, amb menor força, a l'augment del c-HDL, de forma que una reducció d'un 1% del c-LDL produït per la simvastatina representa una reducció del 1.7% del risc d'esdeveniments coronaris.

S'ha descrit que la simvastatina redueix la concentració i l'activitat de la CETP <sup>297</sup>, i en individus hipercolesterolèmics, la simvastatina també redueix l'absorció intestinal de colesterol, aquesta darrera mesurada mitjançant el nivell plasmàtic del fitosterol campesterol <sup>299</sup>.

A part dels canvis lipídics que promou la simvastatina, aquesta podria tenir efectes pleiotròpics, no directament relacionats amb els lípids <sup>300</sup>. S'ha suggerit que la simvastatina podria prevenir i revertir l'aterosclerosi mitjançant diversos mecanismes.

En primer lloc, s'ha observat *in vitro* que la simvastatina disminueix els nivells de COX-2 que, via la síntesi de prostaglandina E-2, induiria la síntesi de metal·loproteïnases que destruirien la matriu extracel·lular de les plaques ateroscleròtiques i així les inestabilitzarien <sup>301:302</sup>.

En segon lloc, la simvastatina actuaria com a antioxidant *per se*, com indicarien experiments *in vitro* i *ex vivo*. En efecte, s'ha observat que al afegir simvastatina en el medi disminueix de forma dosi-dependent la velocitat de formació i quantitats màximes de diens conjugats durant l'oxidació de les LDL i HDL. Complementàriament, les LDL i HDL de pacients tractats amb simvastatina formen menor quantitat d'aldehids durant assaigs d'oxidació <sup>293</sup>.

En tercer lloc, l'efecte que produeix la simvastatina sobre l'activitat transcripcional del gen *PON1* i sobre l'activitat paraoxonasa, i que expliquem en el següent apartat "a) L'enzim PON1", podria ser un mecanisme contra l'aterosclerosi.

També s'ha analitzat l'efecte d'altres estatines en assaigs clínics importants com l'estudi WOSCOPS (Pravastatina) i el AFCAPS/TexCAPS (Lovastatina) en prevenció primària, i el CARE i el LIPID (Pravastatina ambdós) en prevenció secundària. Les estatines són els hipolipemians amb millor capacitat per disminuir el c-LDL i tenen una bona tolerància. En menor grau, les estatines també augmenten el c-HDL.

L'estudi WOSCOPS (*The West of Scotland Coronary Prevention Study*), que avalua l'efecte de la pravastatina en homes moderadament hipercolesterolèmics, lliures de CHD, conclou que la disminució del c-LDL és d'un 24% i s'associa a un risc relatiu per CHD de 0.53 (p=0.0007), que

disminueix de forma no lineal respecte a la magnitud de disminució de c-LDL, és a dir, que una disminució de c-LDL per sobre del 24% no implica un benefici clínic addicional <sup>303</sup>.

L'estudi AFCAPS/TexCAPS (*Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study*), realitzat en individus lliures de CHD i amb nivells normals de CT i c-LDL, però baixos de c-HDL, indica que la lovastatina redueix el c-LDL un 25% i incrementa el c-HDL un 6%, així com redueix significativament la incidència del primer esdeveniment coronari agut amb un risc de relatiu de 0.63 (IC 95% 0.50-5.79) <sup>304</sup>.

Els estudis CARE (*The Cholesterol and Recurrent Events*) i LIPID (*Long-term Intervention with Pravastatin in Ischemic Disease*) avaluen l'efecte de la pravastatina en prevenció secundària, i troben una disminució del 28 i 25 % en el c-LDL, respectivament, i una reducció del 24 % en els esdeveniments coronaris majors i taxa de mortalitat coronària, respectivament <sup>305</sup>.

Alguns metabòlits derivats de l'atorvastatina inhibeixen *in vitro* l'oxidació de LDL i HDL i preserven l'activitat paraoxonasa <sup>306</sup>.

#### a) L'enzim PON1:

Fins la publicació de l'article referent a la simvastatina presentat en aquest treball de tesi, no s'havia avaluat l'efecte de la simvastatina sobre l'activitat paraoxonasa, així com tampoc s'havia estudiat si l'efecte era dependent dels genotips de *PON1* descrits. Posteriorment, han aparegut publicacions que confirmen i ratifiquen les nostres troballes precedents. Per exemple, uns científics han observat que la simvastatina augmenta 2.5 cops l'activitat transcripcional del promotor del gen *PON1*, efecte que és dependent de mevalonat, producte de la HMG-CoA reductasa <sup>307</sup>. Aquests mateixos investigadors, així com d'altres més recentment, també han trobat un augment de l'activitat paraoxonasa en individus sota tractament d'estatines <sup>308</sup>.

Per altra banda i com ja hem comentat en l'apartat d'activitats enzimàtiques de la PON1, la paraoxonasa pot hidrolitzar estatines que contenen anells lactònics com la mevastatina, lovastatina i simvastatina <sup>200</sup>.

#### b) Polimorfismes de *PON1*:

- Pravastatina: S'ha descrit que l'acció de la pravastatina en l'augment de la concentració d'apoAI i de c-HDL és dependent dels polimorfismes *PON1-192* i *PON1-55*. Concretament, l'efecte de la pravastatina sobre la concentració de apoAI i HDL és màxim només en els individus portadors de l'al·lel R, no observant-se canvis en els QQ. <sup>309</sup>.

- Fluvastatina: No s'han trobat interaccions entre el genotip del polimorfisme *PON1-192* i l'efecte de la fluvastatina sobre el perfil lipídic o els índexs angiogràfics de CHD <sup>265</sup>.

- Estatines: els al·loenzims Q i R del polimorfisme *PON1-192* hidrolitzen la mevastatina, la lovastatina i la simvastatina a una velocitat similar<sup>200</sup>. Vegeu figura següent extreta de<sup>200</sup>.

| <b>Activitat de PON1 humana purificada segons <i>PON1-192</i></b><br>(pmol substrat hidrolitzat/min/mg PON1) |                     |                     |
|--|---------------------|---------------------|
| <b>Substrat</b>  | <b>Al·loenzim Q</b> | <b>Al·loenzim R</b> |
| Mevastatina  | 485.1 ±19.5         | 461.8 ± 23.1        |
| Lovastatina  | 489.6 ±29.4         | 473.4 ±18.9         |
| Simvastatina   | 684.5 ±34.5         | 568.3 ±11.7         |

## **II) Els fibrats:**

Els fibrats són els fàrmacs hipolipemians que millor disminueixen els TG i eleven el c-HDL. Són ben tolerats, però la seva eficàcia en disminuir el c-LDL es menor que la de les estatines. Malgrat que s'han descrit efectes secundaris greus, en pacients amb hipercolesterolèmia i hipertrigliceridèmia pot ser indicat associar estatines amb fibrats<sup>285</sup>, encara que sota monitorització continua.

Els efectes dels fibrats sobre el metabolisme lipídic són principalment mediat per l'activació dels receptors activats per proliferadors peroxisomals alfa (*peroxisome proliferator-activated receptors alpha, PPAR alfa*), que activen la biosíntesi d'apoA1 i inhibeixen la d'apoCIII en el fetge entre d'altres accions<sup>310</sup>. Bastants assaigs clínics han confirmat que els fibrats poden retardar la progressió de l'aterosclerosi i la morbimortalitat cardiovascular, i aquest efecte no s'associa només a l'acció hipolipemiant sinó també a efectes pleiotròpics, com efectes antiinflamatoris, antioxidants, antitrombòtics i de millora de la funció endotelial<sup>311</sup>.

### **a) L'enzim PON1**

Hi han discrepàncies a la literatura respecte de l'efecte dels fibrats sobre la PON1. Malgrat que un estudi preliminar refereix que que el gemfibrozil augmenta l'activitat paraoxonasa tant en pacients amb hiperlipidèmia<sup>312</sup> com en diabètics tipus II<sup>313</sup>, d'altres estudis més recents no han trobat cap efecte del gemfibrozil, dels bezofibrats o del ciprofibrat sobre la PON1 en pacients amb hiperlipidèmia<sup>314,310</sup>. En qualsevol cas, s'ha descrit que alguns metabòlits derivats del gemfibrozil inhibeixen *in vitro* l'oxidació de LDL i HDL i preserven l'activitat paraoxonasa<sup>306</sup>.

### **1.6.3 Diabetis mellitus**

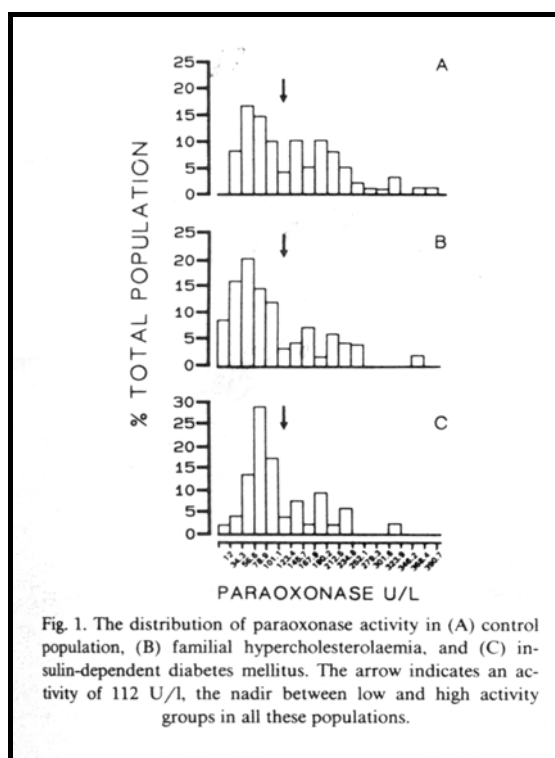
La diabetis mellitus tipus I (IDDM) s'associa a un elevat estrès oxidatiu i alta susceptibilitat a CHD. La diabetis mellitus tipus II (NIDDM) es caracteritza, entre d'altres, per una glicèmia superior als 126 mg/dl, hipertrigliceridèmia, la presència d'un metabolisme oxidatiu accelerat que comporta una elevada excreció urinària de 8-OHdG (marcadora del nivell d'estrès oxidatiu)<sup>315</sup>, baixos nivells de HDL<sub>2</sub> i elevats de HDL<sub>3</sub><sup>316</sup> i una aterosclerosi accelerada<sup>317</sup>.

#### **a) L'enzim PON1:**

*In vitro*, les concentracions elevades de glucosa redueixen la capacitat antioxidant de les HDL. En efecte, la incubació durant una setmana en glucosa 450 mg/dl (glicèmia extrema que pot donar-se en diabètics), enlloc del rang 75-115 mg/dl fisiològic, disminueix l'activitat paraoxonasa de la HDL i de la PON1 aïllada en un 65 i 40%, respectivament. També disminueix la raó activitat paraoxonasa/c-HDL, augmenta el nivell dels TBARS, dels diens conjugats formats en l'oxidació de LDL, empitjora la capacitat per prevenir l'adhesió de monòcits a la capa endotelial induïda per LDL parcialment oxidades i augmenta la quantitat d'àcids grassos insaturats hidrolitzats per part de la lipasa hepàtica<sup>318</sup>

En rates a les que se les indueix diabetis per estreptozocina, l'activitat paraoxonasa sèrica disminueix progressivament al llarg del temps<sup>229</sup>. La diabetis tipus II s'associa a accidents cardiovasculars lligats a baixos nivells de c-HDL, més que no pas lligats a alts nivells de c-LDL en humans<sup>211</sup>. Tot i això, els diabètics tipus II presenten valors d'activitat paraoxonasa, de la raó [activitat paraoxonasa/c-HDL] i de la raó [activitat paraoxonasa/apoAI] menors que els seus controls sans, associats a una disminució de l'activitat específica però no a cap canvi en el c-HDL<sup>319-321</sup>. La correlació entre l'activitat paraoxonasa i el c-HDL desapareix quan es tracta de pacients diabètics tipus II<sup>321</sup>. A més, pacients diabètics tipus II que presenten complicacions, com CHD<sup>318</sup>, retinopatia<sup>319</sup> o neuropatia<sup>178;207;266;320</sup>, posseeixen valors d'activitat paraoxonasa menors que els diabètics sense complicacions.

La diabetis tipus I s'associa a un decrement de la concentració de PON1 i de l'activitat paraoxonasa d'un 18%, independentment dels polimorfismes de la regió codificant de *PON1*<sup>322</sup>. De manera complementària, s'afirma que un 67% dels diabètics tipus I tenen l'activitat paraoxonasa baixa, independentment del c-HDL, enlloc del 50% trobat en població sana<sup>207</sup>. Vegeu la figura següent extreta de<sup>207</sup>.



#### b) Polimorfismes de *PON1*:

L'al·lel R del polimorfisme *PON1-192* sembla ser un factor de risc independent per CHD en diabètics tipus II <sup>250</sup> (amb OR de 2.12 (IC 95% 1.19-3.70) <sup>183</sup> o de 1.78 (IC 95% 1.08-2.96) <sup>266</sup> segons l'estudi) <sup>267</sup>. En la nostra població, els diabètics tipus II portadors de l'al·lel R presenten un risc per IAM de 2.65 (IC 95 % 1.04-6.75) respecte als no diabètics amb els mateixos genotips <sup>269</sup>.

Partint del fet que la diabetis s'associa a concentracions de c-HDL baixes, s'ha proposat que si l'al·loenzim Q realment pogués protegir millor que l'al·loenzim R, els diabètics portadors de l'al·loenzim R tindrien més risc coronari, en coincidir una concentració baixa de c-HDL i una *PON1* menys activa <sup>211</sup>. Per tant, la curiosa contradicció també s'observa en diabètics tipus II: es troba una activitat paraoxonasa reduïda associada a una elevada freqüència de l'al·lel R (al·lel d'alta activitat paraoxonasa) <sup>206</sup>.

El polimorfisme *PON1-55* sembla modular l'activitat paraoxonasa (no l'activitat específica) dels diabètics tipus II de forma independent del *PON1-192* <sup>178</sup>. L'al·lel L de *PON1-55* s'associa a retinopatia en diabètics tipus I, també independentment del *PON1-192* <sup>323</sup>. Un estudi amb individus sans, mostra que el genotip LL prediu una resistència a la insulina més severa que el genotip portador de l'al·lel M independentment de l'edat, el sexe, el BMI, el TG o c-HDL <sup>324</sup>. La resistència a la insulina podria ser el lligam que relaciona el polimorfisme *PON1-55* i l'augment en el risc de CHD. De fet, entre joves no diabètics amb història familiar de CHD prematura, els homozigots LL

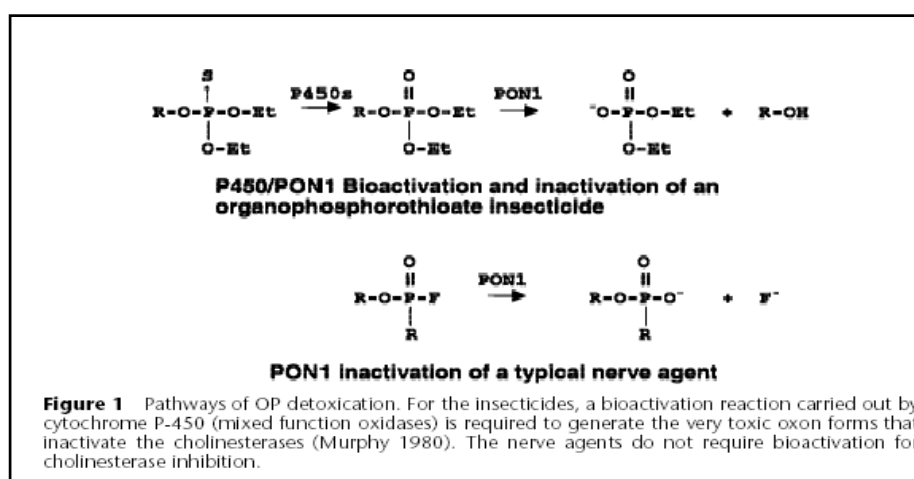
presenten una pitjor tolerància a la glucosa que els portadors de l'al·lel M ( $p=0.0007$ ) i que la d'un grup control ( $p=0.049$ )<sup>281</sup>.

Com ja hem comentat, el polimorfisme *PON1*-(-108) del promotor, que sembla modular l'expressió del gen i estar en equilibri de lligament amb *PON1*-55<sup>183</sup>, s'ha descrit com un factor de risc de patir CHD en diabètics tipus II, independent del polimorfisme *PON1*-192, de manera que el genotip TT (determinant d'una baixa expressió de *PON1*) està sobrerrepresentat en diabètics tipus II amb CHD amb una OR de 1.64 (IC 95% 1.03-2.61)<sup>183</sup>. Aquest polimorfisme *PON1*-(-108) sembla modular alhora el risc exercit pel *PON1*-192<sup>183</sup>.

A més, el lligament genètic entre els gens *PON1* i el *PDK4*, el qual codifica per l'enzim piruvat deshidrogenasa quinasa 4, implicat en la regulació del metabolisme de la glucosa, podria explicar en part la relació entre el genotip del gen *PON1* i la glicèmia en diabètics<sup>242</sup>.

#### **1.6.4 Malalties neuronals**

La majoria de compostos organofosfats són neurotoxines. Una exposició crònica a nivells baixos d'organofosfats, així com a gasos nerviosos, pot produir neuropaties i efectes neuropsiquiàtrics<sup>161</sup>. Així doncs, l'efecte detoxificant de la *PON1* respecte aquests compostos (vegeu figura següent extreta de<sup>325</sup>), i també respecte els peròxids lipídics, podria ser clau en el desenvolupament de malalties neuronals, com la malaltia d'Alzheimer o de Parkinson.



#### **a) L'enzim PON1:**

El diazoxó és un metabòlit d'un organofosfat usat pels grangers en el bany de desinfecció d'ovelles. S'ha descrit que els grangers malalts per causa d'aquests banys presenten una deficient hidròlisi del diazoxó per la *PON1*, amb una OR de 1.77 (1.18-2.67)<sup>326</sup>.

En diabètics tipus I i tipus II, l'activitat paraoxonasa és significativament menor en els pacients que sofreixen, a més, neuropatia perifèrica <sup>320</sup>.

Els soldats amb el Síndrome de la Guerra del Golf Pèrsic presenten nivells d'activitat paraoxonasa sèrica també menors que els individus control (un 50%), però no d'hidròlisi de diazoxó <sup>327</sup>. No s'ha pogut determinar si es tracta d'una situació que ja es donava abans de la guerra o si és un efecte posterior, però de totes maneres, aquest fet comporta una situació d'elevada susceptibilitat a intoxicació amb insecticides <sup>327</sup>.

En la malaltia d'Alzheimer i la demència vascular l'activitat paraoxonasa sembla ser significativament menor que en els individus no afectats <sup>328</sup>.

### b) Polimorfismes de *PON1*:

Sembla que els soldats de la Guerra del Golf Pèrsic homozigots per l'al·lel Q de *PON1-192* tenen menys probabilitat de patir símptomes neurològics que els portadors de l'al·lel R, concordant amb el fet que l'al·lel Q és el que més eficientment hidrolitza al sarín, soman i diazoxó <sup>329</sup>. D'entre els homozigots QQ, l'activitat arilesterasa baixa és el que millor diferencia el soldats simptomàtics dels controls i es correlaciona amb presentar història de toxicitat aguda avançada després de prendre piridostigmina <sup>329</sup>. Amb tot, no es disposa d'informació sobre els agents químics o nivells d'aquests a que van ser exposats els soldats <sup>325</sup>.

Els organofosfats són un factor de risc per la malaltia de Parkinson. Hi ha controvèrsia a la literatura sobre el Parkinson i la *PON1*. Algun estudi <sup>330</sup>, però no tots <sup>331</sup>, troba associació entre la malaltia de Parkinson i l'al·lel R del polimorfisme *PON1-192*, o associació entre la presència de malaltia i l'al·lel M del polimorfisme *PON1-55* (al·lel de baixa activitat paraoxonasa) <sup>332;333</sup>, que no s'ha provat en població xinesa <sup>334</sup> o caucàsica <sup>335</sup>.

Respecte la malaltia d'Alzheimer, està ben descrita l'associació amb els diferents al·lells de l'*apoE* (la presència de l'*apoE2* és protectora, la d'*apoE3* és neutra i la d'*apoE4* és un factor de risc) però no es troba associació amb els de la *PON1* <sup>336;337</sup>.

### **1.6.5 Insuficiència renal**

La insuficiència renal crònica generalment està associada a dislipèmia (nivells baixos de c-HDL juntament amb hipertrigliceridèmia), a un elevat estrès oxidatiu <sup>338</sup> degut segurament a unes activitats enzimàtiques antioxidants (superòxid dismutasa, catalasa i *PON1*) insuficients <sup>339</sup>, i a un elevat risc de CHD <sup>340</sup>.

#### a) L'enzim PON1:

L'activitat paraoxonasa, l'activitat arilesterasa i també els nivells de c-HDL s'han trobat disminuïts en pacients sotmesos a hemodiàlisi, independentment dels polimorfismes *PON1-55* i *-192*<sup>340-342</sup>, però en canvi la raó [activitat paraoxonasa/c-HDL] no sembla diferent dels controls<sup>343</sup>, ni tampoc la raó [activitat paraoxonasa/apoA1] en diabètics amb nefropatia<sup>319</sup>. El trasplantament renal sembla que restableix els nivells normals d'activitat paraoxonasa<sup>344</sup>, i fins i tot pot augmentar-ne els d'activitat arilesterasa (amb una  $p < 0.001$ )<sup>246</sup>.

### **1.7 Factors ambientals relacionats amb la PON1**

L'activitat paraoxonasa sèrica difereix entre la població sana de diferents països, no només degut a la distribució genotípica dels polimorfismes de *PON1*<sup>175</sup>, sinó als factors ambientals. Factors ambientals com l'activitat física, la dieta o el tabaquisme modulen la concentració i l'activitat paraoxonasa.

Els factors que alteren el risc de CHD es poden classificar en majors o menors, segons la magnitud de l'associació existent, i en modificables i no modificables. D'entre els modificables es troben les dislipèmies, la hipertensió, el tabaquisme, el sedentarisme, la dieta, la diabetis, l'obesitat, més recentment l'homocisteïna, els anticonceptius orals, el ferro, els agents infecciosos i els psico-socio-laborals. D'entre els no modificables: el sexe, l'edat i el antecedents familiars de CHD<sup>36</sup>.

#### **1.7.1 Activitat física**

##### **1.7.1.1 Activitat física regular**

La pràctica d'activitat física de forma regular és un factor protector enfront la incidència i progressió de la CHD<sup>345;346</sup>. De fet, s'ha observat que millora el perfil lipídic<sup>347</sup>, disminueix la tensió arterial<sup>348</sup> i la incidència de diabetis tipus II<sup>349</sup>. De totes formes, aquestes millores només expliquen una part de la protecció que comporta l'activitat física regular contra la CHD, l'efecte beneficiós de la qual es produeix a partir d'una despesa de 300kcal/dia o més<sup>350</sup>. Paral·lelament, el sedentarisme comporta un risc relatiu comparable al de la hipertensió, hipercolesterolèmia i el tabaquisme<sup>345</sup>.

L'activitat física regular potencia les defenses antioxidants<sup>351</sup> i redueix la peroxidació lipídica<sup>352</sup>, lo que genera una millora en l'estat antioxidant, basat en nivells elevats de la capacitat antioxidant total del plasma, àcid ascòrbic, àcid úric, alfa-tocoferol, activitat superòxid dismutasa i c-HDL<sup>353</sup>.



### a) L'enzim PON1:

L'únic estudi previ als nostres realitzat en humans, troba que l'activitat paraoxonasa està augmentada en un grup de jugadors de rugbi ben entrenats en comparació amb el grup control sedentaris <sup>354</sup>.

### b) Polimorfismes de PON1:

El nostre grup va trobar en una mostra poblacional d'homes, que l'efecte beneficiós de l'activitat física regular sobre el perfil lipídic (TG, c-HDL i log [TG/c-HDL]) depèn del polimorfisme *PON1-192*, essent beneficiós bàsicament pels portadors de l'al·lel R <sup>290</sup>. És a dir, que si els portadors de l'al·lel R realitzaven activitat física amb regularitat, assolien un perfil lipídic tan positiu com el dels individus QQ.

### 1.7.1.2 Activitat física aguda

La pràctica d'activitat física de forma aguda, produeix un augment en el consum d'oxigen <sup>352</sup>, que comporta un augment de l'estrès oxidatiu amb una conseqüent generació de radicals lliures i de peròxids lipídics <sup>352</sup>. Aquest tipus d'activitat física a més, disminueix alguns antioxidants <sup>355</sup> i la generació de radicals lliures pot superar les defenses antioxidants en certs teixits <sup>351</sup>. Per exemple, s'ha observat que les rates entrenades regularment presenten una menor peroxidació lipídica després d'un exercici agut que les rates sedentàries <sup>356</sup>. En un altra estudi, no obstant, s'ha descrit un augment de la peroxidació lipídica després de l'activitat física aguda, independentment de l'entrenament previ. <sup>357</sup>. En qualsevol cas, sembla que l'activitat física regular potencia la capacitat endògena de lluitar contra l'estrès oxidatiu <sup>358</sup>.

### a) L'enzim PON1:

L'activitat física aguda en rates augmenta la peroxidació lipídica <sup>357</sup> i inhibeix l'activitat paraoxonasa sèrica, tant si estan entrenades <sup>359</sup> com si no <sup>360</sup>.

Després de realitzar un exercici aeròbic intens, com una maratón, els atletes entrenats presenten nivells normals d'activitat arilesterasa i de la capacitat de les HDL de protecció contra l'oxidació de les LDL, però tenen alteracions en l'oxidabilitat de les LDL <sup>361</sup>. Aquests fets s'han basat en la incorporació d'àcids grassos no esterificats en les LDL, encara que els autors d'aquest estudi indiquen que hi ha controvèrsies sobre l'efecte oxidatiu de l'activitat física aguda respecte als marcadors de lipoperoxidació plasmàtica. No obstant, sembla clar que molècules antioxidants plasmàtiques com l'àcid úric, la bilirubina i l'àcid ascòrbic sí que augmenten.

### **1.7.2 Dieta**

La dieta és un dels factors ambientals al que se li atribueix un paper més important en la diferent incidència de CHD entre el nord d'Europa, els EEUU i els països mediterranis. Una dieta rica en colesterol i àcids grassos saturats (SFA) s'associa a una incidència de CHD sorprenentment baixa a França i elevada a Finlàndia <sup>362</sup>, i es correspon amb la coneguda "paradoxa francesa", que en un principi s'havia atribuït al consum de vi <sup>363</sup>.

La dieta mediterrània es caracteritza pel seu contingut ric en fibra (cereals i llegums), àcids grassos poliinsaturats (PUFA) (peix), àcids grassos monoinsaturats (MUFA) (oli d'oliva), alfa-tocoferol (fruits secs), àcid ascòrbic i beta-carotens (fruites i verdures) i compostos polifenòlics (vi, oli d'oliva, verdures).

La ingestió de SFA s'associa directament a mortalitat per CHD <sup>364-371</sup> i tant els SFA com els MUFA-*trans* empitjoren el risc de CHD <sup>372</sup>. Una dieta rica en SFA produeix un augment de c-LDL i un descens del c-HDL <sup>373</sup>, així com un augment en els fenòmens trombòtics <sup>374</sup>, probablement per un augment de l'agregació plaquetària <sup>375</sup> i de l'activitat del inhibidor de l'activador del plasminogen (PAI-1) <sup>376</sup>. De fet, com més llarga és la cadena de l'àcid gras SFA, major és l'increment de colesterol plasmàtic <sup>377</sup>.

En canvi, s'ha comprovat a nivell ecològic que els PUFA i greixos vegetals redueixen el risc poblacional de patir CHD <sup>378</sup>. En aquest mateix sentit, les poblacions amb menor contingut d'àcid linoleic en el teixit adipós són les que presenten major mortalitat per CI <sup>379</sup>. Tot i així, la susceptibilitat a l'oxidació dels àcids grassos augmenta amb el nombre de dobles enllaços de la molècula <sup>372</sup>. Les dietes riques en PUFA redueixen els TG, el CT, el c-LDL, però també el c-HDL <sup>372;380</sup>.

Els MUFA també es caracteritzen per reduir risc de CHD. Entre d'altres, els MUFA augmenten la fibrinòlisi i la sensibilitat a la insulina, disminueixen la tensió arterial sistòlica i diastòlica en els pacients amb NIDDM i la susceptibilitat de les LDL a oxidar-se <sup>372</sup>. Les dietes riques en MUFA milloren el perfil lipídic ja que redueixen el c-LDL i augmenten el c-HDL <sup>372;380</sup>. Si la dieta rica en MUFA és alhora pobra en SFA, aleshores es redueixen tant el c-LDL com el CT <sup>372</sup>.

Finalment, les dietes riques en hidrats de carboni disminueixen el c-LDL, però també el c-HDL i conseqüentment el CT, a part d'augmentar els TG <sup>372;381</sup>.

L'àcid oleic (C18:1) forma el 92% dels MUFA-*cis* de la dieta i està present en forma abundant en l'oli d'oliva (70%), carn magra (17%), embotits(10%), formatge tipus *Brie* (7%), pernil curat(3%), allvocat, olives, nous, productes enllaunats en oli d'oliva i patates xips fregides en oli d'oliva <sup>372</sup>. El

*Seven Countries Study* va ser el primer en demostrar els efectes beneficiosos de l'oli d'oliva respecte la mortalitat per CHD <sup>382</sup>.

Alguns dels efectes beneficiosos de l'àcid oleic a nivell de la patogènesi de la malaltia vascular són la disminució de la síntesi de DNA de cèl·lules musculars llises, reducció de l'activació endotelial, és a dir, l'expressió de molècules d'adhesió (VCAM-1, E-selectina, ICAM-1) <sup>383</sup>, la quimiotaxi i l'adhesió de monòcits a cèl·lules endotelials induïda per LDL parcialment oxidades <sup>384</sup>. L'àcid oleic també produeix una major protecció de les LDL contra l'oxidació <sup>385</sup>. De fet, les LDL quan la dieta està enriquida en MUFA (concretament àcid oleic) s'oxiden menys que quan l'enriquiment és en PUFA (concretament àcid linoleic) i la diferència sembla dependre del contingut d'àcid oleic en les LDL i ser independent del contingut d'antioxidants en la lipoproteïna <sup>386;387</sup>. També les HDL riques en àcid oleic s'oxiden en menor grau, independentment d'altres antioxidants com la vitamina E o la vitamina A <sup>388</sup>.

Respecte el perfil lipídic, l'àcid oleic de la dieta pot reduir els nivells de c-LDL i el CT segons uns estudis <sup>381;385</sup>, tot i que algun estudi el considera neutre, és a dir, que no modifica els nivells de colesterol <sup>377</sup>.

En l'operació de fregir amb oli, la concentració d'àcid oleic sembla no variar en augmentar el nombre d'usos per fregir, mentre que la concentració d'àcid linoleic sí que disminueix i es correlaciona amb l'augment de compostos polars <sup>389</sup>. Tampoc l'escalfament del menjar convencional amb calor o amb microones sembla produir canvis en la composició dels àcids grassos de la carn <sup>390</sup>.

A part de l'àcid oleic, l'oli d'oliva té uns components polifenòlics (tirozol, àcid protocatèquic, aleuropeïna,...) <sup>391</sup>, diferents a la vitamina E, que poden contribuir a disminuir la susceptibilitat de les LDL a ser oxidades <sup>392</sup>.

Hi ha certa controvèrsia envers l'efecte beneficiós de les vitamines i compostos antioxidants de la dieta. Les vitamines hidrofíliques antioxidants, com la vitamina E, allarguen la fase de latència dels diens conjugats durant l'oxidació de LDL *in vitro*, però no disminueixen la quantitat final de peròxids lipídics <sup>117</sup>. Aquesta disminució de la quantitat final sí que s'aconsegueix quan s'afegeixen HDL en el medi d'incubació. Així doncs, el grau d'oxidació de les LDL i HDL sembla ser independent del contingut lipoproteic de vitamines <sup>386-388</sup>, i més encara, s'ha dit que la vitamina E podria exercir un efecte pro-aterogènic, en potenciar l'activitat de la CETP <sup>107;117;393;394</sup>. El *Heart Prevention Study*, que ja hem mencionat en la part dels assaigs clínics realitzats amb simvastatina, també analitza l'efecte d'un combinat de vitamines antioxidants (650 mg de vitamina E, 250 mg de vitamina C i 20 mg beta-carotè/ dia) o placebo, durant un període de 5 anys, i conclou que no varia el perfil lipídic

ni la taxa de mortalitat cardiovascular o taxa del primer esdeveniment <sup>395</sup>. En canvi, els experiments realitzats amb ratolins deficients en mostren que la vitamina E <sup>396</sup> i altres antioxidants com la quercetina <sup>397</sup> i glabridina <sup>398</sup> inhibeixen l'oxidació de les LDL en un 20-55%.

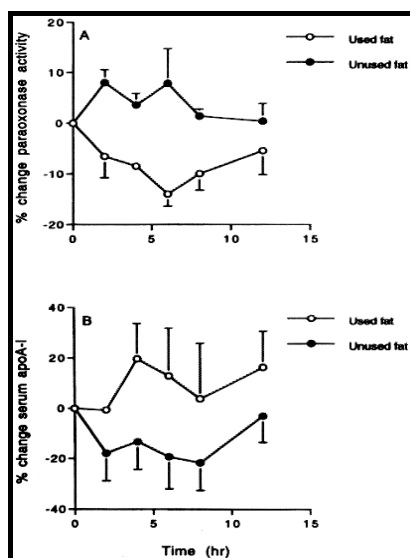
#### a) L'enzim PON1

S'ha dit que els canvis d'activitat paraoxonasa induïts per la dieta podrien estar fortament associats al metabolisme de les HDL i l'apoAI, és a dir, que les variacions en l'activitat paraoxonasa deguts a la dieta es correlacionarien amb variacions en el c-HDL i l'apoAI, mentre que alguns canvis en l'activitat paraoxonasa deguts a altres causes no correlacionen tant amb canvis en les HDL o apoAI <sup>399</sup>.

L'experimentació amb animals demostra que la dieta aterogènica redueix l'activitat paraoxonasa en conills, ratolins i rates. Efectivament, una dieta rica en colesterol produeix en conills *wild-type* i conills transgènics per l'apoAI humana una disminució de l'activitat paraoxonasa <sup>400</sup>. En ratolins susceptibles a desenvolupar lesions d'estria grassa de l'aorta induïdes per dieta, una dieta rica en colesterol i greixos provoca una disminució de la capacitat de les seves HDL per protegir contra l'oxidació, associada a una disminució dels nivells de mRNA de la PON1, de les activitats paraoxonasa i arilesterasa <sup>228</sup>. En canvi, en animals resistent a desenvolupar aquestes lesions degut a la dieta, es produeix un augment en la quantitat de mRNA de PON1, de les activitats arilesterasa i paraoxonasa i de les HDL <sup>228</sup>. La composició dels àcids grassos de la dieta modifica l'activitat paraoxonasa en les rates, de manera que la dieta rica en trioleïna (MUFA) l'augmenta, la rica en tripalmitina (SFA) no l'altera i la rica en oli de peix (PUFA) la disminueix <sup>230</sup>.

En humans, un assaig clínic amb diferents olis observa un augment post-pandrial de l'activitat arilesterasa (12 U/ml) després d'ingerir oli d'oliva i una disminució (-1 U/ml) després de la ingestió d'oli de càrtam (ric en PUFA) en dones amb diabetis tipus II i no en homes <sup>401</sup>, tot i que la fase de latència de l'oxidació de les LDL, els índexs d'estrès oxidatiu i la capacitat antioxidant no es modifiquen <sup>401</sup>. Si la dieta és rica en SFA o MUFA-*trans*, l'activitat paraoxonasa post-pandrial augmenta al voltant d'un 2% en comparació amb els valors en dejú <sup>402</sup>, però la dieta rica en MUFA-*trans* comparada amb la rica en SFA produeix una disminució d'un 6% en l'activitat paraoxonasa, que es correlaciona amb la disminució del c-HDL <sup>402</sup>. El greix ric en SFA (per exemple amb un percentatge de SFA:MUFA:PUFA, 54:39:7) que s'ha usat per fregir menjar té un contingut de peròxids, de carbonils i d'àcids superior que el mateix greix abans d'usar, i fa disminuir l'activitat arilesterasa durant l'etapa post-pandrial fins a 12h després de l'àpat, moment en que es recupera el valor basal, mentre que el greix no usat augmenta l'activitat arilesterasa, recuperant-se el valor basal a les 8h (vegeu figura següent extreta de <sup>403</sup>). Els canvis de l'apoAI sèrica es correlacionen

inversament amb els canvis soferts per l'activitat arilesterasa. Paral·lelament, el contingut de peròxids de les LDL també disminueix en el primer cas i augmenta en el segon, però la susceptibilitat de les LDL a ser oxidades no es modifica <sup>403</sup>.



El consum elevat de vitamines C o E en homes s'associa a nivells augmentats d'activitat paraoxonasa i de hidròlisi de diazoxó <sup>308</sup>. Així mateix, en afegir suc de granada a la dieta s'observa un increment de la activitat paraoxonasa en un 20 % i una disminució de l'estrès oxidatiu <sup>404</sup>. En canvi, sorprenentment, en humans s'ha descrit que el consum de vegetals, fibra i beta-carotens es correlacionen negativament amb l'activitat paraoxonasa <sup>405</sup>. Aquests resultats han estat corroborats per un assaig clínic publicat molt recentment que mostra que una dieta rica en vegetals (elevada en alfa- i beta-carotens, vitamines C i E, entre d'altres) redueix l'activitat paraoxonasa, i els nivells de CT, c-LDL, c-HDL i apoAI en dones. La reducció de activitat paraoxonasa es correlaciona amb la reducció de c-HDL, i a més, el decrement de activitat paraoxonasa depèn dels polimorfismes *PON1-55* i *PON1-192*, és a dir, que el decrement més important es dona en les dones homozigotes LL i en les portadores de l'al·lel R, respectivament <sup>399</sup>. Els autors comenten que el consum superior de fibra en la dieta rica en vegetals podria explicar el decrement del CT i c-HDL. El consum diari i moderat d'alcohol augmenta l'activitat paraoxonasa sèrica en humans, i l'augment es correlaciona de nou amb una augment del c-HDL i apoAI <sup>406</sup>. En ratolins, el consum de vi negre, que conté els polifenols quercetina i catequina, s'associa a LDL menys susceptibles a l'oxidació, probablement degut a una activitat de la PON1 potenciada pels polifenols <sup>407</sup>.

### b) Polimorfismes de *PON1*:

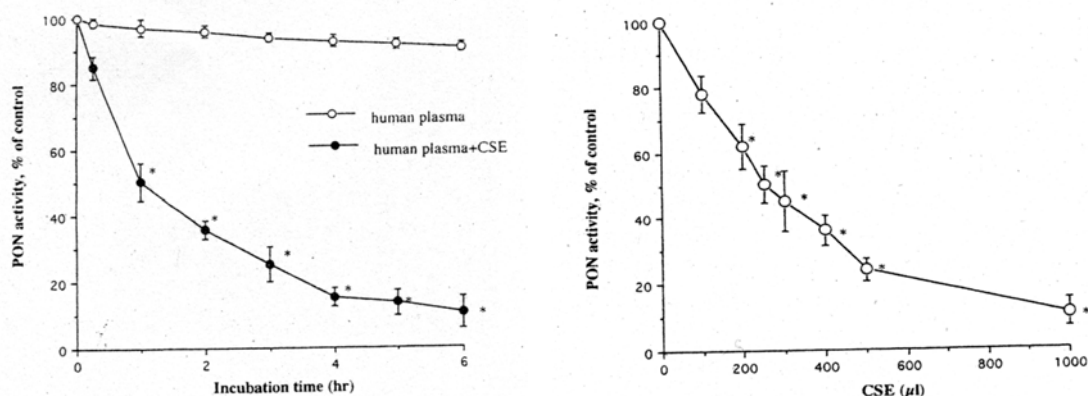
Bastants estudis han demostrat l'existència d'interaccions gen-dieta. En relació amb els polimorfismes de *PON1*, ja hem comentat que una dieta rica en vegetals comporta un decrement de l'activitat paraoxonasa principalment en les dones LL i portadores de l'al·lel R dels polimorfismes de *PON1-55* i *PON1-192*, respectivament <sup>399</sup>. També altres gens interaccionen amb la dieta. Per exemple, el polimorfisme *apoA1-(G -75G)* pot modular la disminució del c-LDL en el canvi de dieta rica en SFA a una dieta rica en PUFA en les dones <sup>408</sup>, i també en el canvi a una dieta rica en MUFA en homes <sup>409</sup>. També els polimorfismes dels gens *apoAIV*, *apoB* i *LPL* semblen modular les respostes a canvis en la dieta <sup>410</sup>. Els portadors de l'al·lel apoE4 poden ser millor responedors a canvis en la dieta (restricció de colesterol i greix) pel que fa a la disminució de c-LDL que no pas els portadors dels al·lells apoE3 o apoE2 <sup>411</sup>.

### 1.7.3 Tabaquisme

El tabac és un factor de risc important i independent pel desenvolupament de l'aterosclerosi <sup>412</sup>. Els mecanismes a través dels quals el tabac afecta a l'aterosclerosi semblen ser l'estrès oxidatiu <sup>412</sup>, la reducció del c-HDL <sup>413</sup> i la major susceptibilitat a l'oxidació de les LDL dels fumadors <sup>414</sup>.

### a) L'enzim *PON1*:

Estudis *in vitro* descriuen que el fum de tabac inhibeix l'activitat paraoxonasa de forma dosi- i temps-dependent <sup>415</sup>. Vegeu les figures següents extretes de <sup>415</sup>.

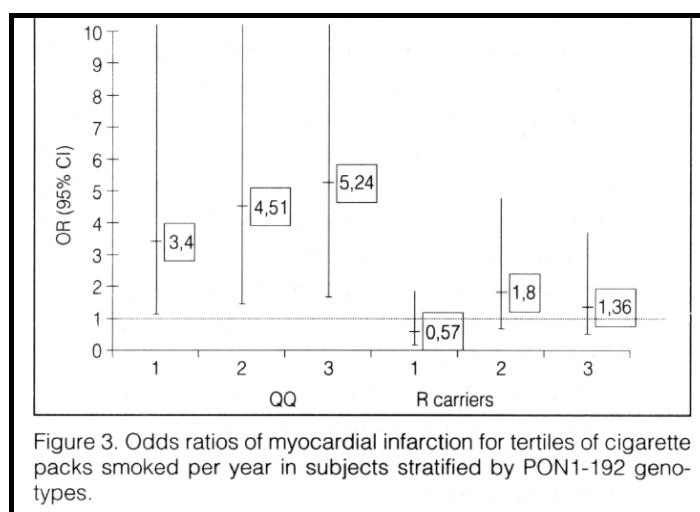


En humans, el tabac redueix la concentració de *PON1* i les activitats paraoxonasa i arilesterasa, però no les seves activitats específiques <sup>416</sup>. Entre els fumadors amb CHD, les activitats i la concentració de *PON1* són menors en els casos més severes de CHD i complementàriament, tenen una pitjor capacitat de protegir contra l'oxidació de les LDL <sup>416</sup>. Sembla que deixar de fumar

restableix al cap de dos anys, la concentració i els nivells d'ambdues activitats a nivells equivalents a les dels no fumadors <sup>416</sup>.

#### b) Polimorfismes de *PON1*:

El diferent nivell de concentració de *PON1* i d'activitat arilesterasa degut al tabaquisme sembla ser independent dels polimorfismes *PON1-192* i *PON1-55* <sup>416</sup>. S'ha descrit que existeix una interacció entre el tabac i el polimorfisme *PON1-192* sobre el risc d'IAM, de manera que, només pels no fumadors, l'al·lel R s'associa a un increment significatiu de la OR (1.64, 1.19-2.26), mentre que pels fumadors la OR gairebé no varia segons el genotip i és aproximadament de 2.60 (1.72-3.90) <sup>255</sup>. El nostre grup també ha trobat una interacció tabac-*PON1-192*, en que el nombre de paquets fumats per any s'associa a un augment de la OR de CHD només en els QQ, de manera dosi- i temps-dependent <sup>271</sup>. Vegeu figura següent extreta de <sup>271</sup>.



També s'han trobat interaccions respecte al polimorfisme *PON1-55* i el desenvolupament de l'aterosclerosi, de manera que els homozigots LL presenten un risc major que els portadors de l'al·lel M quan són no fumadors, però si fumen les OR d'ambdós grups augmenten respecte als no fumadors i la relació s'inverteix, sent major el risc pels portadors de l'al·lel M <sup>417</sup>.

#### 1.7.4 Edat

Bastants estudis donen suport a la teoria de l'estrès oxidatiu de l'envelliment <sup>221,418</sup>, és a dir, que en augmentar l'edat es produeixen modificacions inflamatòries en la paret arterial, i l'augment de la susceptibilitat a l'estrès oxidatiu de l'espai subendotelial que poden donar lloc a una acceleració de l'aterosclerosi <sup>419</sup>.

### a) L'enzim PON1:

L'activitat paraoxonasa dels humans en néixer és aproximadament la meitat que a l'edat de 2 anys, tot i presentar un nivell de c-HDL igual o superior als adults <sup>420</sup>, i es considera que a partir dels 6 mesos d'edat l'activitat paraoxonasa és similar a la dels adults <sup>421</sup>. En rates i ratolins s'assoleixen nivells d'adult a partir de les 3 setmanes <sup>421</sup>. Aquest fet suggereix que els nounats poden ser més sensibles a les intoxicacions amb compostos organofosfats que no pas els adults <sup>158</sup>.

L'activitat paraoxonasa dels humans adults disminueix amb l'envelliment, de manera que l'edat i l'activitat paraoxonasa es correlacionen negativament <sup>272;422</sup>.

### b) Polimorfismes de PON1:

El nostre grup ha observat que la correlació negativa entre l'edat i l'activitat paraoxonasa es dona només en els pacients amb IAM, principalment els que són QQ del polimorfisme *PON1-192* <sup>272</sup>. En efecte, en els individus QQ l'edat comporta un risc d'IAM 4 cops superior pel grup de 63-74 anys que pels menors de 50 anys, risc que és no significatiu en els QR i menor encara en els RR <sup>272</sup>.

En persones centenàries, s'ha trobat que la freqüència de l'al·lel R del polimorfisme *PON1-192* és superior que en el grup de 20-65 anys <sup>423</sup>.

L'expressió de PON1 és estable en el temps i la diferència d'expressió de la PON1 entre els individus d'un mateix genotip arriba a ser de 13 cops <sup>421</sup>.

### **1.7.5 Estrògens**

El possible efecte beneficiós de la teràpia hormonal substitutòria (*replacement hormone therapy*, RHT) sobre el risc de CHD és un tema força controvertit. Per una banda, la RHT pot tenir efectes favorables sobre el perfil lipídic <sup>424</sup>, la coagulació <sup>425;426</sup>, i el to vascular <sup>427;428</sup>, però també pot provocar efectes trombòtics i pro-inflamatoris adversos <sup>429;430</sup>. Concretament sobre el perfil lipídic, la teràpia amb estrògens o combinada amb progestàgens produeix un augment dels nivells de TG i c-HDL i disminució del c-LDL, sense provocar canvis en la insulina o en la tensió arterial <sup>424</sup>. Cal tenir en compte, però, el possible efecte d'hiperplàsia endometrial de la teràpia única d'estrògens. Alguns estudis cas-control i de cohorts indiquen que la teràpia combinada d'estrògens-progestàgens s'associa a una reducció de la morbimortalitat cardiovascular, però segons l'estudi *Heart Prevention Study* això no és aplicable a dones grans amb CHD anterior. Actualment encara s'estan realitzant assaigs clínics sobre el tema.



#### a) L'enzim PON1:

Les dones post-menopàusiques sotmeses a RHT presenten una activitat paraoxonasa superior a les que no ho estan <sup>174</sup>.

Les dones trasplantades cardíques presenten un c-HDL i una activitat paraoxonasa superiors si estan sotmeses a RHT, amb nivells similars a les dones control sanes <sup>431</sup>. De forma similar, un assaig clínic amb dones diabètiques tipus II, mostra que la RHT fa augmentar l'activitat arilesterasa (10%), augment que és més important com menor és l'activitat basal i que es correlaciona amb augment del c-HDL <sup>432</sup>.

L'activitat paraoxonasa sembla ser més elevada en dones que prenen anticonceptius orals que les que no en prenen <sup>405</sup>.

#### b) Polimorfismes de *PON1*:

En la nostra població sembla existir una interacció entre el polimorfisme *PON1-192* i la menopàusia sobre el perfil lipídic, ja que els nivells de CT i c-LDL de les post-menopàusiques són majors que els de les pre-menopàusiques en els grups QQ i QR, mentre que els de les pre-menopàusiques no varien segons aquest polimorfisme <sup>174</sup>.

### **1.7.6 Resposta inflamatòria**

En les lesions ateroscleròtiques s'han trobat components cel·lulars relacionats amb la inflamació <sup>433</sup> i alguns estudis epidemiològics troben correlació entre la incidència d'aterosclerosi i la presència de malalties infeccioses, bacterianes i víriques, com la *Chlamydia pneumoniae* <sup>434</sup>, el citomegalovirus <sup>435</sup> i la bronquitis crònica <sup>436</sup>.

#### a) L'enzim PON1

Certes molècules implicades en la fase aguda de la resposta inflamatòria (IL-1, IL-6, TNF, endotoxina, fosfolípids oxidats via IL-6) disminueixen els nivells de mRNA de *PON1* en cèl·lules HepG2 <sup>184</sup> i, *in vivo*, s'observa una disminució de l'activitat paraoxonasa <sup>437</sup>.

En ratolins sotmesos a dieta aterogènica a curt termini, la formació de complexos immunes contra l'apoA1 oxidada sigui possiblement el mecanisme pel qual les HDL oxidades s'eliminin i conseqüentment disminueixi l'activitat paraoxonasa, però no el seu mRNA <sup>438</sup>.

En humans operats quirúrgicament, s'ha observat que durant la fase aguda hi ha una reducció d'activitat paraoxonasa i una concomitant pèrdua de les propietats antioxidants de les HDL <sup>439</sup>. Els pacients positius per auto-anticossos antifosfolípids presenten activitat paraoxonasa reduïda <sup>440</sup>. El

virus de la influença, agent causant de les infeccions respiratòries agudes més associades a una alta mortalitat per CHD, provoca una disminució de l'activitat paraoxonasa i de la capacitat de les HDL de protegir contra l'oxidació <sup>441</sup>.

## **2. Objectius**



## **2. OBJECTIUS**

A continuació presentem els objectius de la tesi, relacionant-los amb cada article presentat. Aquests objectius estan també definits en cadascun dels articles que conformen la tesi.

### **Capítol I:**

1-Determinar l'efecte del tractament amb el fàrmac **simvastatina** en individus amb hipercolesterolèmia familiar sobre les activitats paraoxonasa i arilesterasa, el perfil lipídic i la concentració de peròxids lipídics,

2-Determinar si aquest possible efecte és dependent dels polimorfismes *PON1-192* i *PON1-55*

### **Capítol II:**

1-Avaluar l'efecte de l'**exercici físic regular** aeròbic sobre l'activitat paraoxonasa i determinar si aquest efecte és dependent dels polimorfismes *PON1-192* i *PON1-55*.

2-Avaluar l'efecte de l'**exercici físic agut** aeròbic sobre l'activitat paraoxonasa, segons l'estat d'entrenament i segons els polimorfismes *PON1-192* i *PON1-55*.

### **Capítol III:**

Determinar l'efecte del **consum d'àcid oleic** sobre l'activitat paraoxonasa i sobre el perfil lipídic, i la dependència als polimorfismes *PON1-192* i *PON1-55*.



## **3. Mètodes**





### **3. MÈTODES**

Els mètodes emprats per estudiar els objectius plantejats estan descrits en el capítol Mètodes dels articles que configuren la tesi. A continuació, incloem una breu descripció tant dels subjectes que van intervenir en cada estudi, com dels mètodes usats pels anàlisi i l'obtenció de dades antropomètriques.

#### **3.1 Subjectes i intervenció**

##### **Capítol I:**

Van participar 64 voluntaris (39 dones i 25 homes) amb diagnòstic clínic d'HF establert com un colesterol-LDL superior a 160 mg/dl, presència de xantomes en l'individu o familiars de primer grau i història familiar de malaltia coronària prematura o hipercolesterolèmia. Tots ells eren normoglicèmics i eutiroides, no sotmesos a cap tractament farmacològic i havien seguit una dieta hipolipemiant de 3 mesos.

La intervenció consistí en sotmetre els pacients a una tractament de 20 mg de simvastatina/dia durant 4 mesos i determinar les activitats paraoxonasa i arilesterasa, el perfil lipídic i antropomètric, abans i després de la intervenció.

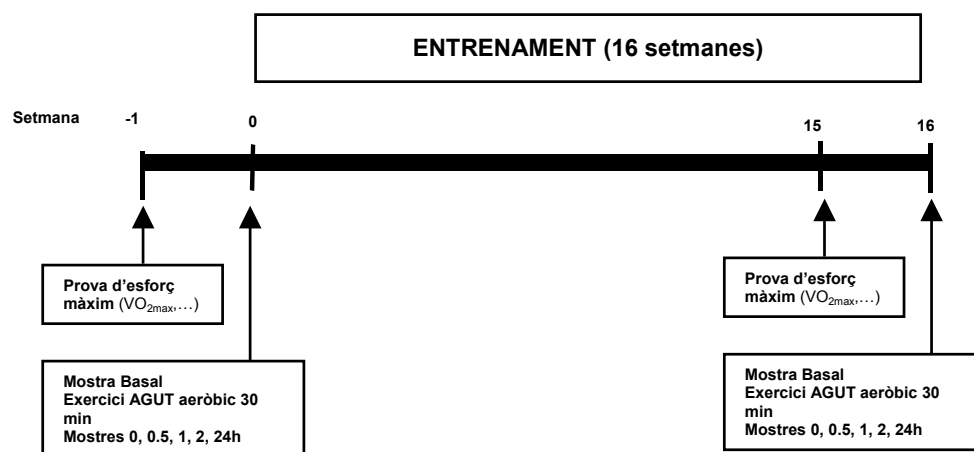
Com a controls per comparar els valors de activitat paraoxonasa entre individus normo- i hipercolesterolèmics, es van seleccionar aleatòriament 124 individus de població general normolipèmics, aparentment sans no tractats amb cap fàrmac.

##### **Capítol II:**

En aquest estudi van participar 17 voluntaris joves (10 dones i 7 homes) sedentaris, és a dir, que realitzessin una activitat física menor de 2h/setmana durant els 3 mesos anteriors a la intervenció. Cap d'ells tenia història prèvia de MCV, diabetis, dislipèmia, discapacitat física, malaltia respiratòria crònica, no eren obesos (índex de massa corporal, IMC=<30), el seu consum d'alcohol era menor de 40 g/dia, no consumien drogues il·legals ni suplementes vitamínics o minerals.

La intervenció fou a dos nivells. En primer lloc, es van sotmetre a un entrenament d'activitat física aeròbica durant 4 mesos, en el qual s'augmentava progressivament la durada i freqüència de les sessions d'entrenament. En segon lloc, els participants van realitzar dos exercicis d'activitat física aguda aeròbica, en forma de prova d'esforç, adaptats a la seva capacitat (determinada una setmana abans): un abans dels 4 mesos d'entrenament i l'altre en finalitzar aquest període. En ambdós casos les determinacions d'activitats paraoxonasa i arilesterasa, determinacions lipídiques

i antropomètriques, entre d'altres, es realitzaren just abans dels exercicis aguts i al cap de 0.5, 1, 2 i 24 hores. Vegeu-ho esquematitzat a continuació.



### **Capítol III:**

Varen participar 654 individus (tots homes) seleccionats aleatòriament de la mostra representativa de la població de Girona de l'estudi transversal REGICOR. A part de les determinacions d'activitats paraoxonasa i arilesterasa, determinacions lipídiques i antropomètriques, van respondre qüestionaris sobre la dieta, el consum de tabac (veure exemples de qüestionaris en l'apartat 7. Annex) i activitat física en el temps lliure.

### **3.2 Anàlisi de l'activitat paraoxonasa (respecte paraoxó)**

La mesura d'activitat paraoxonasa es realitza monitoritzant la formació de p-nitrofenol, que és un dels productes en què s'hidrolitza el paraoxó (O,O-diethyl-O-p-nitrophenylphosphate). Aquesta reacció es dona espontàniament de forma notable.



El p-nitrofenol absorbeix la radiació de  $\lambda = 405$  nm. Es pot seguir la cinètica de la reacció per espectrofotometria amb un Autoanalitzador Cobas-Mira (Roche-Diagnostica).

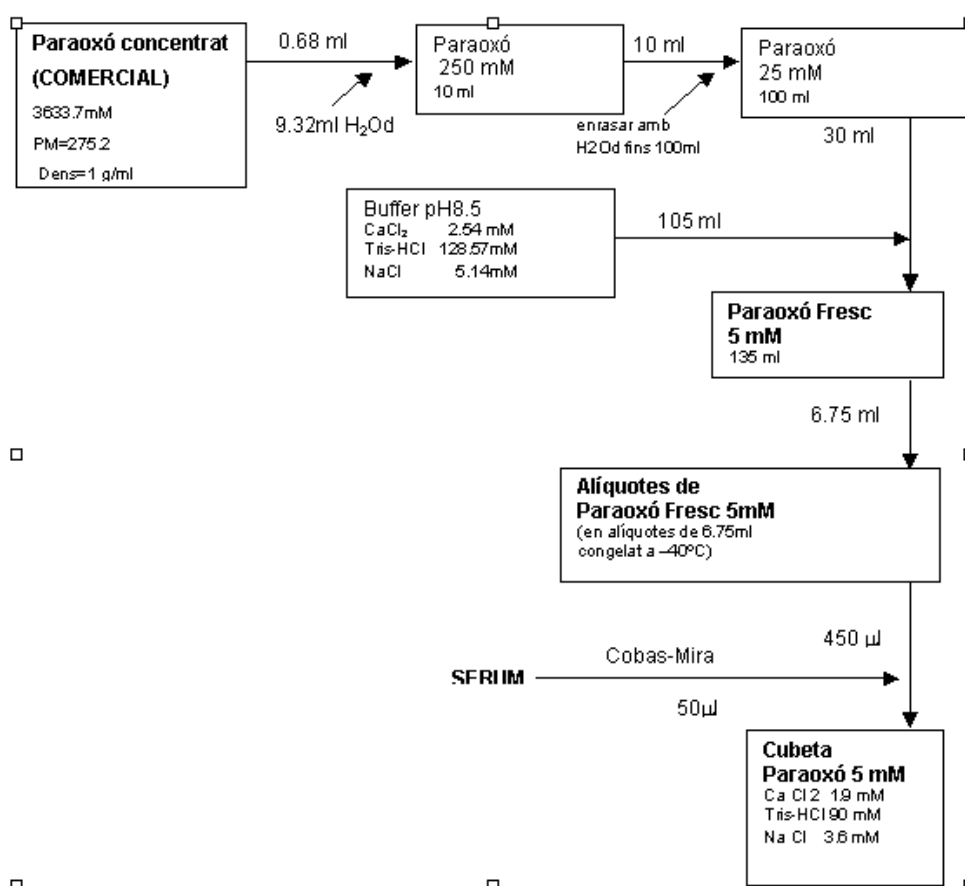
## REACTIUS:

Buffer- solució de  $\text{Ca Cl}_2$  2.57 mM, Tris-HCl 128.57 mM , Na Cl 5.14 mM ajustada a pH 8.5.

Paraoxó- Paraoxó concentrat 3633.7mM (PM=275.2, dens=1 g/ml, Sigma).

En posar la tècnica apunt, observàrem que el Paraoxó guardat en la nevera s'hidrolitzava espontàniament a una velocitat notable. Així que vam decidir preparar varies alíquotes de Paraoxó 5 mM (i alguna alíquota de 25 mM) i congelar-les a  $-40^\circ\text{C}$ , de manera que no s'hidrolitzés espontàniament. L'alíquota de 5 mM la descongelem just abans de fer cada sèrie de determinacions.

L'esquema del procediment de preparació del paraoxó és el següent:



## CINÈTICA:

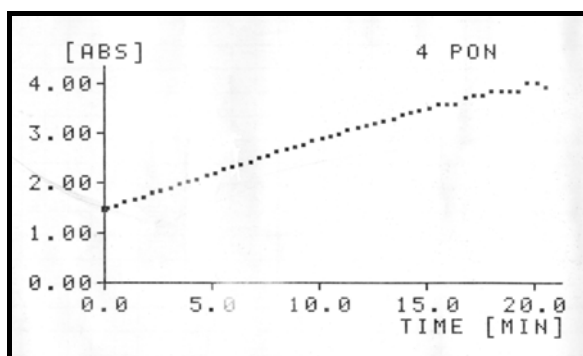
La cinètica enzimàtica s'estudia a  $37^\circ\text{C}$ .

El volum final de la cubeta és 500µl: 450 µl reactiu Paraoxó 5mM,  $\text{Ca Cl}_2$  1.9mM, Tris-HCl 90mM, Na Cl 3.6mM + 50 µl sèrum.

Vam emmagatzemar les mostres de sèrum a  $-70^{\circ}\text{C}$  fins al seu anàlisi. Està descrit que les mostres mantingudes a  $-20^{\circ}\text{C}$  presenten unes activitats paraoxonasa i arilesterasa no alterades, almenys durant 1 any<sup>442</sup>.

Vam programar l'autoanalitzador de manera que, abans de l'addició del sèrum al paraoxó 5 mM, l'autoanalitzador faci un blanc de reactiu per corregir la possible hidròlisi espontània ocorreguda després de la descongelació del paraoxó 5 mM.

Tot seguit, per construir la recta que representa la velocitat inicial de la reacció enzimàtica, l'autoanalitzador realitza 15 determinacions espectrofotomètriques a 405 nm (una cada 24 s) al llarg de 6 min. Hem comprovat que durant aquest interval de temps la pendent de la funció *Increment d'absorbància enfront Temps* es manté lineal, per tant és un interval adequat per mesurar la velocitat inicial de la reacció enzimàtica. Vegeu el gràfic següent.



Post-dilució: es realitza dilució  $\frac{1}{2}$  de la mostra si el valor d'Abs > 3.5. La relació concentració - absorbància no és lineal a absorbàncies tan altes (la solució té massa concentració de compost que absorbeix i aquesta deixa de ser transparent).

Cal aplicar un factor sobre el resultat de  $\frac{\Delta Abs}{\Delta t}$  (en  $\text{min}^{-1}$ ) que facilita l'autoanalitzador, per donar el resultat en U/l.

Aplicant la llei de Beer- Lambert ( $Abs = \epsilon c l$ ), el coef. d'extinció molar ( $\epsilon = 18053 \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) i la definició de  $1 \frac{U}{l} = 1 \frac{\mu\text{molS transformat}}{(\text{min} \times l)}$  443

essent Abs = absorbància

$\epsilon$  = coef. d'extinció molar ( $18053 \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )

c = concentració en M

l = el pas de llum en cm (0.6 cm)

U = unitat enzimàtica

s'obté un valor de 923.21.

Valors de l'activitat PON que dona l'autoanaltzador són de l'ordre de  $10^2$  (entre 50-900 U/l), sense decimals.

#### CONTROLS:

Vam emprar controls interns per a calibrar les determinacions i estudiar els coeficients de variació del mètode.

Vam fer els controls interns de la següent manera: vam fer un *pool* de sèrums amb menys de 48 hores d'antiguitat i que no haguessin estat congelats, fossin icterics o hemolitzats. Vam alíquotar el *pool* i vam congelar les alíquotes.

Les alíquotes de control van ser descongelades just abans de cada assaig. Una alíquota d'aquest sèrum control era analitzada per triplicat cada 24 mostres.

Els coeficients de variació intra- i inter-sèrie foren menors del 2%.

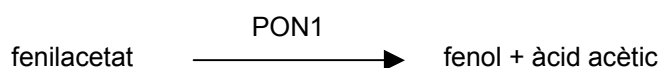
#### RESIDUS I SEGURETAT:

Els residus de paraoxó s'han de llençar en el recipient de dissolvents orgànics no clorats.

Totes les solucions de paraoxó es preparen en una campana de gasos perquè és una substància volàtil neurotòxica. A més, és un possible mutagen que afecta a sistema nerviós i sang. Cal no inhal·lar-ne ni que entri en contacte amb la pell (s'absorbeix a través d'ella). Cal usar bata, guants, mascareta i ulleres de seguretat, i fer les dilucions en la campana de gasos.

### **3.3 Anàlisi de l'activitat arilesterasa (respecte fenilacetat)**

La PON1 catalitza la reacció d'hidròlisi de fenilacetat, per formar fenol i àcid acètic per mitjà de l'anomenada activitat arilesterasa de l'enzim PON1.



Tot i que el fenol absorbeix de forma important a 270 nm a les condicions experimentals de pH8.0, no vam poder monitoritzar la formació de fenol amb l'autoanaltzador Cobas-Mira per manca del filtre necessari per aquest a longitud d'ona. Així doncs, vam emprar l'espectrofotòmetre d'ús manual Hewlett Packard 8452A Diode Array Spectrophotometer. Ens vam basar en el mètode descrit per Gan i cols. <sup>444</sup>.

## REACTIUS:

Buffer: 1 l de solució de Ca Cl<sub>2</sub> 0.9mM, Tris-HCl 20mM, ajustada a pH8.0.

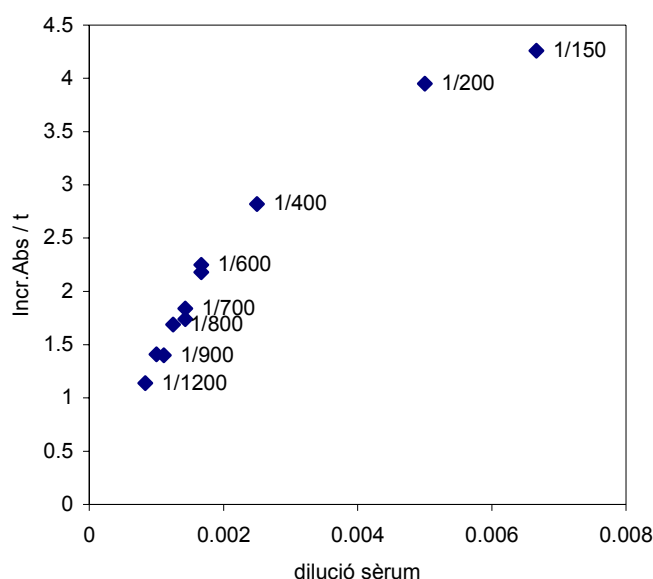
Fenilacetat (PhAc) o fenilacetat concentrat o èster fenilacètic (PM=136.2, dens=1.08 g/ml, Sigma): 1 mM en la solució final, és a dir, s'afegia 128.38 µl de PhAc concentrat a 1 l de Buffer.

Preparàvem reactiu fresc cada dia afegint el PhAc concentrat al Buffer. En aquest cas, no va caldre congelar el reactiu perquè la hidròlisi espontània del PhAc no és prou important.

## MOSTRES:

Per posar a punt aquesta tècnica, vam optimitzar la dilució de sèrum. Escollírem com a concentració de sèrum adient aquella que presentava un valor de  $\Delta Abs/t$  respecte concentració de sèrum dins l'interval de linealitat. A més, no havia de ser massa diluït perquè la reacció no anés massa lenta, ni massa concentrat de manera que s'acabés el substrat massa ràpid en no haver prou substrat per tant d'enzim. La dilució adient va resultar ser la de 1/600.

Vegeu els següents gràfics que representen  $\Delta Abs/t$  ( $10^{-3}$ ) respecte dilució sèrum.



## CINÈTICA:

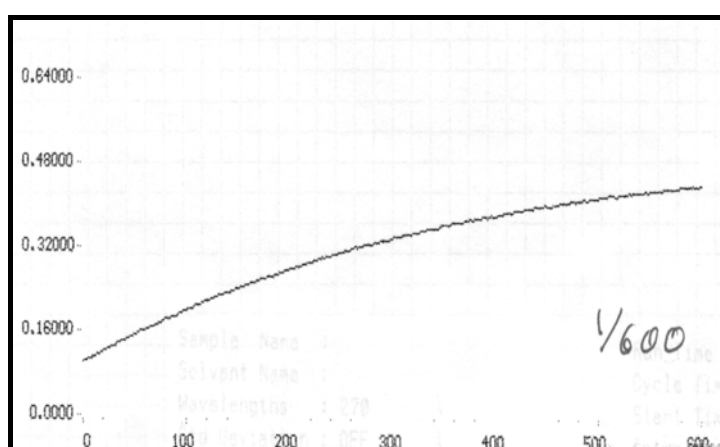
Vam determinar la  $v_0$  d'hidròlisi enzimàtica a 270 nm, a 25°C i en sèrum diluït a 1/600.

El volum final de la cubeta és 3000 µl: 2995 µl reactiu PhAc 1.0mM, Ca Cl<sub>2</sub> 0.9mM, Tris-HCl 20mM pH8.0 + 5 µl sèrum)

Vam usar una cubeta de quars, que no absorbeix radiació de la  $\lambda$  de treball.

Vam realitzar un blanc de reactiu per restar la hidròlisi espontània de fenilacetat, tot usant la mateixa cubeta on després afegim el sèrum i orientada cap al mateix costat.

Per construir la recta que representa la velocitat inicial de la reacció enzimàtica, l'espectrofotòmetre realitzava determinacions a 270 nm al llarg de 50 s (una cada 2 s). Vam comprovar que durant aquest interval de temps la pendent de la funció *Increment d'absorbància enfront Temps* es mantenia lineal, per tant és un interval adequat per mesurar la velocitat inicial de la reacció enzimàtica. També vam comprovar que la hidròlisi espontània del PhAc durant aquest curt període de temps era despreciable. Vegeu el següent gràfic.



Post-dilució: realitzavem una dilució  $\frac{1}{2}$  de la mostra si valors  $>200$  U/ml ja que 200U/ml equivaldria a una dilució  $\frac{1}{200}$  del nostre sèrum control, per tant molt proper a la pèrdua de linealitat (succeïa a valors  $>1/150$ ).

Vam repetir les determinacions de mostres que tenien una desviació estàndard  $>2\%$  respecte a la recta del resultat.

Vam calcular el factor F per convertir  $\frac{\Delta Abs}{\Delta t}$  (en  $s^{-1}$ ) que facilita l'autoanàlitzador, a U/ml.

$$ARE = k * F$$

essent  $k$ , la pendent de la reacció d'ordre zero ( $A_t = k t + A_0$ )

ARE, l'activitat arilesterasa en U/ml

El càlcul del factor F es realitza:

$$1U/ml = \frac{1 \mu\text{mol PhAc hidrolitzat}}{\text{min} * \text{ml sèrum}} =$$

$$\text{Abs} = \varepsilon * c * l$$

$$\text{Abs} = \varepsilon_{\text{PhAc}} * [\text{PhAc}] * l + \varepsilon_{\text{PhOH}} [\text{PhOH}] * l \quad (\text{essent } l = 1 \text{ cm})$$

$$\Delta \text{Abs} = \varepsilon_{\text{PhAc}} * \Delta [\text{PhAc}] + \varepsilon_{\text{PhOH}} * \Delta [\text{PhOH}]$$

Donada la reacció,



$$-\Delta [\text{PhAc}] = \Delta [\text{PhOH}]$$

$$\Delta \text{Abs} = \varepsilon_{\text{PhAc}} * \Delta [\text{PhAc}] + \varepsilon_{\text{PhOH}} * (-\Delta [\text{PhAc}])$$

$$\Delta \text{Abs} = (\varepsilon_{\text{PhAc}} - \varepsilon_{\text{PhOH}}) * \Delta [\text{PhAc}]$$

$$\Delta \text{Abs} = (\varepsilon_{\text{PhOH}} - \varepsilon_{\text{PhAc}}) * \nabla [\text{PhAc}]$$

PhAc hidrolitzat (en definició de U/ml) es refereix a  $\nabla[\text{PhAc}]$  (decrement)

$$\nabla [\text{PhAc}] = \frac{\Delta \text{Abs}}{(\varepsilon_{\text{PhOH}} - \varepsilon_{\text{PhAc}})}$$

$$= \frac{\Delta \text{Abs}}{(\varepsilon_{\text{PhOH}} - \varepsilon_{\text{PhAc}}) * \text{ml sèrum} * \text{min}} =$$

$$= \frac{\Delta \text{Abs} / s}{(\varepsilon_{\text{PhOH}} - \varepsilon_{\text{PhAc}})} \frac{60s}{1 \text{min}} \frac{10^6 \mu\text{mol}}{1 \text{mol}} \frac{1l}{10^3 \text{ml cubeta}} \frac{Y \text{ ml cubeta}}{X \text{ ml sèrum}} =$$

per dilució de sèrum 1/600: Y= 3.000 ml

$$X=0.005 \text{ ml}$$

$$(\varepsilon_{\text{PhOH}} - \varepsilon_{\text{PhAc}})_{270} = 1310 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1} \quad (444)$$

$$= \Delta \text{Abs} / s * 45.80 \frac{Y \text{ ml cubeta}}{X \text{ ml sèrum}} = \Delta \text{Abs} / s * 27481 = \Delta \text{Abs} / s * F$$



essent  $F=27481$  el factor

$\Delta$  Abs/s les unitats en que apareixen les dades en l' espectrofotòmetre.

#### CONTROLS:

Vam usar controls interns elaborats amb el mateix sistema que els controls per determinar l'activitat paraoxonasa.

Els coeficients de variació intra- i inter-sèrie foren menors del 4%.

#### RESIDUS I SEGURETAT:

El fenilacetat és nociu per ingestió.

### **3.4 Determinació dels polimorfismes *PON1-192* i *PON1-55***

L'extracció de DNA genòmic de cèl·lules blanques la vam fer mitjançant el mètode de *salting out*<sup>445</sup>. El tipatge dels polimorfismes *PON1-192* i *PON1-55* el vam realitzar mitjançant reacció en cadena de la polimerasa (PCR) seguida de digestió del fragment amplificat amb enzims de restricció.

El termociclador que vam emprar per la PCR és un *Perkin-Elmer Cetus 2400 Thermal Cycler*, amb el següent programa:

un pas inicial de desnaturalització de 4 minuts a 94°C, seguit de 35 cicles de 30 segons a 94°C (desnaturalització), 1 minut a 61°C (anellament) i 1 minut a 72°C (extensió). La PCR acabava amb un pas final d' extensió de 7 minuts a 72°C.

La seqüència dels primers havien estat descrites per Humbert<sup>446</sup>.

Els primers *forward* i revers eren, respectivament: TATTGTTGCTGTGGGACCTGAG i CACGCTAAACCAAATACATCTC pel polimorfisme *PON1-192*, i GAAGAGTGATGTATAGCCCCAG i TTTAATCCAGAGCTAATGAAAGCC pel polimorfisme *PON1-55*.

Els fragments amplificats eren de 99 bp i 170 bp, respectivament.

Els productes digerits (4 hores a 37°C ) amb els enzims de restricció *A/wI* pel polimorfisme *PON1-192* i *Hsp92II* pel polimorfisme *PON1-55* produïen fragments de 65+34 bp (al·lel R de *PON1-192*) i 126+44 bp (per al·lel M de *PON1-55*). Aquests productes eren separats per electroforesi en gel d'agarosa del 3% durant 75 minuts a 60V.

### **3.5 Anàlisi de lípids, lipoproteïnes i apoproteïnes**

Vam analitzar lípids, lipoproteïnes i apoproteïnes en mostres sèriques obtingudes després d'una nit de dejuni.

Vam determinar la concentració de CT i TG mitjançant mètodes enzimàtics (Roche Diagnostica, Suïssa). Per determinar el c-HDL vam emprar la mateixa metodologia que per determinar el CT, però després de la precipitació (amb fosfotungstat de Mg<sup>2+</sup>) de les lipoproteïnes que contenen apoB (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany)<sup>447</sup>. Vam calcular el c-LDL mitjançant la fórmula de Friedewald<sup>448</sup>. Després de ultracentrifugació vam determinar el colesterol-VLDL i TG-VLDL. Determinarem la concentració sèrica d'apoAI i apoB per immunoturbidimetria (Roche Diagnostica), la concentració de LpAI per immunoelectrodifusió (Sebia) i vam calcular la concentració de HDL que conté apoAI i apoAII (LpAI:AII) a partir de la diferència entre l'apoAI sèrica total i la concentració de LpAI.

### **3.6 Anàlisi de TBARS**

Vam fer una determinació aproximada de la peroxidació lipídica pel mètode dels TBARS descrit en la referència<sup>449</sup>.

### **3.7 Anàlisi de LDL oxidada**

Vam determinar la concentració de LDL oxidada mitjançant un ELISA (MercoDIA AB, Uppsala, Suècia) usant dos anticossos contra els determinants antigènics de la molècula de apoB oxidada.

### **3.8 Ajustament per canvis de volum plasmàtic**

En la realització d'activitat física aguda, el volum del plasma d'un mateix individu sofreix un canvi que és important en alguns dels casos. Així doncs, en l'estudi de l'efecte de la intervenció de l'activitat física (Capítol II) vam ajustar els valors de totes les determinacions fetes en sèrum als canvis de volum, segons està descrit a la referència<sup>450</sup>.

### **3.9 Obtenció de dades antropomètriques i qüestionaris**

Vam recollir les dades antropomètriques i informació proporcionada per qüestionaris sobre activitat física, dieta, consum de tabac i alcohol, diabetis, consum de fàrmacs hipolipemiants, antihipertensius o antidiabètics. Incloem el qüestionari usat en el Capítol III en l'Annex.

### **3.10 Anàlisi estadística**

Per comparar freqüències al·lèliques, el compliment de l'equilibri de Hardy-Weinberg i diferències entre variables categòriques vam aplicar el test de chi-quadrat.

Per testar la influència d'un polimorfisme sobre variables fenotípiques o sobre el risc de CHD, vam aplicar el test t de Student aparellat o no (dependent del tipus d'estudi) per variables normals, i la U de Mann-Whitney o el test de Wilcoxon per variables no normals. La correlació de Pearson o de Spearman va usar-se per estimar l'associació entre variables normals o no normals, respectivament.

A més vam fer l'anàlisi multivariant, mitjançant una anàlisi de la varianza multivariant (MANOVA) o regressió logística per variables fenotípiques o risc de CHD respectivament, sempre ajustant per variables confusores.

Per testar interaccions entre factors ambientals i genètics vam aplicar MANOVA o regressió logística.

Quan la variable activitat paraoxonasa no seguia una distribució normal, vam aplicar una transformació logarítmica.

Vam calcular els coeficients de variació (CV):

. CV intersèrie

$$CV \text{ intersèrie} = 100 * \frac{\text{desv est}}{\text{mitja}}$$

agafant totes les dades de totes les sèries de l'estudi.

. CV intrasèrie = mitja de CV de cada sèrie (CV sèrie)

$$CV \text{ sèrie} = 100 * \frac{\text{desv est}}{\text{mitja}}$$

agafant les dades d'una mateixa sèrie.



## **4. Resultats**



## **4. RESULTATS**

A continuació adjuntem com a resultats els tres articles presentats en aquesta tesi.





**4.1 Capítol I:**

***Effect of simvastatin therapy on paraoxonase activity and related lipoproteins in familial hypercholesterolemic patients.***

Podeu consultar l'article a:

**Marta Tomás**, Mariano Sentí, Ferran García-Faria, Juan Vila, Alex Torrents, Maribel Covas, Jaume Marrugat, "Effect of Simvastatin Therapy on Paraoxonase Activity and Related Lipoproteins in Familial Hypercholesterolemic Patients", ***Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology***, September 2000 20(9):2113-2119

**4.2 Capítol II:**

***Paraoxonase1-192 polymorphism modulates the effects of regular and acute exercise on paraoxonase1 activity.***

Podeu consultar l'article a:

**Marta Tomás**, Roberto Elosua, Mariano Sentí, Luis Molina, Joan Vila, Roger Anglada, Montserrat Fitó, Maria Isabel Covas, Jaume Marrugat.  
"Paraoxonase1-192 polymorphism modulates the effects of regular and acute exercise on paraoxonase1 activity". ***Journal of Lipid Research*** 2002 Volume 43(5):713-720

**4.3 Capítol III:**

***Interaction between the Gln-Arg 192 variants of the paraoxonase gene and oleic acid intake as a determinant of high-density lipoprotein cholesterol and paraoxonase activity.***



# Interaction between the Gln–Arg 192 variants of the paraoxonase gene and oleic acid intake as a determinant of high-density lipoprotein cholesterol and paraoxonase activity

Marta Tomás<sup>a</sup>, Mariano Sentí<sup>a,b,\*</sup>, Roberto Elosua<sup>a</sup>, Joan Vila<sup>a</sup>, Joan Sala<sup>c</sup>, Rafel Masià<sup>c</sup>,  
Jaume Marrugat<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Lipids and Cardiovascular Epidemiology Unit, Institut Municipal d'Investigació Mèdica, IMIM, Barcelona, Spain

<sup>b</sup>Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain

<sup>c</sup>Department of Cardiology, University Hospital Dr Trueta, Gerona, Spain

Received 10 May 2001; received in revised form 15 October 2001; accepted 19 October 2001

## Abstract

Olive oil, rich in oleic acid, could play a particular beneficial role in the anti-atherogenic effects attributed to the Mediterranean diet. Paraoxonase (PON1) has emerged as the component of high-density lipoproteins (HDL) most likely to explain its ability to attenuate the oxidation of low-density lipoproteins. We hypothesised that oleic acid intake might be associated with changes in PON1–HDL associated particles, and investigated the impact, if any, on this association of the PON1–192 polymorphism, a common polymorphism that strongly modulates PON1 activity. Six hundred and fifty-four men randomly selected from the census were studied. Oleic acid intake was calculated from a 72-h recall questionnaire with specific software. Oleic acid intake groups (low vs. high) were created by stratifying the population according the median value as a cut-point. After adjusting for confounding variables, high oleic acid intake was associated with increased HDL cholesterol levels and PON1 activity only in subjects with the QR and the RR genotypes, respectively. Analyses of the variance showed a statistically significant interaction between PON1–192 genotypes and oleic acid intake for log PON1 activity ( $P=0.005$ ) and a marginally significant interaction for HDL cholesterol ( $P=0.066$ ). These results suggest that the beneficial effect of increasing oleic acid intake on HDL and PON1 activity at population level is especially observed in subjects carrying the R allele of the PON1–192 polymorphism. © 2001 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Paraoxonase; Gene–diet interaction; High-density lipoprotein

## 1. Introduction

The so-called “French paradox” has been described as an apparent coexistence of high-fat diet with low incidence of coronary heart diseases (Artaud-Wild et al., 1993). An extension of this paradox can be found in other southern European countries, such as Spain, where low acute myocardial infarction incidence and mortality rates have been found together with high cardiovascular risk factor prevalence at population level (Masià et al., 1998; Pérez et al., 1998). The factors in Spain that confer sufficient protection

to compensate for the high cardiovascular risk factor prevalence remain to be elucidated. However, it is likely that lifestyle factors, such as diet or physical activity and their interactions with genes, may contribute to neutralising other factors with negative effects.

Diet is one of the major environmental factors playing an important role in the different coronary heart disease incidence rates between northern Europe or the United States and Mediterranean countries. Olive oil, rich in oleic acid, could play a particular beneficial role in coronary heart disease prevention and in the antiatherogenic effects attributed to the Mediterranean diet. Oleic acid may exert beneficial effects on the pathogenesis of vascular disease through a variety of mechanisms, such as reducing smooth muscle cell DNA synthesis and low-density lipoprotein (LDL) levels, and protect LDL from oxidation (Mata et al., 1997), inducing less monocyte chemotaxis and adhesion

\* Corresponding author. Lipids and Cardiovascular Epidemiology Unit, Institut Municipal d'Investigació Mèdica, Dr Aiguader 80, E-08003, Barcelona, Spain. Tel.: +34-93-2211009; fax: +34-93-2213237.

E-mail address: msenti@imim.es (M. Sentí).

when exposure to oxidative stress exists (Tsimikas et al., 1999), and inhibiting endothelial activation (Carluccio et al., 1999). With regard to oxidative modification of lipoproteins, it has also been described that phenolic compounds present in olive oil may contribute to the endogenous antioxidant capacity of LDL (Wiseman et al., 1997) and that an oleic acid-rich diet protects against the oxidative modification of high-density lipoproteins (HDL) (Solà et al., 1997). Concerning lipids and lipoproteins, dietary oleic acid was considered to be “neutral”, neither raising nor lowering serum cholesterol levels (Grundy, 1996).

Paraoxonase (PON1) is a calcium-dependent esterase closely associated with HDL-containing apolipoprotein AI that has been reported to confer antioxidant properties to HDL by decreasing the accumulation of lipid peroxidation products (Mackness et al., 1991a). It has been suggested that PON1 is related to coronary heart disease risk (Ruiz et al., 1995; Serrato and Marian, 1995) and that its activity, usually measured using paraoxon as a substrate, is under genetic and environmental regulation and appears to largely vary among individuals and populations. One molecular basis of the variations in PON1 activity is a polymorphism in the PON1 gene located in chromosome 7, which is clustered with at least two other related genes, PON2 and PON3 (Primo-Parmo et al., 1996). PON1 genetic polymorphism comprises PON1 Q, an isoform with low activity towards paraoxon hydrolysis, which has a glutamine at position 192, while the high-activity PON1 R isoform contains an arginine at position 192 (Mackness et al., 1996).

Whereas some authors have failed to find associations between the variation in PON1 gene and changes in lipoprotein concentrations (Antikainen et al., 1996; Sanghera et al., 1997), others have found significant associations of PON1-192 genetic variants with changes in HDL-cholesterol levels and in triglyceride concentrations in a relatively genetically isolated population (Hegele et al., 1995; Boright et al., 1998).

Since an olive oil-rich diet has been recognised to have antioxidant properties, we hypothesised that oleic acid intake might be associated with changes in PON1-HDL associated particles. On the other hand, we investigated the impact of the PON1-192 polymorphism, if any, on the relationship between oleic acid intake and PON1 activity and lipoproteins in a random sample population.

## 2. Subjects and methods

### 2.1. Subjects

Six hundred and fifty-four men, aged 25–74, were randomly selected from a representative population sample in a cross-sectional study (the REGICOR study) designed to establish the prevalence of main cardiovascular risk factors in the province of Gerona, Spain where the incidence of

myocardial infarction was found to be low (Masiá et al., 1998; McGovern et al., 1996; Marrugat and Sentí, 2000). All subjects completed a smoking questionnaire consisting of eight questions regarding current and past cigarette consumption. Since all ex-smokers of the studied population had stopped smoking at least 6 months before examination, nonsmokers were classified as either those who had never smoked or ex-smokers. The Minnesota Leisure Time Physical Activity Questionnaire was used to assess energy expenditure in leisure time physical activity (EEPA) during the previous year (Taylor et al., 1978). The EEPA questionnaire has been validated for use among Spanish men (Elosua et al., 1994) and was administered by a trained interviewer. All subjects gave their written informed consent to participate. The protocol was approved by an ethics committee. Thirty-seven men taking anti-hypertensives or lipid lowering drugs were excluded from the analyses that included comparisons of parameters by genotype and oleic acid intake groups.

### 2.2. Dietary assessment

Dietary information was obtained using a 72-h recall questionnaire, which was administered by a trained interviewer and validated for use among Spanish people (Schröder et al., 2001). The questionnaire contained a food list. Participants were requested to precisely describe their food and beverage intakes during the previous 3 days. Each of the foods listed was characterised by a full description of the usual serving size. Ninety different foods typical of the eating habits in northeastern Spain (e.g. local bread with olive oil and tomatoes, or the amount and type of oil used for salad and vegetable dressing) were selected to fit typical population alimentary habits. Furthermore, some generic foods had open questions for the participants to specify details of their type and serving sizes. In this case, the interviewer requested the exact food type (e.g. type of cheese or salad ingredients). The precise preparation of foods was taken into account to include all the ingredients (e.g. oil or butter for frying). Oleic acid intake was calculated from the 72-h recalls with the software *Diet Analysis Nutritionist IV* (N Squared Computing, San Bruno, CA). The database of this software includes 9879 food items complemented with food items from Spanish food composition tables (Hurren et al., 1987; Jiménez Cruz et al., 1994; Moreiras et al., 1992).

### 2.3. Biochemical analyses

#### 2.3.1. Analyses of lipids and lipoproteins

Blood samples were collected after an overnight fast. Serum cholesterol (Roche Diagnostica, Basel, Switzerland, Ref: 0736635) and triglyceride levels (Roche Diagnostica, Ref: 0736791) were determined enzymatically. LDL cholesterol was calculated by the Friedewald formula (Friedewald et al., 1972). HDL cholesterol was measured as



cholesterol after precipitation of apolipoprotein B-containing lipoproteins with phosphotungstic-Mg<sup>2+</sup> (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany, Ref: 543004) (Lopes-Virella et al., 1977). Inter-assay coefficients of variation were 2.5%, 4.5% and 3.2% for total cholesterol, HDL cholesterol, and triglycerides, respectively.

### 2.3.2. Analysis of PON1 activity

For PON1 activity analysis, samples frozen at  $-70^{\circ}\text{C}$ , which were thawed just before the beginning of each assay, were used. PON1 activity towards paraoxon was measured following the reaction of paraoxon hydrolysis into *p*-nitrophenol and diethylphosphate catalysed by the enzyme. PON1 activity was determined from initial velocity of *p*-nitrophenol production (subtracting the spontaneous paraoxon hydrolysis) at  $37^{\circ}\text{C}$  and recorded at 405 nm by a Cobas-Mira Plus autoanalyzer (Roche Diagnostica). Forty microliters of serum was added to a basal assay mixture to reach final concentrations of 5 mM paraoxon, 1.9 mM CaCl<sub>2</sub>, 90 mM Tris-HCl (at pH 8.5) and 3.6 mM NaCl. Two strategies were followed to avoid spontaneous hydrolysis of diluted paraoxon solutions. First, a blank determination of basal assay mixture without serum was made. Second, 5 mM paraoxon basal assay mixture aliquots frozen at  $-40^{\circ}\text{C}$  were used and thawed just before the beginning of each assay. Frozen aliquots of a serum pool, used as an internal control, were thawed just before the beginning of assay. One aliquot of serum pool was measured in triplicate every 24 samples. The serum pool was used to correct for inter-assay variations. A PON1 activity of 1 U/l was defined as 1  $\mu\text{mol}$  of *p*-nitrophenol formed per

min per serum litre. The molar extinction coefficient of *p*-nitrophenol is  $18,053\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$  at pH 8.5. Analytical within-run imprecision was determined by 20 replicate measurements of three different serum samples with different PON1 activity. Analytical between-run imprecision was determined from 20 day-to-day measurements of the same three samples. The intra- and inter-assay coefficients of variation were under 1.7%.

### 2.4. PON1-192 genotype determination

Genomic DNA was isolated from white cells by the salting out method (Miller et al., 1989). Polymerase chain reactions (PCR) were performed using primer sequences derived from published data (Humbert et al., 1993). We used the following primers for amplification of the 99 base pairs sequence encompassing codon 192: 5' TAT TGT TGC TGT GGG ACC TGA G 3' and 5' CAC GCT AAA CCC AAA TAC ATC TC 3'. The amplification cycle was performed on a Perkin Elmer Cetus 2400 Thermal Cycler with initial denaturation for 4 min at  $94^{\circ}\text{C}$ , followed by 35 cycles of 30 s at  $94^{\circ}\text{C}$ , 1 min at  $61^{\circ}\text{C}$  and 1 min at  $72^{\circ}\text{C}$ , and finally by 7 min of extension at  $72^{\circ}\text{C}$ . PCR products were digested with *AlwI* for 4 h at  $37^{\circ}\text{C}$  and the samples electrophoresed in 3% agarose gels for 75 min at 60 V.

### 2.5. Statistical analysis

The chi square test was used to analyse the association between categorical variables. PON1 activity was log transformed to fit a normal distribution. For comparisons of

Table 1

Clinical characteristics, lipid and lipoprotein concentrations, log PON1 activity and PON1-192 genotypes of men stratified by the categorised oleic acid intake<sup>a</sup>

|   | All (n=654)         | Low oleic acid intake (n=327) | High oleic acid intake (n=327) | P      |
|---|---------------------|-------------------------------|--------------------------------|--------|
| Age (years)                             | 50.3 (13.9)         | 48.6 (14.1)                   | 52.0 (13.5)                    | 0.002  |
| Kilocalories per day                    | 2306.2 (522.9)      | 2338.0 (527.8)                | 2274.3 (516.8)                 | 0.120  |
| Oleic acid intake (g $\times$ 100 kcal) | 1.41 (0.31)         | 1.17 (0.17)                   | 1.65 (0.22)                    | <0.001 |
| BMI (kg/m <sup>2</sup> )                | 26.5 (3.8)          | 26.2 (3.8)                    | 26.9 (3.8)                     | 0.034  |
| EEPA (kcal/day)                         | 247.0 (125.0–452.0) | 237.0 (102.2–422.7)           | 254.0 (138.0–494.0)            | 0.156  |
| Alcohol (g/week)                        | 249.0 (36.0–504.0)  | 182.0 (0.0–476.0)             | 252.0 (71.2–504.0)             | 0.042  |
| Smokers (n (%))                         | 196 (30.0)          | 105 (32.1)                    | 91 (27.8)                      | 0.232  |
| Total cholesterol (mg/dl)               | 223.3 (43.8)        | 221.4 (43.6)                  | 225.1 (44.1)                   | 0.281  |
| Triglycerides (mg/dl)                   | 99.0 (72.0–139.7)   | 99.0 (74.0–140.0)             | 98.0 (71.0–138.0)              | 0.669  |
| LDL cholesterol (mg/dl)                 | 151.4 (40.2)        | 150.5 (38.2)                  | 152.2 (42.2)                   | 0.602  |
| HDL cholesterol (mg/dl)                 | 47.8 (13.8)         | 46.7 (12.9)                   | 49.0 (14.5)                    | 0.036  |
| Log PON1 activity                       | 5.45 (0.49)         | 5.42 (0.46)                   | 5.48 (0.51)                    | 0.277  |
| PON1-192 genotypes                      |                     |                               |                                |        |
| QQ (n (%))                              | 308 (47.1)          | 161 (49.2)                    | 147 (45.0)                     |        |
| QR (n (%))                              | 281 (43.0)          | 139 (42.5)                    | 142 (43.4)                     | 0.282  |
| RR (n (%))                              | 65 (9.9)            | 27 (8.3)                      | 38 (11.6)                      |        |

Continuous variables are expressed as mean (S.D.) or median (interquartile range).

<sup>a</sup> Men were stratified in two groups according to the median value of oleic acid intake $\times$ 100 kcal. BMI, body mass index; EEPA, daily energy expenditure in leisure-time physical activity.

continuous variables between groups, Student's *t*-test or Mann–Whitney *U*-test were performed. Pearson correlation coefficients were used to test the strength of the association between oleic acid intake and serum parameters. Oleic acid intake groups (low vs. high) were created by stratifying the population into two groups using the median oleic acid intake (in g/100 kcal of daily caloric intake) as a cut-point. Analyses of the variance were performed to test for gene–diet interaction on log PON1 activity and HDL cholesterol

in models that included age, body mass index [calculated as weight (kg)/height<sup>2</sup> (m<sup>2</sup>)], smoking, alcohol consumption and daily EEPA.

### 3. Results

Subjects in the high oleic acid intake group were older, showed higher mean values of body mass index, HDL

Table 2

Clinical characteristics, lipid and lipoprotein concentrations, and log PON1 activity of men stratified by PON1–192 genotypes and the categorised oleic acid intake

|                                | All<br>( <i>n</i> =308)  | Low oleic acid intake <sup>a</sup><br>( <i>n</i> =161) | High oleic acid intake <sup>a</sup><br>( <i>n</i> =147) | <i>P</i> |
|--------------------------------|--------------------------|--|---|----------|
| QQ                             |                          |  |   |          |
| Age (years)                    | 50.9 (13.6)              | 49.5 (14.0)  | 52.4 (13.1)   | 0.061    |
| Kilocalories per day           | 2336.3 (561.6)           | 2347.1 (548.9)   | 2324.5 (576.8)  | 0.725    |
| Oleic acid intake (g×100 kcal) | 1.40 (0.29)              | 1.19 (0.16)  | 1.63 (0.21)   | <0.001   |
| BMI (kg/m <sup>2</sup> )       | 26.5 (3.9)               | 26.3 (3.9)   | 26.6 (3.8)  | 0.498    |
| EEPA (kcal/day)                | 237.0 (136.0–423.0)      | 229.5 (126.5–412.0)                                    | 247.0 (145.0–494.0)                                     | 0.334    |
| Alcohol (g/week)               | 252.0 (52.0–504.0)       | 252.0 (52.0–470.0)                                     | 252.0 (45.0–504.0)                                      | 0.530    |
| Smokers ( <i>n</i> (%))        | 91 (29.5)                | 51 (31.7)  | 40 (27.2)   | 0.391    |
| Total cholesterol (mg/dl)      | 226.5 (42.2)             | 227.4 (43.2)   | 225.5 (41.1)  | 0.702    |
| Triglycerides (mg/dl)          | 101.5 (73.7–142.5)       | 104.0 (74.0–145.0)                                     | 100.0 (73.0–142.0)                                      | 0.784    |
| LDL cholesterol (mg/dl)        | 153.5 (38.3)             | 154.4 (37.9)   | 152.5 (38.8)  | 0.679    |
| HDL (mg/dl)                    | 48.6 (13.6)              | 48.4 (13.6)  | 48.7 (13.7)   | 0.879    |
| Log PON1 activity              | 5.06 (0.24)              | 5.07 (0.26)  | 5.05 (0.22)   | 0.733    |
| QR                             | ( <i>n</i> =281)         | ( <i>n</i> =139)                                       | ( <i>n</i> =142)  |          |
| Age (years)                    | 49.8 (14.1)              | 47.7 (13.7)  | 51.9 (14.2)   | 0.011    |
| Kilocalories per day           | 2274.9 (484.1)           | 2326.6 (511.4)   | 2224.3 (451.8)  | 0.076    |
| Oleic acid intake (g×100 kcal) | 1.42 (0.33)              | 1.17 (0.17)  | 1.67 (0.24)   | <0.001   |
| BMI (kg/m <sup>2</sup> )       | 26.7 (3.8)               | 26.4 (3.7)   | 27.0 (3.8)  | 0.179    |
| EEPA (kcal/day)                | 261.0 (126.0–498.0)      | 260.0 (98.0–493.0)                                     | 267.5 (145.5–509.2)                                     | 0.414    |
| Alcohol (g/week)               | 216.5 (27.5–504.0)       | 139.0 (0.0–504.0)                                      | 252.0 (88.0–495.5)                                      | 0.057    |
| Smokers ( <i>n</i> (%))        | 85 (30.2)                | 44 (31.7)  | 41 (28.9)   | 0.612    |
| Total cholesterol (mg/dl)      | 221.4 (44.7)             | 218.0 (43.9)   | 224.6 (45.4)  | 0.223    |
| Triglycerides (mg/dl)          | 96.0 (71.0–138.0)        | 98.0 (76.5–143.0)                                      | 92.5 (70.0–134.2)                                       | 0.213    |
| LDL cholesterol (mg/dl)        | 150.2 (41.8)             | 148.3 (39.0)   | 152.1 (44.4)  | 0.457    |
| HDL (mg/dl)                    | 47.4 (14.2)              | 45.0 (12.2) <sup>b</sup>                               | 49.6 (15.6)   | 0.007    |
| Log PON1 activity              | 5.81 (0.25) <sup>c</sup> | 5.82 (0.26) <sup>c</sup>                               | 5.80 (0.24) <sup>c</sup>                                | 0.578    |
| RR                             | ( <i>n</i> =65)          | ( <i>n</i> =27)  | ( <i>n</i> =38)   |          |
| Age (years)                    | 49.4 (14.6)              | 47.7 (16.7)  | 50.7 (13.0)   | 0.433    |
| Kilocalories per day           | 2298.5 (493.3)           | 2342.6 (499.6)   | 2267.1 (493.1)  | 0.547    |
| Oleic acid intake (g×100 kcal) | 1.41 (0.32)              | 1.12 (0.19)  | 1.62 (0.20)   | <0.001   |
| BMI (kg/m <sup>2</sup> )       | 26.2 (3.5)               | 24.7 (2.9) <sup>d</sup>                                | 27.2 (3.6)  | 0.005    |
| EEPA (kcal/day)                | 218.0 (92.0–396.0)       | 210.0 (25.0–369.0)                                     | 219.0 (103.5–437.0)                                     | 0.394    |
| Alcohol (g/week)               | 126.0 (0.0–380.0)        | 42.0 (0.0–364.0)                                       | 159.5 (12.0–467.2)                                      | 0.118    |
| Smokers ( <i>n</i> (%))        | 20 (30.8)                | 10 (37.0)  | 10 (26.3)   | 0.356    |
| Total cholesterol (mg/dl)      | 216.7 (47.2)             | 204.2 (39.4)   | 225.6 (50.7)  | 0.071    |
| Triglycerides (mg/dl)          | 102.0 (69.0–134.0)       | 96.0 (59.0–121.0)                                      | 117.0 (74.0–153.2)                                      | 0.055    |
| LDL cholesterol (mg/dl)        | 146.8 (42.0)             | 140.1 (33.1)   | 151.5 (47.1)  | 0.284    |
| HDL (mg/dl)                    | 46.3 (12.8)              | 44.5 (11.4)  | 47.6 (13.7)   | 0.338    |
| Log PON1 activity              | 6.16 (0.27) <sup>c</sup> | 5.94 (0.25) <sup>c</sup>                               | 6.28 (0.19) <sup>c</sup>                                | 0.001    |

Continuous variables are expressed as mean (S.D.) or median (interquartile range).

<sup>a</sup> Men were stratified in two groups according to the median value of oleic acid intake×100 kcal. BMI, body mass index; EEPA, daily energy expenditure in leisure-time physical activity.

<sup>b</sup> Significantly different from QQ homozygotes, *P*=0.028.

<sup>c</sup> Significantly different from QQ homozygotes, *P*<0.001.

<sup>d</sup> Significantly different from QQ homozygotes, *P*=0.049.

cholesterol concentration, and alcohol consumption than those in the low oleic acid intake group (Table 1). Log PON1 activity tended to be higher in subjects in the high oleic acid intake category than in the low (involving a mean increase in PON1 activity of around 14 U/l), although differences did not reach statistical significance. No differences between the two groups with regard to PON1–192 genotype distribution were found.

Serum lipid and lipoprotein concentrations of the R carrier groups in the overall study group were similar to those of QQ homozygotes (Table 2). As expected, log PON1 activity was significantly lower in the subset of the low-activity PON1 QQ genotype subjects than in those who were QR or RR ( $P < 0.001$ ).

The hypothesis that PON1–192 polymorphism might modify the relationship between the oleic acid intake and serum parameters was explored by stratifying subjects in the three PON1–192 genotypes and oleic acid intake categories (Table 2). No differences were found in clinical characteristics, lipids and lipoproteins, or log PON1 activity between oleic acid intake groups of QQ homozygotes. However, QR heterozygotes with high oleic acid intake showed significantly higher HDL cholesterol concentration than low oleic acid intake subjects. RR subjects included in the high oleic acid intake group showed significantly higher PON1 activity than those of the low intake group. It is noteworthy that HDL cholesterol concentration in QR subjects was significantly lower than QQ homozygotes only in the low oleic acid intake group. PON1 activity was significantly higher in QR subjects and RR homozygotes than in QQ homozygotes, despite the oleic acid intake.

A significant correlation between oleic acid intake and log PON1 activity was found only in RR heterozygotes ( $r = 0.595$ ,  $P = 0.001$ ). No significant correlation was found between these variables in the overall study group, or between oleic acid intake and HDL cholesterol, or between

HDL cholesterol and log PON1 activity in any considered category. To further explore whether an interaction existed between genotype and oleic acid intake, analyses of the variance adjusting by age, body mass index, smoking, alcohol consumption and physical activity covariables were carried out. A statistically significant interaction between PON1–192 genotypes and oleic acid intake for log PON1 activity was observed ( $P = 0.005$ ) (Table 3). The interaction between oleic acid intake and PON1–192 genotypes for HDL cholesterol was marginally significant ( $P = 0.066$ ).

#### 4. Discussion

Human and animal studies strongly support the hypothesis that oxidative modification of LDLs plays a crucial role in the pathogenesis of atherosclerosis (Berliner and Heinecke, 1996). Therefore, mechanisms preventing LDL oxidation appear to be antiatherogenic. In this respect, HDL-associated PON1 may be a major defence barrier against lipid peroxides from oxidised LDLs (Mackness et al., 1993). Conversely, PON1 activities (activities towards paraoxon and towards oxidised lipids) can be inhibited by oxidative stress, and the degree of inhibition depends on the PON1–192 genotype (Aviram et al., 1999). R allozyme is supposed to give worse protection against oxidation and be more easily impaired than the Q allozyme (Mackness et al., 1997, 1998; Aviram et al., 1998, 2000).

The Mediterranean diet has been claimed to be one of the reasons for the low incidence of coronary heart disease, despite the high prevalence of cardiovascular risk factors (Masiá et al., 1998; Marrugat and Sentí, 2000). The Mediterranean diet is rich in monounsaturated fatty acids, particularly oleic acid, which confers antiatherogenic benefits through a variety of mechanisms.

Since an olive oil-rich diet has been recognised to have antioxidant properties, and since PON1–192 polymorphism has been shown to be related to a variation in HDL cholesterol levels in some population based studies, the hypothesis under consideration was that this genetic marker may influence the possible association of oleic acid intake with changes in PON1 HDL associated particles. Our results showed that the interaction between PON1–192 genotype and the oleic acid intake resulted in differences, particularly in PON1 activity levels. High oleic acid intake was associated with increased PON1 activity levels only in men who were homozygotes for the R allele. HDL cholesterol concentration was significantly higher in subjects with a high oleic acid intake than in those with a low oleic acid intake only in the QR genotype. HDL cholesterol was also found increased in RR subjects with a high oleic acid intake, but differences did not reach statistical significance, probably owing to the small number of RR subjects. On the other hand, QR subjects in the lower oleic acid intake category had a HDL cholesterol concentration mean significantly

Table 3  
Effect of interaction of oleic acid intake and PON1–192 genotype on log PON1 activity and HDL cholesterol concentration

|  | Log PON1 activity |         | HDL cholesterol |         |
|--|-------------------|---------|-----------------|---------|
|  | F value           | P value | F value         | P value |
| Oleic acid intake <sup>a</sup>           | 7.31              | 0.007   | 3.17            | 0.075   |
| PON1–192 genotype                        | 421.54            | <0.001  | 0.58            | 0.562   |
| Oleic acid intake ×<br>PON1–192 genotype | 5.46              | 0.005   | 2.73            | 0.066   |
| Age                                      | 22.98             | <0.001  | 0.01            | 0.914   |
| BMI                                      | 0.15              | 0.703   | 33.52           | <0.001  |
| Smoking                                  | 1.59              | 0.208   | 10.84           | 0.001   |
| Alcohol consumption                      | 1.90              | 0.174   | 42.48           | <0.001  |
| EEPA                                     | 0.01              | 0.930   | 2.05            | 0.152   |

<sup>a</sup> Men were stratified in two groups according to the median value of oleic acid intake × 100 kcal. BMI, body mass index; EEPA, daily energy expenditure in leisure-time physical activity.

lower than QQ homozygote men in the same category. HDL cholesterol was also lower in RR subjects with a low acid intake than QQ homozygotes in the same category, but differences did not reach statistical significance due to the small number of RR homozygotes. These differences disappeared when R carrier subjects and QQ homozygotes in the high oleic acid intake group were compared. All these findings suggest that the effects of common polymorphisms on a particular trait depend on the presence of a specific life style and other environmental factors, and may explain discrepancies among association studies. For example, the R allele, which has been related to increased cardiovascular risk in some studies (Ruiz et al., 1995; Serrato and Marian, 1995), may be deleterious only in sedentary subjects (Sentí et al., 2000) or in subjects consuming an oleic acid-poor diet, both appear to have considerably more adverse HDL-cholesterol concentrations than subjects with the QQ genotype.

The findings observed in the present study raise some interesting considerations. It has been reported that LDL isolated after diets rich in monounsaturated fatty acids oxidises less readily than LDL obtained from diets rich in polyunsaturated acids, and that this difference depends on the content of oleic acid in LDL particles (Bonanome et al., 1992; Reaven et al., 1993). On the other hand, HDL rich in oleic acid was less easily oxidised, regardless of the content of antioxidants such as vitamins A and E (Solà et al., 1997). We show here that a high oleic acid intake was associated with significantly increased HDL cholesterol concentrations and PON1 activity levels in QR and RR subjects, respectively. We also show that oleic acid intake positively correlated PON1 activity in subjects who were homozygotes for the R allele. Altogether, these findings support the idea that an oleic acid-rich diet gives protection against lipoprotein oxidation, particularly in men carrying one or two R alleles, and introduces the enhanced PON1 activity and its HDL related lipoprotein as a likely mechanism for this effect.

In view of previous findings, in which there were differences in the lipoprotein profile according to the amount of regular physical activity only in R carriers (Sentí et al., 2000), it seems reasonable to postulate that the HDL-R PON1 associated particle is more susceptible to changes in environmental factors, such as physical activity or diet. Although the association of PON1–192 polymorphism with changes in lipid and lipoprotein concentrations remains unclear, PON1 is strongly linked to HDL. It has also been reported that plasma concentrations of PON1 are positively correlated with HDL-cholesterol and apo AI, and negatively with total cholesterol and apo B (Blatter-Garin et al., 1994). PON1 activity seems to be decreased in patients with familial hypercholesterolemia compared with control subjects (Mackness et al., 1991b; Tomás et al., 2000). These observations suggest a relationship between lipoprotein metabolism and PON1, the latter being in turn strongly modulated by the PON1–192 polymorphism. On

the other hand, there are cumulating evidence that a number of genes associated with lipid metabolism have their expressions controlled by the intracellular levels of fatty acids (Amri et al., 1996; Cheema and Clandinin, 1996; Sfeir et al., 1997). In this respect, the PON1 gene would be another gene to be added to the list of this kind of genes.

Given the potential benefit of having high HDL cholesterol and PON1 activity levels as a desirable antioxidant status, the results of the present study suggest that any direct intervention towards increasing the amount of oleic acid intake in subjects carrying one or two R alleles should theoretically reduce the risk of atherosclerosis with considerable specificity.

In summary, an oleic acid-rich diet may be beneficial in individuals who carry one or more PON1–192 R alleles, which constitutes 50% of the population, to achieve favourable antioxidant status similar to that observed in PON1 QQ homozygous subjects.

### Acknowledgements

This study was supported by grants from the Fondo de Investigaciones Sanitarias 99/0013-01, 99/9342; CICYT 1FD97-0626 and CIRIT 1999SGR00243. We appreciate the English revision made by Ms. Stephanie Lonsdale and Dave Mcfarlane.

### References

- Amri, E.Z., Teboul, L., Vannier, C., Grimaldi, P.A., 1996. Fatty acids regulate the expression of lipoprotein lipase gene and activity in pre-adipose and adipose cells. *Biochem. J.* 314, 541–546.
- Antikainen, M., Murtoimäki, S., Syväne, M., Pahlman, R., Tahvanainen, E., Jauhainen, M., Frick, M.H., Ehnholm, C., 1996. The Gln–Arg191 polymorphism of the human paraoxonase gene (HUMPONA) is not associated with the risk of coronary heart disease in Finns. *J. Clin. Invest.* 98, 883–885.
- Artaud-Wild, S.M., Connor, S.L., Sexton, G., Connor, W.E., 1993. Differences in coronary mortality can be explained by differences in cholesterol and saturated fat intakes in 40 countries but not in France and Finland. *Circulation* 88, 2771–2779.
- Aviram, M., Billecke, S., Sorenson, R., Bisgaier, C., Newton, R., Rosenblat, M., Erogul, J., Hsu, C., Dunlop, C., La Du, B., 1998. Paraoxonase active site required for protection against LDL oxidation involves its free sulfhydryl group and is different from that required for its arylesterase/paraoxonase activities: selective action of human paraoxonase allozymes Q and R. *Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol.* 18, 1617–1624.
- Aviram, M., Rosenblat, M., Billecke, S., Erogul, J., Sorenson, R., Bisgaier, Ch.L., Newton, R.S., La Du, B., 1999. Human serum paraoxonase (PON1) is inactivated by oxidized low density lipoprotein and preserved by antioxidants. *Free Radical Biol. Med.* 26, 892–904.
- Aviram, M., Hardak, E., Vaya, J., Mahmood, S., Milo, S., Hoffman, A., Billicke, S., Draganov, D., Rosenblat, M., 2000. Human serum paraoxonases (PON1) Q and R selectively decrease lipid peroxides in human coronary and carotid atherosclerotic lesions: PON1 esterase and peroxidase-like activities. *Circulation* 101, 2510–2517.

- Berliner, J.A., Heinecke, J.W., 1996. The role of oxidized lipoprotein in atherogenesis. *Free Radical Biol. Med.* 20, 707–727.
- Blatter-Garin, M.C., Abbott, C., Messmer, S., Mackness, M.I., Durrington, P., Pometta, D., James, R.W., 1994. Quantification of human serum paraoxonase by enzyme-linked immunoassay: population differences in protein concentrations. *Biochem. J.* 304, 549–554.
- Bonanome, A., Pagnan, A., Biffanti, S., Opportuno, A., Sorgato, F., Dorella, M., Maiorino, M., Ursini, F., 1992. Effects of dietary monounsaturated and polyunsaturated fatty acids on the susceptibility of plasma low density lipoprotein to oxidative modification. *Arterioscler. Thromb.* 12, 529–533.
- Boright, A.P., Connelly, P.W., Brunt, J.H., Scherer, S.W., Tsui, L.-C., Hegele, R.A., 1998. Genetic variation in paraoxonase-1 and paraoxonase-2 is associated with variation in plasma in Alberta Hutterites. *Atherosclerosis* 139, 131–136.
- Carluccio, M.A., Massaro, M., Bonfrate, C., Siculella, L., Maffia, M., Nicolardi, G., Distanto, A., Storelli, C., De Caterina, R., 1999. Oleic acid inhibits endothelial activation: a direct vascular antiatherogenic mechanism of a nutritional component in the Mediterranean diet. *Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol.* 19, 220–228.
- Cheema, S.K., Clandinin, M.T., 1996. Diet fat alters expression of genes for enzymes of lipogenesis in lean and obese mice. *Biochim. Biophys. Acta* 1299, 284–288.
- Elosua, R., Marrugat, J., Molina, L., Pons, S., Pujol, E., 1994. Validation of the Minnesota leisure time physical activity questionnaire in Spanish men. *Am. J. Epidemiol.* 139, 1197–1209.
- Friedewald, W.T., Levy, R.I., Fredrickson, D.S., 1972. Estimation of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin. Chem.* 18, 499–508.
- Grund, S.M., 1996. Lipids, nutrition, and coronary heart disease. In: Fuster, V., Ross, R., Topol, E.J. (Eds.), *Atherosclerosis and Coronary Heart Disease*. Lippincott-Raven, Philadelphia, pp. 45–68.
- Hegele, R.A., Brunt, J.H., Connelly, P.W., 1995. A polymorphism of the paraoxonase gene associated with variation in plasma lipoproteins in a genetic isolate. *Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol.* 15, 89–95.
- Humbert, R., Adler, D.A., Distech, C.M., Hassett, C., Omienski, C.J., Furlong, C.E., 1993. The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism. *Nat. Genet.* 3, 73–76.
- Hurren, C.A., Stockley, L., Broohurst, A.J., 1987. An abbreviated food table using food groups for the calculation of energy, protein, fat, carbohydrate, total sugars, starch and dietary fiber. *Nutr. Res.* 7, 15–25.
- Jiménez Cruz, A., Cervera Ral, P., Bacardi Gascón, M., 1994. Tabla de composición de alimentos. *Sandoz Nutr.*
- Lopes-Virella, M.F., Stone, P., Ellis, S., Colwell, J.A., 1977. Cholesterol determination in high-density lipoproteins separated by three different methods. *Clin. Chem.* 23, 882–884.
- Mackness, M.I., Arrol, S., Durrington, P.N., 1991a. Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. *FEBS Lett.* 286, 152–154.
- Mackness, M.I., Harty, D., Bhatnagar, D., Winocour, P.H., Arrol, S., Ishola, M., Durrington, P.N., 1991b. Serum paraoxonase activity in familial hypercholesterolemia and insulin-dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 86, 193–199.
- Mackness, M.I., Arrol, S., Abbott, C.A., Durrington, P.N., 1993. Protection of low-density lipoprotein against oxidative modification by high-density lipoprotein associated paraoxonase. *Atherosclerosis* 104, 129–135.
- Mackness, M.I., Mackness, B., Durrington, P.N., Connelly, P.W., Hegele, R.A., 1996. Paraoxonase: biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins. *Curr. Opin. Lipidol.* 7, 69–76.
- Mackness, M.I., Arrol, S., Mackness, B., Durrington, P.N., 1997. Alloenzymes of paraoxonase and effectiveness of high-density lipoproteins in protecting low-density lipoprotein against lipid peroxidation [letter]. *Lancet* 349, 851–852.
- Mackness, B., Mackness, M.I., Arrol, S., Turkie, W., Durrington, P.N., 1998. Effects of the human serum paraoxonase 55 and 192 genetic polymorphisms on the protection by high density lipoprotein against low density lipoprotein oxidative modification. *FEBS Lett.* 423, 57–60.
- Marrugat, J., Sentí, M., 2000. High cholesterol may not have same effect on cardiovascular risk in southern Europe as elsewhere. *Br. Med. J.* 320, 249.
- Masiá, R., Pena, A., Marrugat, J., Sala, J., Vila, J., Pavesi, M., Covas, M., Aubó, C., Elosua, R., 1998. High prevalence of cardiovascular risk factors in Gerona, Spain, a province with low myocardial infarction incidence. *J. Epidemiol. Community Health* 52, 707–715.
- Mata, P., Varela, O., Alonso, R., Lahoz, C., de Oya, M., Badimon, L., 1997. Monounsaturated and polyunsaturated n–6 fatty acid-enriched diets modify LDL oxidation and decrease human coronary smooth muscle DNA synthesis. *Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol.* 17, 2088–2095.
- McGovern, P.G., Pankow, J.S., Shahar, E., Doliszny, K.M., Folsom, A.R., Blackburn, H., Luepker, R.V., 1996. Recent trends in acute coronary heart disease mortality, morbidity, medical care, and risk factors. The Minnesota Heart Survey Investigators. *N. Engl. J. Med.* 334, 884–890.
- Miller, S.A., Dykes, D.D., Polesky, H.F., 1989. A simple salting-out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic. Acids Res.* 16, 1215.
- Moreiras, O., Carbajal, A., Cabrera, M.L., 1992. La composición de los alimentos, ed Eudema, Madrid.
- Pérez, G., Pena, A., Sala, J., Roset, P., Masiá, R., Marrugat, J., 1998. Acute myocardial infarction case fatality, incidence and mortality rates in a population registry in the province of Girona, Spain, 1990 to 1992. *Int. J. Epidemiol.* 27, 599–604.
- Primo-Parmo, S.L., Sorenson, R.C., Teiber, J., La Du, B.N., 1996. The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family. *Genomics* 33, 498–507.
- Reaven, P., Parthasarathy, S., Grasse, B.J., Miller, E., Steinberg, D., Witztum, J.L., 1993. Effects of oleate-rich and linoleate-rich diets on the susceptibility of low density lipoprotein to oxidative modification in mildly hypercholesterolemic subjects. *J. Clin. Invest.* 91, 668–676.
- Ruiz, J., Blanche, H., James, R.W., Blatter Garin, M.C., Vaisse, C., Charpentier, G., Cohen, N., Morabia, A., Passa, P., Froguel, P., 1995. Gln–Arg 192 polymorphism of paraoxonase and coronary heart disease in type 2 diabetes. *Lancet* 346, 869–872.
- Sanghera, D.K., Saha, N., Aston, C.E., Kamboh, M.I., 1997. Genetic polymorphism of paraoxonase and the risk of coronary heart disease. *Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol.* 17, 1067–1073.
- Schröder, H., Covas, M.I., Marrugat, J., Vila, J., Pena, A., Alcántara, M., Masiá, R., 2001. Use a three-day estimated food record, a 72-hour recall and a food-frequency questionnaire for dietary assessment in a Mediterranean Spanish population. *Clin. Nutr.* 20, 429–437.
- Sentí, M., Aubó, C., Elosua, R., Sala, J., Tomás, M., Marrugat, J., 2000. Effect of physical activity on lipid levels in a population-based sample of men with and without the Arg variant of the human paraoxonase gene. *Genet. Epidemiol.* 18, 276–286.
- Serrato, M., Marian, A.J., 1995. A variant of human paraoxonase/arylesterase (HUMPONA) gene is a risk factor for coronary artery disease. *J. Clin. Invest.* 96, 3005–3008.
- Sfeir, Z., Ibrahim, A., Amri, E.Z., Grimaldi, P., Abumrad, N., 1997. Regulation of FAT/CD36 gene expression: further evidence in support of a role of the protein in fatty acid binding/transport. *Prostaglandins, Leukotrienes Essent. Fatty Acids* 57, 17–21.
- Solà, R., La Ville, A.E., Richard, J.L., Motta, C., Bargalló, M.T., Girona, J., Masana, L., Jacotot, B., 1997. Oleic acid rich diet protects against the oxidative modification of high density lipoprotein. *Free Radical Biol. Med.* 22, 1037–1045.
- Taylor, H.L., Jacobs Jr., Dr., Schucker, B., Knudsen, J., Leon, A.S., Debacker, G., 1978. A questionnaire for the assessment of leisure time physical activities. *J. Chronic Dis.* 31, 741–755.

- Tomás, M., Sentí, M., García-Faria, F., Vila, J., Torrents, A., Covas, M., Marrugat, J., 2000. Effect of simvastatin therapy on paraoxonase activity and related lipoproteins in familial hypercholesterolemic patients. *Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol.* 20, 2113–2119.
- Tsimikas, S., Philis-Tsimikas, A., Alexopoulos, S., Sigari, F., Lee, C., Reaven, P.D., 1999. LDL isolated from Greek subjects on a typical diet or from American subjects on an oleate-supplemented diet induces less monocyte chemotaxis and adhesion when exposed to oxidative stress. *Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol.* 19, 122–130.
- Wiseman, S.A., Mathot, J.N., de Fouw, N.J., Tijburg, L.B., 1997. Dietary non-tocopherol antioxidants present in extra virgin olive oil increase the resistance of low density lipoproteins to oxidation in rabbits. *Atherosclerosis* 120, 15–23.

## **5. Discussió**





## **5. DISCUSSIÓ**

En aquest treball de tesi hem analitzat l'efecte del tractament amb el fàrmac simvastatina, la pràctica d'exercici físic agut, l'entrenament físic i el consum d'àcid oleic sobre algunes activitats enzimàtiques de la PON1 i la seva dependència dels polimorfismes *PON1-55* i *PON1-192*. Els principals resultats han estat presentats com articles independents en l'apartat 4. Resultats, i en cadascun d'ells s'han discutit els resultats corresponents. A continuació discutirem els aspectes més rellevants d'aquest treball.

### **5.1 Capítol I:**

Fins la publicació del present article referent a la simvastatina, no s'havia avaluat l'efecte d'aquest fàrmac sobre l'activitat paraoxonasa ni si l'efecte era dependent dels genotips de *PON1* descrits.

Una de les principals troballes d'aquest estudi, una activitat paraoxonasa significativament inferior en els pacients amb HF respecte dels individus normolipèmics, és consistent amb un estudi dut a terme prèviament en pacients afectes de la mateixa malaltia <sup>207</sup>. És dubtós que les diferències de l'activitat paraoxonasa entre pacients i controls puguin ser atribuïdes a les petites variacions en la distribució genotípica de *PON1-192* (QQ:QR:RR 62:32:6 en HF respecte 50:40:10 en normolipèmics) o de *PON1-55* (LL:LM:MM 26:62:12 en HF respecte 33:50:17 en normolipèmics), tot i que el tamany de la mostra no fos gaire gran.

Després del tractament amb simvastatina, s'observàrem un augment de l'activitat paraoxonasa dels pacients a uns valors equiparables als dels individus normolipèmics. Aquestes dades han estat corroborades posteriorment en dos estudis recents de característiques similars al nostre <sup>307;308</sup>.

No trobàrem cap correlació entre l'activitat paraoxonasa i el c-HDL o l'apoAI, i tampoc no hi hagueren variacions del c-HDL, apoAI, LpAI o LpAI:All degudes al tractament. En canvi, en altres estudis portats a terme en població general i en pacients amb HF heterozigota s'ha descrit una correlació entre l'activitat paraoxonasa i l'apoAI o el c-HDL <sup>207;209</sup>. Els nostres resultats suggereixen que l'efecte de la simvastatina sobre l'activitat paraoxonasa no és dependent de les concentracions del c-HDL i l'apoAI, de manera que les possibles propietats antioxidants de la simvastatina no serien degudes a canvis en les lipoproteïnes que contenen apoAI. Existeix una subclasse de HDL que conté apoJ, a la qual s'uneix la PON1 en una raó molar [apoJ/PON1] constant <sup>140</sup>, i que és una subclasse de HDL que en la major part no conté apoAI <sup>451</sup>. En aquest sentit, una possible explicació de l'increment de l'activitat paraoxonasa fóra que la simvastatina potenciés la seva incorporació a aquesta subclasse específica de HDL que conté apoJ. De fet, un altre estudi també

indicà que ni l'activitat paraoxonasa ni el genotip *PON1-192* no poden predir els valors de c-HDL, però en canvi l'activitat arilesterasa sí que correlaciona amb el c-HDL, cosa que no succeeix en el nostre cas <sup>288</sup>.

Donat que les LDL oxidades inactiven l'activitat paraoxonasa mitjançant l'establiment d'interaccions entre el lípid oxidat de les LDL i el grup sulfur lliure de la PON1 <sup>213,215</sup>, una altra possible explicació de la baixa activitat paraoxonasa en pacients amb HF fóra que la PON1 s'inactivés parcialment en els pacients amb HF degut a l'elevat estrès oxidatiu que sofreixen aquests individus.

Hem demostrat que la simvastatina disminueix els nivells de c-LDL, a més del CT, l'apoB, l'apoB-LDL i els TG, com ja ha estat àmpliament descrit tant en prevenció primària com secundària <sup>293-296</sup>. A més d'inhibir la biosíntesi de colesterol, s'ha descrit que la simvastatina també pot reduir la concentració i l'activitat de la CETP <sup>297</sup>, aspecte que afavoriria un increment de la concentració del c-HDL. No obstant, en el nostre estudi no vam observar canvis significatius del c-HDL després del tractament. El que sembla demostrat és que la simvastatina redueix l'absorció intestinal de colesterol, avaluada com el nivell plasmàtic del fitosterol campesterol, en individus hiperlipèmics <sup>299</sup>.

Les estatines són molt efectives reduint el c-LDL i la producció cel·lular de colesterol, però el mecanisme pel que actuen podria ser més complex que el proposat inicialment. En el moment de redactar l'article que aquí presentem, s'havia descrit que les estatines podien disminuir la síntesi hepàtica d'apoB-100 <sup>452</sup>, alterar la producció de HDL en el fetge o tracte intestinal <sup>453</sup> i fins i tot actuar com a antioxidant en les lipoproteïnes <sup>293</sup>, és a dir, que la simvastatina tindria propietats antioxidants *per se*, com indicarien experiments *in vitro* i *ex vivo*. En efecte, la velocitat de formació i quantitats màximes de diens conjugats durant l'oxidació de les LDL i HDL disminueix de forma dosi-dependent en afegir simvastatina al medi. Complementàriament, les LDL i les HDL de pacients tractats amb simvastatina formen menor quantitat d'aldehids durant assaigs d'oxidació <sup>293</sup>. El nostre estudi revelà que la simvastatina reduïa els peròxids lipídics i la raó [peròxids lipídics/c-LDL], havent-hi una correlació positiva entre els peròxids lipídics i el c-LDL, tant abans com després del tractament. La nostra hipòtesi de partida era que la simvastatina podia tenir una acció antioxidant com a resultat d'un increment de la PON1 associada a HDL. De fet, l'activitat paraoxonasa correlacionava negativament amb els peròxids lipídics després del tractament, i els canvis en aquests dos paràmetres també correlacionaven negativament. S'ha observat que la simvastatina augmenta 2.5 cops l'activitat transcripcional del promotor del gen *PON1*, efecte que és inhibit per mevalonat <sup>307</sup>. En el nostre estudi l'activitat arilesterasa, de la que s'ha dit que

representa principalment la concentració proteica de PON1, va mostrar només una tendència no significativa d'augmentar després del tractament i els seus valors es mantingueren inferiors en els pacients amb HF que en els normolipèmics. Tampoc es correlacionaren amb els peròxids lipídics ni abans ni després del tractament.

Per altra banda, se sap que la PON1 pot hidrolitzar estatines que contenen anells lactònics com la mevastatina, lovastatina i simvastatina i que aquesta capacitat està en funció del polimorfisme *PON1-192*<sup>200</sup>. Nosaltres no vam trobar diferències dels canvis de l'activitat paraoxonasa en funció d'aquest polimorfisme, tot i que cal tenir en compte el tamany de mostra relativament petit de cada grup genotípic. Amb totes aquestes dades, sembla lògic proposar que l'augment de l'activitat paraoxonasa en els HF després del tractament sigui degut a la reducció de l'estrès oxidatiu causada per la simvastatina. Tot i així, es necessiten més estudis sobre els mecanismes pels quals la simvastatina eleva l'activitat paraoxonasa. Amb posterioritat al nostre estudi, aparegué nova informació sobre d'altres possibles mecanismes d'acció de la simvastatina. En aquest sentit, la inhibició de la síntesi de mevalonat per part de la simvastatina podria tenir efectes pleiotròpics, no directament relacionats amb els lípids<sup>300</sup>. De fet, el mevalonat no és només un precursor del colesterol, sinó també d'altres compostos (p.e. isoprenoids no esteroides). S'ha proposat que la simvastatina podria estabilitzar la placa d'ateroma, donat que s'ha observat que aquest fàrmac disminueix els nivells de COX-2 *in vitro* que, via la síntesi de prostaglandina E-2, induïrien la síntesi de metal·loproteïnes que destruirien la matriu extracel·lular de les plaques ateroscleròtiques i així les inestabilitzarien<sup>301,302</sup>.

L'activitat paraoxonasa va ser similar en ambdós sexes com ja s'ha indicat en altres estudis<sup>175</sup>, però no en tots<sup>405</sup>. L'activitat arilesterasa era una mica superior en els homes que en les dones amb HF, però similar en ambdós sexes dels individus controls.

També s'ha estudiat l'efecte d'altres fàrmacs hipolipemians, com els fibrats, sobre l'activitat paraoxonasa, amb resultats divergents. En alguns estudis s'ha descrit que el gemfibrozil augmenta l'activitat paraoxonasa en pacients amb hiperlipidèmia<sup>312</sup> i en diabètics tipus II<sup>313</sup> i que els seus metabòlits inhibeixen l'oxidació de les LDL i les HDL *in vitro* i preserven l'activitat paraoxonasa<sup>306</sup>. En canvi, altres estudis no han observat canvis de l'activitat paraoxonasa en resposta al tractament amb gemfibrozil i bezofibrats en malalts amb hiperlipidèmia tipus IIb<sup>314</sup>, ni en resposta al ciprofibrat<sup>310</sup>.

En el nostre estudi, hem observat que la concentració de lípids, apoproteïnes i peròxids lipídics, a nivell basal, després del tractament i la variació d'aquests paràmetres pel tractament no són dependents dels polimorfismes *PON1-192* o *PON1-55*. No obstant, com sempre passa amb tamanyos de mostra petits, cal considerar aquests resultats amb certa precaució.

Tampoc va ser dependent dels genotips *PON1-192* o *PON1-55* la magnitud d'augment d'activitat paraoxonasa. Tal com era d'esperar, l'activitat paraoxonasa era superior en els individus portadors de l'al·lel R i els homozigots LL que no pas els homozigots QQ i portadors de l'al·lel M, respectivament, tant a nivell basal com després del tractament.

Existeixen discrepàncies sobre si l'activitat paraoxonasa, és a dir, enfront un reactiu no fisiològic com és el paraoxó, és prou representativa de la capacitat antioxidant de l'enzim<sup>211</sup> i si l'al·lel R del polimorfisme *PON1-192* realment s'associa a un major risc de CHD (vegeu apartat 1.6). De moment, pel que fa als resultats d'aquest article, es pot dir que la simvastatina pot tenir importants propietats antioxidants mitjançant l'increment de l'activitat paraoxonasa, probablement com a conseqüència de la reducció de l'estrès oxidatiu, en un mecanisme que és independent de la concentració de les lipoproteïnes que contenen apoA1 i independent dels polimorfismes *PON1-192* i *PON1-55*.

## **5.2 Capítol II:**

En el present article hem avaluat per primer cop en humans l'efecte dels exercicis físics regular i agut sobre l'activitat paraoxonasa, la possible influència dels polimorfismes *PON1-192* i *PON1-55* i la dependència de l'efecte de l'exercici físic agut respecte el grau d'entrenament.

### **INICI**

Abans de la intervenció, la concentració del CT i l'activitat paraoxonasa eren més grans en els portadors de l'al·lel R que en els QQ del polimorfisme *PON1-192*. No hi havia diferències significatives de sexe, edat, nombre de fumadors, IMC, c-HDL, c-LDL, TG o LDL oxidades entre els QQ i els portadors de l'al·lel R del polimorfisme *PON1-192*. Tampoc no havia diferències entre els genotips del polimorfisme *PON1-55*. S'ha descrit que l'hàbit tabàquic sembla reduir la concentració i activitat paraoxonasa<sup>416</sup>, i el nostre grup ha descrit una interacció entre el tabaquisme i el genotip QQ pel risc d'IAM<sup>271</sup>. En el present estudi, no vam trobar diferències significatives de l'activitat paraoxonasa i les LDL oxidades entre fumadors i no fumadors. Tampoc n'hi havia entre sexes, igual que en l'estudi del Capítol I.

Encara hi han poques dades sobre les variacions hormonals o cronobiològiques de l'activitat paraoxonasa. En la majoria d'estudis, l'activitat paraoxonasa és similar en homes i dones, a

excepció d'un estudi que la trobà més elevada en dones que en homes, particularment en les dones que prenen anticonceptius orals <sup>405</sup>.

Cal esmentar que en el present estudi, els dos exercicis físics aguts es realitzaren a la mateixa hora del dia (3 hores després del dinar) i els participants seguiren la mateixa dieta que durant els 3 dies previs a l'anterior exercici físic agut.

### EFFECTE DE L'ENTRENAMENT FÍSIC

Després de l'entrenament, les variables de forma física (com el volum màxim d'oxigen) mostraren que l'entrenament fou eficaç, fent millorar significativament la condició física dels participants. No hi hagué cap canvi en el nombre de fumadors ni en l'IMC. Va existir una tendència del perfil lipídic a millorar amb un augment de la concentració del c-HDL i una disminució de la de CT, c-LDL i TG, canvis tots ells no significatius.

L'entrenament no s'associà a un increment de l'activitat paraoxonasa en el grup general, en canvi, s'observà una disminució de les LDL oxidades. En un estudi cas-control anterior s'observaren valors incrementats d'activitat paraoxonasa en jugadors de rugbi ben entrenats comparats amb controls sedentaris <sup>354</sup>. Les diferències en el disseny i les característiques dels participants fan els dos estudis difícils de comparar. De totes maneres, l'entrenament físic dels atletes sembla potenciar els sistemes antioxidants <sup>351;352;355</sup> i reduir la peroxidació lipídica <sup>352</sup>, millorant l'estat antioxidant del plasma <sup>352</sup>. El decrement de les LDL oxidades després de l'entrenament observat en el present estudi dóna suport a aquesta idea.

### EFFECTE DE L'EXERCICI FÍSIC AGUT

L'increment d'activitat paraoxonasa immediatament després de l'exercici físic agut fou seguit d'una disminució durant les dues hores següents i d'una tendència a la recuperació a les 24h. Un estudi realitzat amb rates mostrà efectes similars: un exercici físic agut únic provocà una inhibició precoç de l'activitat paraoxonasa <sup>360</sup>. En el nostre estudi, s'observà també un increment de les LDL oxidades just després de l'exercici físic agut i durant les dues hores següents. Aquestes dades recolzen la idea que l'exercici físic agut indueix estrès oxidatiu i incrementa la peroxidació lipídica que, al seu torn, disminueix l'activitat paraoxonasa <sup>215;352</sup>.

### EFFECTE DE L'ENTRENAMENT FÍSIC I EXERCICI FÍSIC AGUT

L'entrenament es caracteritzà per un augment de l'activitat paraoxonasa just després de l'exercici físic agut i una recuperació dels valors basals a les 24h, recuperació que no es produí quan els

participants encara eren sedentaris. Aquest fet suggereix que l'entrenament atenua l'efecte de l'exercici físic agut sobre l'activitat paraoxonasa.

No està clar si l'efecte de l'entrenament físic sobre la resposta de l'activitat paraoxonasa a un exercici físic agut es dona a través de mecanismes directes o indirectes. L'exercici físic agut sembla produir un increment en la transcripció gènica de certs antioxidants i una reducció en la lipoperoxidació<sup>454;455</sup> en rates entrenades, però no en rates desentrenades<sup>356</sup>.

Un cop entrenats, s'observà un increment de les LDL oxidades en els nostres participants després de l'exercici físic agut respecte el temps basal, encara que els seus valors es restabliren a les 24h. S'ha descrit que els atletes entrenats presenten una major oxidabilitat de les LDL (deguda probablement a la incorporació d'àcids grassos no esterificats en les LDL) i també una capacitat antioxidant sèrica global incrementada just després de realitzar un exercici aeròbic intens, com una marató<sup>456 361</sup>. En canvi, s'ha trobat que els nivells d'activitat arilesterasa i de la capacitat de les HDL per protegir contra l'oxidació de les LDL eren similars als d'abans de la cursa<sup>361</sup>. Aquests fets ens indicarien que la capacitat de protecció de la PON1 enfront l'oxidació de les LDL i l'activitat arilesterasa no es veuen limitades i, segurament, l'activitat paraoxonasa tampoc. Cal dir que la protecció exercida per l'entrenament físic pot no ser suficient per protegir completament les LDL de la seva intensa oxidació resultant de l'exercici físic agut en individus totalment en forma<sup>351</sup>. És de suposar que l'activitat antioxidant global, potenciada per l'entrenament físic, pot indirectament mitigar la inhibició de l'activitat paraoxonasa causada per la major oxidació de les LDL induïda per l'exercici físic agut, i, com a resultat, l'activitat paraoxonasa pot recuperar els nivells basals més ràpidament en l'estat entrenat. Així doncs, l'activitat antioxidant global, potenciada just després de l'exercici físic agut en els entrenats, podria explicar que l'activitat paraoxonasa en aquest moment fos significativament superior a la basal només en els entrenats.

L'entrenament també podria exercir una acció directa sobre la proteïna PON1 o sobre la lipoproteïna portadora de la PON1, la HDL, encara que sembla improbable que canvis en el c-HDL expliquin canvis en l'activitat paraoxonasa ja que, com hem vist en el Capítol I, no vam observar correlació entre el c-HDL i l'activitat paraoxonasa ni en el grup general de participants ni en els estratificats per genotip en cap dels punts de determinació.

No coneixem amb exactitud la dieta seguida per cadascun dels participants, però aquesta difícilment explicaria els canvis trobats en l'activitat paraoxonasa. La dieta era la mateixa durant els 3 dies previs als exercicis físics aguts en cada participant, de manera que diferències intra-individuals d'activitat paraoxonasa entre abans i després de l'entrenament no es podrien atribuir a la dieta. Aquestes mateixes diferències atribuïdes al genotip a nivell inter-individual, podrien ser degudes a dietes diferents de cadascun dels participants, però tal com comentem en la introducció,

els canvis d'activitat paraoxonasa que són induïts per la dieta semblen estar en molts casos fortament associats a variacions en el c-HDL i l'apoAI <sup>399</sup>. En aquest sentit, una dieta aterogènica (en conills, ratolins i rates) o una dieta rica en vegetals o el consum moderat d'alcohol (en humans), semblen donar lloc a canvis d'activitat paraoxonasa que es correlacionen amb variacions en el c-HDL i l'apoAI <sup>228;230;399;400;406</sup>. Això no s'observa en un assaig clínic on el suc de granada incrementa l'activitat paraoxonasa sense provocar canvis en el c-HDL <sup>404</sup>, ni tampoc en l'estudi sobre el consum d'àcid oleic presentat en el Capítol III. En el nostre cas, si els canvis inter-individuals fossin deguts a la dieta, segurament es veurien modificats altres valors, com el c-HDL o l'apoAI, cosa que no succeeix.

#### EFFECTE DE L'ENTRENAMENT FÍSIC, EXERCICI FÍSIC AGUT I EL POLIMORFISME *PON1-192*

La troballa més important d'aquest estudi fou que els efectes de l'exercici físic agut i l'entrenament físic diferien en funció dels genotips del polimorfisme *PON1-192*. Hi hagué una tendència oposada dels genotips de *PON1-192* respecte dels canvis d'activitat paraoxonasa després de l'entrenament, no només en l'estat basal, també en gairebé tots els temps considerats després de l'exercici físic agut. Concretament, l'activitat paraoxonasa dels individus QQ mostrà un augment, mentre que la dels portadors de l'al·lel R disminuí. En analitzar-ho estratificant pels genotips *PON1-55*, aquests canvis no foren estadísticament significatius, excepte pels portadors de l'al·lel M a les 24h de l'exercici físic agut. Més encara, abans de l'entrenament només els QQ recuperaren els nivells basals d'activitat paraoxonasa a les 24h, mentre que després de l'entrenament la recuperaren tots els individus independentment del genotip de *PON1-192*. En canvi, ambdós grups dels genotips de *PON1-55* assoliren l'activitat paraoxonasa basal a les 24h de l'exercici físic agut amb independència del seu estat d'entrenament.

Totes aquestes troballes suggereixen que la resposta de l'activitat paraoxonasa a l'exercici físic agut està modulada per l'estat d'entrenament previ i també el genotip *PON1-192*. Dades prèvies de la nostra unitat suggerien una influència del polimorfisme *PON1-192* sobre l'efecte de l'exercici físic en l'activitat paraoxonasa. En aquest sentit, la pràctica d'activitat física sembla estar associada a un millor perfil lipídic només en els portadors de l'al·lel R, mentre que no es troba cap associació en els individus QQ <sup>290</sup>. De totes maneres, és difícil explicar els efectes oposats dependents del *PON1-192* de l'entrenament sobre l'activitat paraoxonasa. Com ja hem comentat en la introducció, hi ha certa controvèrsia sobre si les LDL oxidades inhibeixen d'igual forma els dos al·loenzims de *PON1-192* <sup>215</sup>. Alguns estudis suggereixen que, per una mateixa quantitat de PON1, l'al·loenzim Q proporciona millor protecció contra l'oxidació *in vitro* de les LDL i, en condicions altament oxidants, les activitats paraoxonasa i arilesterasa d'aquest es redueixen menys que les de l'al·loenzim R <sup>236</sup>.

També hi ha discrepàncies sobre si la capacitat de protecció contra l'oxidació és veu més reduïda en el cas de l'al·loenzim R que en el Q per una mateixa quantitat de HDL <sup>201;211</sup>. Segons les dades del nostre estudi, es pot suggerir que l'entrenament físic podria proporcionar als portadors de l'al·lel R una protecció insuficient contra l'estrès oxidatiu causat per un exercici físic agut.

S'ha descrit que l'exercici físic regular provoca uns increments repetitius de radicals lliures després de cada sessió d'exercici que podrien actuar com a inductors de la transcripció de gens antioxidants endògens <sup>455;457</sup> (*PON1* o altres antioxidants). No obstant, la superior susceptibilitat de l'al·lel R a ser inhibit resultaria en una disminució de l'activitat paraoxonasa en els portadors d'aquest al·loenzim. Una altra possible explicació de l'efecte oposat dels al·lells és que podria haver un desequilibri de lligament entre el polimorfisme *PON1-192* i un polimorfisme del promotor o una altra regió de *PON1*, l'al·lel del qual que anés lligat al Q fos més responent a l'estrès oxidatiu, de manera que podria modular la síntesi o activitats de *PON1*. Per exemple, s'ha descrit recentment que el polimorfisme *PON1-(A-162G)*, situat en el promotor de *PON1* en una regió que té alta homologia amb un element de resposta a interleucina-6 (IL-6), podria estar en desequilibri de lligament amb el polimorfisme *PON1-192* <sup>167</sup>. S'ha suggerit que l'exercici físic agut incrementa els fosfolípids oxidats que al seu torn indueixen la secreció de la citocina pro-inflamatòria IL-6, la qual promou a una reducció de la concentració de *PON1* en cèl·lules HepG2 i una disminució de l'activitat paraoxonasa en ratolins <sup>184</sup>. D'aquesta manera, l'efecte de la IL-6 sobre l'expressió de *PON1* podria dependre en gran mesura del polimorfisme localitzat en el possible element de resposta a IL-6 lligat al polimorfisme *PON1-192*.

### **5.3 Capítol III:**

Tenint en compte les evidències que atribueixen a l'oli d'oliva, i més concretament, a l'àcid oleic, un efecte beneficiós antiaterogènic, en el present estudi hem testat l'efecte del consum de l'àcid oleic sobre l'activitat paraoxonasa. També hem avaluat la possible influència del polimorfisme *PON1-192* sobre aquest efecte.

Vam classificar els subjectes de l'estudi segons el seu consum d'àcid oleic utilitzant la mediana global com a punt de tall. Els individus amb elevat consum d'àcid oleic del present estudi eren més grans i tenien valors d'IMC, c-HDL i de consum d'alcohol significativament superiors que els de baix consum d'àcid oleic. La diferència en el consum d'alcohol, desaparegué en fer l'anàlisi per genotips. En canvi, es van mantenir les diferències d'edat en el grup QR i d'IMC en el grup RR. En qualsevol cas, es van ajustar totes aquestes variables (edat, IMC, consum d'alcohol, a més de tabaquisme i activitat física) en el model de l'anàlisi de la varianza emprat per testar les



interaccions *PON1-192*-consum d'àcid oleic sobre l'activitat paraoxonasa ( $p=0.005$ ) i la concentració de c-HDL ( $p=0.066$ ).

Com ja hem esmentat, són nombrosos els estudis portats a terme en animals i en humans que donen suport a l'important paper que té la modificació oxidativa de les LDLs en la patogènesi de l'aterosclerosi <sup>458</sup>. Així doncs, els mecanismes que protegeixen contra l'oxidació de les LDL semblen ser antiaterogènics i en aquest sentit, la *PON1* podria ser una primera barrera contra els peròxids lipídics de les LDL oxidades <sup>118</sup>. Per una altra banda, l'activitat paraoxonasa i la capacitat de protecció de les LDL contra l'oxidació lipídica de la *PON1* poden ser inhibides per l'estrès oxidatiu, en una magnitud que depèn del genotip de *PON1-192* segons alguns estudis, encara que no tots <sup>215</sup>. Malgrat que encara hi han controvèrsies, alguns autors indiquen que l'al·loenzim R confereix pitjor protecció contra l'oxidació i és més fàcilment inhibit que l'al·loenzim Q <sup>201;213;236;239</sup>.

Per altre costat, alguns estudis afirmen que el perfil lipídic varia segons el genotip del polimorfisme *PON1-192* <sup>191</sup>, tot i que altres estudis no han trobat aquesta associació <sup>260</sup>. En un estudi poblacional, els paràmetres c-LDL, c-HDL i TG es trobaren significativament menys aterogènics en els individus QQ que en els QR o en els RR <sup>289</sup>. En el nostre medi, hem observat que els homes portadors de l'al·lel R sedentaris presenten un perfil lipídic aterogènic que només millora significativament a xifres comparables a les dels QQ si realitzen una quantitat elevada d'activitat física <sup>290</sup>. En canvi, les dones menopàusiques del genotip QQ de la nostra població mostren concentracions de CT i c-LDL superiors a les QR i aquestes, al seu torn superiors a les RR, amb un clar efecte gen-dependent <sup>174</sup>.

La dieta mediterrània sembla ser un dels factors explicatius claus de la baixa incidència de CHD en la nostra població, tot i l'alta prevalença d'altres factors de risc cardiovascular <sup>201;459</sup>. La dieta mediterrània es caracteritza entre d'altres per un elevat consum d'oli d'oliva, particularment ric en àcid oleic, un MUFA que confereix un efecte beneficiós antiaterogènic per diversos mecanismes. El consum d'oli d'oliva verge produeix un conseqüent augment de la concentració plasmàtica d'àcid oleic, així com una menor oxidabilitat de les LDL, que sembla ser dependent del contingut lipoproteic d'àcid oleic i no del contingut d'antioxidants <sup>385-387;460</sup>. També les HDL riques en àcid oleic s'oxiden en menor grau, independentment de la presència d'altres antioxidants com la vitamina E o la vitamina A <sup>388</sup>. Altres efectes descrits de l'àcid oleic són: una disminució de la síntesi de DNA de cèl·lules musculars llises i una reducció de l'activació endotelial que comprèn una expressió inferior de molècules d'adhesió <sup>383</sup> i una disminució de l'adhesió de monòcits a cèl·lules endotelials induïda per LDL parcialment oxidades <sup>384</sup>. Respecte al perfil lipídic, l'àcid oleic de la dieta pot reduir els nivells de c-LDL i el CT segons alguns estudis <sup>381;385</sup>, tot i que d'altres el consideren neutre <sup>377;461</sup>.

El fet que s'hagi determinat que la dieta rica en oli d'oliva té propietats antioxidants i que el polimorfisme *PON1-192* s'hagi relacionat amb la variació dels nivells de c-HDL en alguns estudis poblacionals, ens portà a formular la hipòtesi de que aquest polimorfisme pot influenciar la possible associació entre el consum d'àcid oleic i els canvis en la *PON1* associada a les HDL. Vam observar una interacció entre el polimorfisme *PON1-192* i el consum d'àcid oleic sobre els nivells d'activitat paraoxonasa i de forma marginalment significativa sobre la concentració de c-HDL. L'elevat consum d'àcid oleic s'associà a nivells elevats d'activitat paraoxonasa només en homes que eren homozigots RR. La concentració de c-HDL també era significativament superior en el grup de consum elevat d'àcid oleic que en el grup de baix consum només en els homes de genotip QR. En els individus RR, la diferència de c-HDL no arribà a la significació estadística, segurament degut al nombre petit d'individus RR. Per altra banda, la concentració del c-HDL dels individus de QR del grup de baix consum d'àcid oleic era menor que la dels QQ de la mateixa categoria de consum. El c-HDL també era menor en els individus RR amb baix consum d'àcid oleic que en els QQ de la mateixa categoria de consum, tot i que de nou no arribés a la significació estadística probablement degut al baix nombre d'individus RR. Aquestes diferències desaparegueren en comparar els individus portadors de l'al·lel R amb els QQ pertanyents a la categoria d'elevat consum d'àcid oleic. Aquestes troballes suggereixen que l'efecte d'un polimorfisme sobre un tret particular depèn de la presència de factors ambientals, com l'estil de vida, i això podria explicar les discrepàncies entre estudis. Per exemple, l'al·lel R, que ha estat relacionat amb un major risc de CHD que l'al·lel Q en alguns estudis <sup>250;254</sup>, pot associar-se a concentracions de c-HDL més adverses només en individus sedentaris <sup>290</sup> o en individus que consumeixen dietes riques en vegetals <sup>399</sup> o pobres en àcid oleic (present estudi), o també l'al·lel R pot associar-se a una activitat paraoxonasa menor quan se sotmeten els individus a un entrenament físic (estudi del Capítol II) o quan les dietes són pobres en vegetals <sup>399</sup> o riques en àcid oleic (present estudi). Per tant, sembla raonable proposar que l'al·loenzim R de la *PON1* i la HDL que conté aquest al·loenzim són més susceptibles als canvis causats per factors ambientals, com l'activitat física o la dieta .

Hem descrit alguns dels mecanismes pels quals l'àcid oleic pot conferir efectes beneficiosos. En el cas de la *PON1*, en un assaig clínic en dones diabètiques tipus II s'observà un augment postprandial de l'activitat arilesterasa després de la ingestió d'oli d'oliva <sup>401</sup>. En el mateix assaig, no obstant, es descrigué una disminució de l'activitat arilesterasa després de la ingesta d'oli ric en PUFA, mantenint-se invariables l'oxidabilitat de les LDL, els índexs d'estrès oxidatiu i la capacitat antioxidant de les HDL. En el present estudi, el consum d'àcid oleic s'associà a una concentració incrementada de c-HDL i augment d'activitat paraoxonasa en els individus QR i RR,

respectivament. També demostrarem que el consum d'àcid oleic correlaciona positivament amb l'activitat paraoxonasa en els individus homozigots RR. Tot aquestes troballes recolzen la idea que la dieta rica en àcid oleic protegeix contra l'oxidació de les lipoproteïnes, particularment en homes portadors d'un o dos al·lels R. L'associació entre l'activitat paraoxonasa i el c-HDL o entre el polimorfisme *PON1-192* i el c-HDL no estan massa clares, tot i que la *PON1* estigui unida fortament a la HDL. S'ha descrit en alguns estudis que l'activitat paraoxonasa o la seva concentració es correlacionen positivament amb el c-HDL i l'apoAI <sup>209;399</sup>, però altres estudis descriuen que el c-HDL es correlaciona amb l'activitat arilesterasa, però no amb l'activitat paraoxonasa <sup>288</sup>. Com comentem en el Capítol II, quan són induïts pels àcids grassos de la dieta o per una dieta rica en vegetals o consum moderat d'alcohol, els canvis de l'activitat paraoxonasa es correlacionen amb variacions en el c-HDL i l'apoAI. Per tant, els canvis en la síntesi, secreció o catabolisme del c-HDL induïts per la dieta explicarien en part els canvis en l'activitat paraoxonasa <sup>228;230;399;400;406</sup>. En aquest sentit, en ratolins sotmesos a dieta aterogènica s'ha proposat un mecanisme immunològic contra l'apoAI oxidada que explicaria l'eliminació de HDL oxidades i la conseqüent disminució de l'activitat paraoxonasa sense cap alteració de la transcripció gènica de *PON1* <sup>438</sup>. També s'ha dit que la fibra que conté la dieta rica en vegetals seria la causant de la disminució de c-HDL i d'activitat paraoxonasa <sup>399</sup>. Amb tot, això no s'observa en un assaig clínic on el suc de granada incrementa l'activitat paraoxonasa però no varia el c-HDL <sup>404</sup>, ni tampoc en el present estudi, on ni l'activitat paraoxonasa ni el consum d'àcid oleic no es correlacionaren amb el c-HDL. L'activitat paraoxonasa està disminuïda en pacients amb HF, com presentem en l'article del Capítol I <sup>207;208</sup>. Aquesta observació suggereix que existeix una relació entre el metabolisme lipídic i l'activitat paraoxonasa, essent l'última fortament modulada pel polimorfisme *PON1-192*. Cal esmentar que hi han evidències que indiquen que l'expressió de certs gens associats al metabolisme lipídic, com la lipoprotein lipasa, l'àcid gras sintasa i els factors de transcripció PPAR (alfa, beta i gama), entre d'altres <sup>462-464</sup> està controlada per nivells intracel·lulars d'àcids grassos <sup>465</sup>. El gen *PON1* podria ser un d'ells.

Donat el benefici potencial de tenir una concentració de c-HDL i activitat paraoxonasa elevades com un estat antioxidant desitjable, els resultats d'aquest estudi suggereixen que tota intervenció dirigida a incrementar el consum d'àcid oleic per part d'individus portadors d'un o dos al·lels R haurien de reduir el risc d'aterosclerosi amb considerable especificitat.

En resum, la dieta rica en àcid oleic pot ser beneficiosa en individus portadors d'un o dos al·lels R del polimorfisme *PON1-192*, que constitueixen un 50% de la nostra població, per tal d'assolir un estat antioxidant favorable, similar a l'observat en els individus QQ.



## **6. Conclusions**



## **6.CONCLUSIONS:**

### **6.1 Capítol I:**

- Els pacients amb HF presenten una activitat paraoxonasa significativament inferior a la dels individus normolipèmics.
- El tractament amb simvastatina en pacients amb HF té un efecte antioxidant possiblement relacionat amb un augment de l'activitat paraoxonasa, que correlaciona amb una disminució de la concentració de peròxids lipídics. Aquests efectes són independents de la concentració d'apoAI i de HDL i també dels polimorfismes *PON1-55* i *PON1-192*.

### **6.2 Capítol II**

- L'entrenament físic s'associa a un increment en l'activitat paraoxonasa en els individus QQ i a una disminució de la mateixa en els portadors de l'al·lel R pel polimorfisme *PON1-192*.
- L'increment de l'activitat paraoxonasa immediatament després de l'exercici físic agut és seguit per una disminució subseqüent de l'activitat. La recuperació dels nivells basals d'activitat paraoxonasa a les 24h de l'exercici físic agut es dona en els individus QQ independentment del seu estat d'entrenament, i en els individus portadors de l'al·lel R només quan estan entrenats.
- Els resultats d'aquest estudi suggereixen en conjunt que els efectes de l'entrenament físic i de l'exercici físic agut sobre l'activitat paraoxonasa estan modulats pel polimorfisme *PON1-192*. El paper del polimorfisme *PON1-55* és molt menys pronunciat.

### **6.3 Capítol III:**

- Existeix una interacció entre *PON1-192* i el consum d'àcid oleic respecte als nivells de c-HDL i activitat paraoxonasa. Aquesta es tradueix en que el consum elevat d'àcid oleic comporta un augment de la concentració de c-HDL i de l'activitat paraoxonasa en els individus portadors dels genotips QR i RR del polimorfisme *PON1-192*, respectivament.

### **Conclusió final:**

La PON1 es configura com un enzim clau en el mecanisme de defensa de l'oxidació lipoproteica. El fet que la seva activitat sigui altament influenciable per factors genètics, ambientals i les seves interaccions obre noves i importants perspectives en el camp de la lipidologia i de l'arteriosclerosi.





# **7. Annex**



# IMPRESO DE RECOGIDA DE DATOS ESTUDIO TRANSVERSAL



## INFORMACION GENERAL

Versión Julio 1994

Las preguntas en **negrilla** son las que corresponden a la información mínima necesaria en personas que no deseen realizar las exploraciones.

1. Identificación del impreso ..... 04
2. Versión del impreso ..... 7
3. Número de serie  
(identificador del participante) ..... |\_\_|\_\_|\_\_|\_\_|
4. Número del estudio transversal ..... 1  
1 = basal; 2 = medio; 3 = final;
5. Fecha del examen ..... |\_\_|\_\_|\_\_|\_\_|\_\_|\_\_|
6. Fecha de nacimiento ..... |\_\_|\_\_|\_\_|\_\_|\_\_|\_\_|
7. ¿En qué grupo de edad estaba la persona  
seleccionada en la encuesta? ..... |\_\_|  
1 = 25-34; 2 = 35-44; 3 = 45-54; 4 = 55-64;  
5 = 65-74;
8. Sexo ..... |\_\_|  
1 = hombre; 2 = mujer;
9. Estado civil ..... |\_\_|  
1 = soltero; 2 = casado/cohabita;  
3 = separado/divorciado; 4 = viudo;  
5 = otros (comunidades religiosas, colegios);  
9 = datos insuficientes;
10. ¿Cual es el nivel más alto de escolarización  
que ha completado? ..... |\_\_|  
1 = Titulado superior, Universidad o similares;  
2 = Técnico Escuela Universitaria;  
3 = Escuela secundaria, bachiller;  
4 = Escuela primaria;  
5 = No sabe leer ni escribir;  
9 = Datos insuficientes;
11. ¿Durante cuantos años fue usted a la escuela o  
se dedicó a estudiar a tiempo completo ..... |\_\_|\_\_|  
99 = Datos insuficientes
12. ¿Ha sido usted informado por personal  
sanitario, de que tiene el colesterol  
elevado? ..... |\_\_|  
1 = si; 2 = no; 9 = datos insuficientes;

13. ¿Algún sanitario (médico o enfermera) le ha prescrito alguna dieta para reducir el nivel de colesterol? ..... |\_\_|  
1 = si; 2 = no; 3 = dudoso; 8 = no procede;  
9 = datos insuficientes;
14. ¿Toma o ha tomado en las últimas dos semanas alguna medicación prescrita por un médico para reducir el colesterol? ..... |\_\_|  
1 = si; 2 = no; 3 = dudoso; 8 = no procede;  
9 = datos insuficientes;
15. ¿Le han hecho en el último año algún análisis de sangre para medir el colesterol? ..... |\_\_|  
1 = si; 2 = no; 3 = dudoso; 8 = no procede;  
9 = datos insuficientes;
16. ¿Ha tomado usted en las últimas dos semanas aspirinas para prevenir o tratar enfermedades del corazón? ..... |\_\_|  
1 = si; 2 = no;  
3 = si, pero no para el corazón;  
9 = datos insuficientes;
17. Antecedentes de Insuficiencia Cardíaca.  
Por teléfono se valorará solamente presencia de disnea utilizando el código "5" si la hay o el "1" en caso contrario;  
¿Se cansa excesivamente o le falta el aire al realizar algún ejercicio (subir escaleras, caminar, etc.) ..... |\_\_|  
1 = No disnea; 2 = Disnea a grandes esfuerzos;  
3 = Disnea a pequeños esfuerzos;  
4 = Disnea a mínimos esfuerzos;  
5 = Disnea sin poder especificar el grado;  
9 = datos insuficientes;
18. ¿Algún familiar directo (padres, hermanos, tíos) ha fallecido por causas cardíacas, antes ..... |\_\_|  
1 = si; 2 = no; 9 = datos insuficientes;
19. ¿Ha sido informado alguna vez por personal sanitario de que tiene una elevación de la glucosa (azúcar) en sangre? ..... |\_\_|  
1 = si; 2 = no; 9 = datos insuficientes;
20. ¿Ha seguido por indicación de personal sanitario algún tipo de dieta para reducir la glucosa (azúcar) en sangre? ..... |\_\_|  
1 = si; 2 = no; 8 = No procede;  
9 = datos insuficientes;
21. ¿Toma o ha tomado alguna vez comprimidos para el control de la glucosa (azúcar)? ..... |\_\_|  
1 = si; 2 = no; 8 = no procede;  
9 = datos insuficientes;
22. ¿Precisa insulina para el control de la glucosa? ..... |\_\_|  
1 = si; 2 = no; 8 = no procede; 9 = datos insuficientes;

23.¿Se ha realizado en el último año algún análisis para conocer sus niveles de glucosa (azúcar) en sangre? ..... |\_\_|  
1 = si; 2 = no; 9 = datos insuficientes;

Solo mujeres;preguntas de 24 a 27

24.¿Tiene aun su período menstrual?..... |\_\_|  
1 = si, normalmente; 2 = si, pero irregularmente;  
3 = no; 8 = no procede;  
9 = datos insuficientes;

25.¿Qué edad tenía cuando inició la menopausia?..... |\_\_|\_\_|  
88 = no procede; 99 = datos insuficientes;

26.¿Ha tomado (en el último mes) hormonas sexuales (estrógenos) para los síntomas de la menopausia?..... |\_\_|  
1 = si; 2 = no;  
8 = no procede; 9 = datos insuficientes;

27.¿Ha tomado (en los últimos dos meses) anticonceptivos en píldoras o inyecciones?. ..... |\_\_|  
1 = si; 2 = no;  
8 = no procede; 9 = datos insuficientes;

28.¿Ha sido usted informado por personal sanitario, de que su tensión arterial es alta? ..... |\_\_|  
1 = si; 2 = no; 9 = datos insuficientes;

29.¿Ha tomado usted en las últimas dos semanas algún comprimido para disminuir la tensión arterial? |\_\_|  
1 = si; 2 = no;  
3 = posiblemente; 9 = datos insuficientes;

30.¿Se ha tomado usted la T.A. en el último año?..... |\_\_|  
1 = si; 2 = no; 9 = datos insuficientes;

31.Frecuencia cardíaca ..... |\_\_|\_\_|\_\_|

32.Brazo en el que se toma la tensión arterial ..... |\_\_|  
1 = derecho 2 = izquierdo

33.Circunferencia braquial en centímetros ..... |\_\_|\_\_|\_\_|

34.Presión sistólica registrada en la primera toma. |\_\_|\_\_|\_\_|

35.Presión diastólica registrada en la primera toma. |\_\_|\_\_|\_\_|

36.Presión sistólica registrada en la segunda toma.. |\_\_|\_\_|\_\_|

37.Presión diastólica registrada en la segunda toma. |\_\_|\_\_|\_\_|

38.Manguito utilizado para la toma de la TA ..... |\_\_|  
1 = obeso; 2 = adulto; 3 = cadete;

39.Hora en que se toma la TA ..... |\_\_|\_\_|

40.Temperatura en la habitación en que se toma la TA en °C ..... |\_\_|\_\_|

41. Colesterol total en suero ..... |\_\_|\_\_|\_\_|
42. HDL colesterol ..... |\_\_|\_\_|\_\_|
43. LDL colesterol ..... |\_\_|\_\_|\_\_|
44. Triglicéridos ..... |\_\_|\_\_|\_\_|
45. Lp (a) ..... |\_\_|\_\_|\_\_|. |\_\_|
46. Fibrinógeno ..... |\_\_|\_\_|\_\_|
47. Vitamina E ..... |\_\_|\_\_|\_\_|
48. Vitamina A ..... |\_\_|\_\_|\_\_|
49. Apo A1 ..... |\_\_|
50. Apo B ..... |\_\_|
51. Tiocianato en suero ..... |\_\_|\_\_|\_\_|
52. Glicemia ..... |\_\_|\_\_|\_\_|
53. Altura en centímetros ..... |\_\_|\_\_|\_\_|. |\_\_|
54. Peso en gramos ajustando a 200 gramos ..... |\_\_|\_\_|\_\_|. |\_\_|
55. Cintura en centímetros ..... |\_\_|\_\_|\_\_|. |\_\_|
56. Cadera en centímetros ..... |\_\_|\_\_|\_\_|. |\_\_|
57. Pliegue tricipital brazo derecho 1ª medición... |\_\_|\_\_|. |\_\_|
58. Pliegue tricipital brazo derecho 2ª medición... |\_\_|\_\_|. |\_\_|
59. Pliegue tricipital brazo derecho 3ª medición... |\_\_|\_\_|. |\_\_|
60. Pliegue tricipital brazo izquierdo 1ª medición. |\_\_|\_\_|. |\_\_|
61. Pliegue tricipital brazo izquierdo 2ª medición. |\_\_|\_\_|. |\_\_|
62. Pliegue tricipital brazo izquierdo 3ª medición. |\_\_|\_\_|. |\_\_|
63. Brazo dominante. .... |\_\_|  
1 = derecho;                      2 = izquierdo;
64. Electrocardiograma ..... |\_\_|  
1 = Hecho;                      2 = No hecho;
65. ¿Cual es el motivo por el cual no desea/puede  
colaborar en el estudio? ..... |\_\_|  
1 = Imposible de establecer contacto;  
2 = Temporalmente esta fuera del area durante  
el estudio;  
3 = Hospitalización o enfermedad importante;  
4 = No le interesa el estudio;  
5 = Traslado de residencia;  
6 = Defunción antes del estudio;  
7 = Problemas en el trabajo;  
8 = No procede; 9 = Datos insuficientes;

**IMPRESO DE RECOGIDA DE DATOS  
ESTUDIO TRANSVERSAL**



**CUESTIONARIO DE CONSUMO DE TABACO**

Versión Julio 1994

1. ¿Fuma usted cigarrillos actualmente? ..... |\_\_|  
1 = si ,regularmente; Ir a la pregunta 2  
2 = no; Ir a la pregunta 5  
3 = alguna vez; Ir a la pregunta 3
2. ¿Habitualmente cuantos cigarrillos fuma por día?. |\_\_|\_\_|\_\_|  
88 = no procede; Ir a la pregunta 8
3. ¿Cuantos días por semana fuma cigarrillos? ..... |\_\_|  
1 = Habitualmente un día o menos;  
2 = Habitualmente de dos a cuatro días;  
3 = Casi cada día;  
8 = no procede;
4. ¿Habitualmente cuantos cigarrillos fuma, cada uno  
de esos días? ..... |\_\_|\_\_|\_\_|  
88 = no procede
5. ¿Fumó usted cigarrillos regularmente en el pasado? ..... |\_\_|  
1 = Si; Ir a la pregunta 6  
2 = No; Ir a la pregunta 10  
8 = No procede;
6. ¿Que año dejó usted de fumar cigarrillos? ..... 19|\_\_|\_\_|  
88 = no procede;
7. Si hace menos de un año ..... |\_\_|  
1 = menos de un mes;  
2 = de uno a seis meses;  
3 = de seis a doce meses;  
8 = no procede;
8. ¿Cual ha sido el número máximo de cigarrillos  
fumados por usted en un día? ..... |\_\_|\_\_|  
88 = no procede;
9. ¿Qué edad tenía cuando empezó a fumar  
regularmente? ..... |\_\_|\_\_|  
88 = no procede;
10. ¿Ha fumado alguna vez cigarros puros o puritos? ..... |\_\_|  
1 = Fumo habitualmente; --> Ir a la pregunta 11  
2 = No; --> Ir a la pregunta 12  
3 = Fumo ocasionalmente  
menos de uno por día;--> Ir a la pregunta 11  
4 = Alguna vez pero no  
ahora; --> Ir a la pregunta 12  
8 = No procede;
11. ¿Cuantos fuma usted por semana? ..... |\_\_|\_\_|

---

12.¿Ha fumado alguna vez en pipa? ..... |\_\_|

1 = Fumo habitualmente; --> Ir a la pregunta 13

2 = No; --> Ir a la pregunta 14

3 = Fumo ocasionalmente; --> Ir a la pregunta 13

4 = Alguna vez pero no  
ahora;

--> Ir a la pregunta 14

13.¿Cuantos gramos de tabaco de pipa fuma en  
una semana aproximadamente? ..... |\_\_|\_\_|\_\_|

888 = no procede;

999 = no se sabe;

14.Esta pregunta es únicamente para fumadores  
ocasionales o no fumadores.

¿Durante cuantas horas aproximadamente está usted  
a lo largo del día en ambientes donde se fuma?..... |\_\_|\_\_|

88 = no procede



# IMPRESO DE RECOGIDA DE DATOS ESTUDIO TRANSVERSAL



## CUESTIONARIO DE ANGOR DE ROSE

Versión Julio 1994

---

Encuesta de Angina de Rose

1. ¿Ha sentido alguna vez dolor o molestias en el pecho? ..... |\_\_|  
1 = si; 2 = no;  
(Si la respuesta es negativa no continuar)
  2. ¿Lo siente cuando sube una cuesta o camina con rapidez? ..... |\_\_|  
1 = si; 2 = no; 3 = nunca sube cuestas o camina con rapidez;  
8 = No procede; 9 = datos insuficientes;
  3. ¿Lo siente cuando camina a paso ordinario en terreno llano? ..... |\_\_|  
1 = si; 2 = no; 8 = no procede;  
9 = datos insuficientes;
  4. ¿Que hace si el dolor o la molestia le aparecen al andar? ..... |\_\_|  
1 = Se para o marcha más despacio; 2 = Continúa;  
8 = no procede; 9 = datos insuficientes;
- Marcar "1" si el sujeto continúa andando después de tomar nitritos
5. Si se detiene, ¿qué sucede? ..... |\_\_|  
1 = se siente aliviado; 2 = no se siente aliviado;  
8 = no procede; 9 = datos insuficientes;
  6. ¿En cuanto tiempo? ..... |\_\_|  
1 = 10 minutos o menos; 2 = Más de 10 minutos;  
8 = no procede;
  7. Quiere señalar dónde nota el dolor o la molestia? ..... |\_\_|  
1 = Región esternal (superior o media);  
2 = Región esternal (inferior);  
3 = Región anteroizquierda del tórax;  
4 = = Brazo izquierdo;  
8 = no procede; 9 = Otras;
  8. ¿Noto la molestia en otra región? ..... |\_\_|  
1 = si; 2 = no; 8 = no procede;
  9. ¿Ha tenido alguna vez un dolor fuerte en la parte anterior del pecho que durara media hora o más? ..... |\_\_|  
1 = si; 2 = no; 8 = no procede;
  10. ¿Ha sido informado, de haber padecido un infarto de miocardio? ..... |\_\_|  
1 = si; 2 = no; 8 = no procede;

# IMPRESO DE RECOGIDA DE DATOS ESTUDIO TRANSVERSAL



## CUESTIONARIO DE PATOLOGÍA VASCULAR CEREBRAL

Versión Julio 1994

---

1. ¿Se ha quedado alguna vez parte de su cuerpo sin poder moverlo?..... |\_\_|  
1 = Un brazo y una pierna del mismo lado  
2 = Sólo un brazo  
3 = Sólo una pierna  
4 = Los dos brazos y las dos piernas  
5 = Alguna parte de la cara  
6 = No

2. ¿Alguna vez ha notado acorchamiento, adormecimiento, sensación de hormigueo, o ha dejado de notar alguna parte de su cuerpo (no relacionado con la postura o que aparezca al levantarse)..... |\_\_|  
1 = Un brazo y una pierna del mismo lado  
2 = Sólo un brazo  
3 = Sólo una pierna  
4 = Los dos brazos y las dos piernas  
5 = Alguna parte de la cara  
6 = No

**¿Alguna vez ha notado....(Contestar: 1 = si; 2 = no;)**

3. Dificultad para entender lo que dicen (no siendo por "despiste" o por ser palabras que no entiende)..... |\_\_|  
4. Dificultad al hablar, no pudiendo decir lo que quiere..... |\_\_|  
5. Una pérdida brusca de visión transitoria o no sin perder el conocimiento que no pudiera ser atribuido a causa oftalmológica..... |\_\_|  
6. Al mirar un objeto sólo veía la mitad o una cuarta parte..... |\_\_|  
7. Al andar se iba hacia un lado, no pudiendo ir en línea recta durante varios días y sin que le dieran vuelta las cosas..... |\_\_|  
8. Sensación de que se cae o se balancea, estando de pie, sin mareo..... |\_\_|  
9. Vértigo: Mareo con sensación de que le den vuelta las cosas, en ocasiones con nauseas..... |\_\_|  
10. Dificultad para tragar alimentos (no estando enfermo de la garganta)..... |\_\_|  
11. Ver doble..... |\_\_|  
12. Dificultad para pronunciar las palabras, como si se le enredase la lengua..... |\_\_|

**IMPRESO DE RECOGIDA DE DATOS  
ESTUDIO TRANSVERSAL**



**ENCUESTA ALIMENTARIA**

Versión Julio 1994

Número de vasos de 150-200 cc de leche consumidos en los últimos tres días.

Entera..... |  
Semi-descremada..... |  
Descremada..... |  
Con cacao..... |

Café y chocolate consumido en los últimos tres

Número y tipo de cafés:

Solo ..... |  
Cortado ..... |  
Con leche ..... |  
Capuchino ..... |  
Largo ..... |  
Descafeinado ..... |

Número y tipo de otras infusiones..... |

Número de cucharadas de azúcar como acompañamiento (café, té, zumos)..... |  
Número de cucharadas de mermelada..... |  
Número de cucharadas de miel..... |  
Número de piezas de chocolate..... |  
Número de tazas de chocolate..... |

Tipo y número de vasos de zumo de fruta consumidos en los últimos tres días:

..... |  
..... |

Número de unidades de los siguientes derivados consumidos en los últimos tres días:

Nata montada (nº de cucharadas soperas)..... |  
Crema de leche (nº de unidades de 50 gr.)..... |

Número y tipo de yogurts consumidos en los últimos

Enteros..... |  
Semi-descremados..... |  
Descremados..... |  
De fruta..... |

Cereales consumidos en los últimos tres días:

Tipo Corn Flakes:

Con leche ..... |  
Con zumo ..... |  
Con yogurt ..... |  
Solo ..... |

Tipo copos de avena:

Con leche ..... |  
Con zumo ..... |  
Con yogurt ..... |

Pastas consumidas en los últimos tres días:

donuts ..... |  
croissants ..... |  
ensaimadas ..... |  
madalenas ..... |  
otras \_\_\_\_\_ ..... |

Número y tipo de rebanadas de pan consumidas en los últimos tres días (excluir las de los bocadillos):

Blanco..... |  
Integral..... |  
Pan de molde..... |

Cantidad y tipo de bocadillos (se considera 125 gr cada uno):

Con tomate y/o aceite..... |  
Sin tomate..... |  
Con mantequilla..... |  
Con margarina..... |  
Otros..... |

Tipo y cantidad (nº de lonchas) de embutidos consumidos en los últimos tres días:

Jamón ..... |  
Jamón dulce ..... |  
Salami ..... |  
Mortadela ..... |  
Salchichon ..... |  
Fuet ..... |  
Chorizo ..... |  
Lomo ..... |  
Frankfurt ..... |  
Sobrasada ..... |  
Butifarra blanca ..... |  
Butifarra negra ..... |  
Otros \_\_\_\_\_ ..... |

Número de raciones de 50 gr y tipo de queso consumidas en los últimos tres días:

\_\_\_\_\_ |  
\_\_\_\_\_ |

Tipo y cantidad de alimentos enlatados consumidos los últimos tres días:

Aceitunas ..... |  
Atún ..... |  
Berechos ..... |  
Almejas ..... |  
Mejillones ..... |  
Otros \_\_\_\_\_ ..... |

Número de raciones de ensalada y composición:

|       |       |  |   |  |   |  |   |  |
|-------|-------|--|---|--|---|--|---|--|
| _____ | ..... |  | — |  | — |  | — |  |
| _____ | ..... |  | — |  | — |  | — |  |
| _____ | ..... |  | — |  | — |  | — |  |

Número de cucharadas soperas de condimentación:

|                                   |   |
|-----------------------------------|---|
| Aceite de oliva y vinagre .....   | — |
| Aceite de girasol y vinagre ..... | — |
| Vinagreta .....                   | — |
| Mayonesa casera .....             | — |
| Mayonesa comercial .....          | — |
| Mayonesa descremada .....         | — |
| Salsa rosa .....                  | — |
| Otros _____ .....                 | — |

Número de raciones de verduras y composición:

|       |       |  |   |  |   |  |   |  |
|-------|-------|--|---|--|---|--|---|--|
| _____ | ..... |  | — |  | — |  | — |  |
| _____ | ..... |  | — |  | — |  | — |  |
| _____ | ..... |  | — |  | — |  | — |  |
| _____ | ..... |  | — |  | — |  | — |  |

Número de cucharadas soperas de condimentación:

|                                   |   |
|-----------------------------------|---|
| Aceite de oliva y vinagre .....   | — |
| Aceite de girasol y vinagre ..... | — |
| Vinagreta .....                   | — |
| Mayonesa casera .....             | — |
| Mayonesa comercial .....          | — |
| Mayonesa descremada .....         | — |
| Salsa rosa .....                  | — |
| Otros _____ .....                 | — |

Número de raciones y tipo de legumbres consumidas

Lentejas:

|                  |   |   |   |
|------------------|---|---|---|
| Hervidas .....   | — | — | — |
| Fritas .....     | — | — | — |
| Cocidas .....    | — | — | — |
| Otro _____ ..... | — | — | — |

Garbanzos:

|                  |   |   |   |
|------------------|---|---|---|
| Hervidas .....   | — | — | — |
| Fritas .....     | — | — | — |
| Cocidas .....    | — | — | — |
| Otro _____ ..... | — | — | — |

Judías:

|                 |   |   |   |
|-----------------|---|---|---|
| Hervidas .....  | — | — | — |
| Fritas .....    | — | — | — |
| Cocidas .....   | — | — | — |
| Otro_____ ..... | — | — | — |

Habas:

|                 |   |   |   |
|-----------------|---|---|---|
| Hervidas .....  | — | — | — |
| Fritas .....    | — | — | — |
| Cocidas .....   | — | — | — |
| Otro_____ ..... | — | — | — |

Número de raciones y tipo de féculas consumidas

Pasta italiana:

|                       |   |   |   |
|-----------------------|---|---|---|
| Spaghetti_____ .....  | — | — | — |
| Canelones .....       | — | — | — |
| Macarrones_____ ..... | — | — | — |
| Fideos .....          | — | — | — |
| Pizza .....           | — | — | — |

Patatas:

|                 |   |   |   |
|-----------------|---|---|---|
| Hervidas .....  | — | — | — |
| Fritas .....    | — | — | — |
| Chips .....     | — | — | — |
| Estofadas ..... | — | — | — |
| Otras .....     | — | — | — |

Arroz:

|                            |   |   |   |
|----------------------------|---|---|---|
| Hervido .....              | — | — | — |
| Paella .....               | — | — | — |
| Con sofrito y salsas ..... | — | — | — |
| Otro_____ ..               | — | — | — |

Número y tipo de huevos consumidos en los tres

Tortilla (nº de huevos):

|                |   |   |   |
|----------------|---|---|---|
| _____ .....    | — | — | — |
| _____ .....    | — | — | — |
| Hervidos ..... | — | — | — |
| Fritos .....   | — | — | — |

Tipo de carne consumida en los tres últimos días:

Raciones de 150 g de carne de buey consumidas:

|                     |   |   |   |
|---------------------|---|---|---|
| Frito_____ .....    | — | — | — |
| Plancha_____ .....  | — | — | — |
| Cocido_____ .....   | — | — | — |
| Barbacoa_____ ..... | — | — | — |
| Hervido_____ .....  | — | — | — |
| Rebozado_____ ..... | — | — | — |

Raciones de 150 g de carne de ternera:

|                     |   |   |   |
|---------------------|---|---|---|
| Frito_____ .....    | — | — | — |
| Plancha_____ .....  | — | — | — |
| Cocido_____ .....   | — | — | — |
| Barbacoa_____ ..... | — | — | — |
| Hervido_____ .....  | — | — | — |

Rebozado\_\_\_\_\_ ..... |\_\_| |\_\_| |\_\_|

Raciones de 150 g de carne de cordero:

Frito\_\_\_\_\_ ..... |\_\_| |\_\_| |\_\_|  
Plancha\_\_\_\_\_ ..... |\_\_| |\_\_| |\_\_|  
Cocido\_\_\_\_\_ ..... |\_\_| |\_\_| |\_\_|  
Barbacoa\_\_\_\_\_ ..... |\_\_| |\_\_| |\_\_|  
Hervido\_\_\_\_\_ ..... |\_\_| |\_\_| |\_\_|  
Rebozado\_\_\_\_\_ ..... |\_\_| |\_\_| |\_\_|

Raciones de 150 g de carne de cerdo:

Frito\_\_\_\_\_ ..... |\_\_| |\_\_| |\_\_|  
Plancha\_\_\_\_\_ ..... |\_\_| |\_\_| |\_\_|  
Cocido\_\_\_\_\_ ..... |\_\_| |\_\_| |\_\_|  
Barbacoa\_\_\_\_\_ ..... |\_\_| |\_\_| |\_\_|  
Hervido\_\_\_\_\_ ..... |\_\_| |\_\_| |\_\_|  
Rebozado\_\_\_\_\_ ..... |\_\_| |\_\_| |\_\_|

Raciones de 150 g de carne de pollo:

Frito\_\_\_\_\_ ..... |\_\_| |\_\_| |\_\_|  
Plancha\_\_\_\_\_ ..... |\_\_| |\_\_| |\_\_|  
Cocido\_\_\_\_\_ ..... |\_\_| |\_\_| |\_\_|  
Barbacoa\_\_\_\_\_ ..... |\_\_| |\_\_| |\_\_|  
Hervido\_\_\_\_\_ ..... |\_\_| |\_\_| |\_\_|  
Rebozado\_\_\_\_\_ ..... |\_\_| |\_\_| |\_\_|

Raciones de 150 g de carne de conejo:

Frito\_\_\_\_\_ ..... |\_\_| |\_\_| |\_\_|  
Plancha\_\_\_\_\_ ..... |\_\_| |\_\_| |\_\_|  
Cocido\_\_\_\_\_ ..... |\_\_| |\_\_| |\_\_|  
Barbacoa\_\_\_\_\_ ..... |\_\_| |\_\_| |\_\_|  
Hervido\_\_\_\_\_ ..... |\_\_| |\_\_| |\_\_|  
Rebozado\_\_\_\_\_ ..... |\_\_| |\_\_| |\_\_|

Raciones de 150 g de salchichas (4 salchichas) o de  
butifarra:

Frito ..... |\_\_| |\_\_| |\_\_|  
Plancha ..... |\_\_| |\_\_| |\_\_|  
Cocido ..... |\_\_| |\_\_| |\_\_|  
Barbacoa ..... |\_\_| |\_\_| |\_\_|  
Hervido ..... |\_\_| |\_\_| |\_\_|  
Rebozado ..... |\_\_| |\_\_| |\_\_|

Raciones de carne picada:

Frito ..... |\_\_| |\_\_| |\_\_|  
Plancha ..... |\_\_| |\_\_| |\_\_|  
Cocido ..... |\_\_| |\_\_| |\_\_|  
Barbacoa ..... |\_\_| |\_\_| |\_\_|  
Hervido ..... |\_\_| |\_\_| |\_\_|  
Rebozado ..... |\_\_| |\_\_| |\_\_|

Otro tipo de carne:

Frito ..... |\_\_| |\_\_| |\_\_|  
Plancha ..... |\_\_| |\_\_| |\_\_|  
Cocido ..... |\_\_| |\_\_| |\_\_|  
Barbacoa ..... |\_\_| |\_\_| |\_\_|  
Hervido ..... |\_\_| |\_\_| |\_\_|  
Rebozado ..... |\_\_| |\_\_| |\_\_|

Número de raciones 150 gr y tipo de pescado  
consumidos en los últimos 3 días

Pescado blanco (merluza, rape, lenguado)

|                |  |  |  |
|----------------|--|--|--|
| Frito .....    |  |  |  |
| Plancha .....  |  |  |  |
| Cocido .....   |  |  |  |
| Barbacoa ..... |  |  |  |
| Hervido .....  |  |  |  |
| Rebozado ..... |  |  |  |

Pescado azul fresco (sardinas, anchoas, atún):

|                |  |  |  |
|----------------|--|--|--|
| Frito .....    |  |  |  |
| Plancha .....  |  |  |  |
| Cocido .....   |  |  |  |
| Barbacoa ..... |  |  |  |
| Hervido .....  |  |  |  |
| Rebozado ..... |  |  |  |

Marisco: \_\_\_\_\_

|                |  |  |  |
|----------------|--|--|--|
| Frito .....    |  |  |  |
| Plancha .....  |  |  |  |
| Cocido .....   |  |  |  |
| Hervido .....  |  |  |  |
| Rebozado ..... |  |  |  |

Calamares, pulpo o sepia:

|                |  |  |  |
|----------------|--|--|--|
| Frito .....    |  |  |  |
| Plancha .....  |  |  |  |
| Cocido .....   |  |  |  |
| Barbacoa ..... |  |  |  |
| Hervido .....  |  |  |  |
| Rebozado ..... |  |  |  |

Frutos secos. Número de raciones y tipo  
(bolsita de 30 gr). .....

|       |  |
|-------|--|
| ..... |  |
| ..... |  |

Número de piezas de fruta fresca:

|   |  |
|---|--|
| Manzanas .....                            |  |
| Peras .....                               |  |
| Naranjas (3 mandarinas = 1 naranja) ..... |  |
| Plátanos .....                            |  |
| Otros----- .....                          |  |
| ----- .....                               |  |
| ----- .....                               |  |

Número de raciones y tipo de fruta en almíbar

|       |  |
|-------|--|
| ..... |  |
| ..... |  |

Número de raciones de los siguientes postres  
(150 gr.):

|                           |  |
|---------------------------|--|
| Flan.....                 |  |
| Helado (nº de bolas)..... |  |
| Arroz con leche.....      |  |
| Crema o natillas .....    |  |
| Tartas_____ .....         |  |
| Otro_____ .....           |  |



Refrescos consumidos los últimos tres días:

|                  |       |
|------------------|-------|
| Colas_____       | _____ |
| Colas light_____ | _____ |
| Naranjadas_____  | _____ |
| Limonadas_____   | _____ |
| Tónicas_____     | _____ |

ATENCIÓN: sólo en la última semana:

|   |       |
|---|-------|
| Vasos de vino (50 cc).....                                      | _____ |
| Unidades de cerveza (330 cc: "medianas").....                   | _____ |
| Unidades de cerveza (125 cc: "quintos").....                    | _____ |
| Copas de licor [incluye coñac y brandis] (25-50cc)...           | _____ |
| Número de carajillos (25cc.).....                               | _____ |
| Número de bebidas largas (cubatas, entre 50-75cc<br>licor)..... | _____ |
| "Chupitos" (snaps) (50 cc licor).....                           | _____ |
| Otros _____   | _____ |



# **8. Bibliografia i** **adreces electròniques**



## **8. BIBLIOGRAFIA I ADRECES ELECTRÒNIQUES**

Les adreces electròniques consultades són:

*Protein Data Bank, PDB:* <http://www.rcsb.org/pdb/>

Bases de dades i eines on-line del *U.S. National Library of Medicine, from National Center for Biotechnology Information, NCBI:*

PubMed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?db=PubMed>

Nucleotide: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide>

OMIM: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?db=OMIM>

Nucleotide BLAST : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>

La **bibliografia** consultada és la següent:

1. Keys A, Lowe CR. Introducción a la medicina social. Mexico: Siglo XXI; 1986.
2. Dodu SR. Emergence of cardiovascular diseases in developing countries. *Cardiology* 1988;75:56-64.
3. Raab W. Alimentäre factoren in der entstehung von arteriosklerose und hypertonie. *Med Klin* 1932;28:487-521.
4. Keys A. Atherosclerosis: a problem in newer Public Health. *J Mt Sinai Hosp* 1953;20:118-39.
5. Fidanza F, Puddu V, Imbimbo AB, Menotti A, Keys A. Coronary heart disease in seven countries. VII. Five-year experience in rural Italy. *Circulation* 1970;41:163-175.
6. Aravanis C, Corcondilas A, Dontas AS, Lekos D, Keys A. Coronary heart disease in seven countries. IX. The Greek islands of Crete and Corfu. *Circulation* 1970;41:188-100.
7. Buzina R, Keys A, Mohacek I, Marinkovic M, Hahn A, Blackburn H. Coronary heart disease in seven countries. V. Five-year follow-up in Dalmatia and Slavonia. *Circulation* 1970;41:140-151.
8. Taylor HL, Blackburn H, Keys A, Parlin RW, Vasquez C, Puchner T. Coronary heart disease in seven countries. IV. Five-year follow-up of employees of selected U.S. railroad companies. *Circulation* 1970;41:120-139.
9. Blackburn H, Taylor HL, Keys A. Coronary heart disease in seven countries. XVI. The electrocardiogram in prediction of five-year coronary heart disease incidence among men aged forty through fifty-nine. *Circulation* 1970;41:1154-1161.
10. Taylor HL, Menotti A, Puddu V, Monti M, Keys A. Coronary heart disease in seven countries. XI. Five years of follow-up of railroad men in Italy. *Circulation* 1970;41:1113-1122.
11. Kimura N, Keys A. Coronary heart disease in seven countries. X. Rural southern Japan. *Circulation* 1970;41:1101-1112.

12. Keys A. A multivariate analysis of diet and coronary heart disease. Cambridge, London: Harvard University Press; 1980. p. 67.
13. Cooperative Study on Lipoproteins and Atherosclerosis. Evaluation of serum lipoprotein and cholesterol measurement as predictors of clinical complications of atherosclerosis. *Circulation* 1956;14:691-741.
14. Keys A, Taylor HL, Blackburn H, Brozek J, Anderson JT, Simonson E. Coronary heart disease among Minnesota business and professional men followed 15 years. *Circulation* 1963;28:381-95.
15. Daweber TR. The Framingham Study. The epidemiology of atherosclerotic disease. Cambridge: Harvard University Press; 1980.
16. A simposium: measuring the risk of coronary heart disease in adult population groups. *Am J Public Health* 1957;47:1-63.
17. Pater C. The current status of primary prevention in coronary heart disease. *Curr Control Trials Cardiovasc Med.* 2001;2:24-37.
18. Tuomilehto J, Kuulasmaa K, Torppa J. WHO MONICA Project: geographic variation in mortality from cardiovascular diseases. Baseline data on selected population characteristics and cardiovascular mortality. *World Health Stat Q* 1987;40:171-84.
19. Tunstall-Pedoe H, Kuulasmaa K, Mahonen M, Tolonen H, Ruokokoski E, Amouyel P. Contribution of trends in survival and coronary-event rates to changes in coronary heart disease mortality: 10-year results from 37 WHO MONICA Project populations. *Lancet* 1999;353:1547-57.
20. Perez G, Pena A, Sala J, Roset P, Masia R, Marrugat de la Iglesia J. Acute myocardial infarction case fatality, incidence and mortality rates in a population registry in Gerona, Spain, 1990-1992. *Int J Epidemiol* 1998;27:599-604.
21. Wilhelmsen L, Johansson S, Ulvenstam G, Welin L, Rosengren A, Eriksson H *et al.* CHD in Sweden: mortality, incidence and risk factors over 20 years in Gothenburg. *Int J Epidemiol* 1989;18:S101-S108.
22. Burke GL, Sprafka JM, Folsom AR, Luepker RV, Norsted SW, Blackburn H. Trends in CHD mortality, morbidity and risk factor levels from 1960 to 1986: the Minnesota Heart Survey. *Int J Epidemiol* 1989;18:S73-S81.
23. Dobson AJ, Gibberd RW, Leeder SR, Alexander HM, Young AF, Lloyd DM. Ischemic heart disease in the Hunter Region of New South Wales, Australia, 1979- 1985. *Am J Epidemiol* 1988;128:106-15.
24. Nuttens MC, Arveiler D, Zafra Lopez S. L'infarctus du myocarde dans trois regions françaises: comparaison de l'incidence et de la mortalité en 1985. *Rev Epidemiol Sante Publique* 1988;36:335-41.
25. Cambou JP, Arveiler D, Amouyel P, Ruidavets JB, Haas B, Montaye M *et al.* [Coronary disease in France: data from the MONICA registers (1985-1991)]. *Rev Epidemiol Sante Publique* 1996;44 Suppl 1:S46-S52.

26. Artaud-Wild SM, Connor SL, Sexton G, Connor WE. Differences in coronary mortality can be explained by differences in cholesterol and saturated fat intakes in 40 countries but not in France and Finland. A paradox. *Circulation* 1993;88:2771-79.
27. Masia R, Pena A, Marrugat J, Sala J, Vila J, Pavesi M *et al.* High prevalence of cardiovascular risk factors in Gerona, Spain, a province with low myocardial infarction incidence. REGICOR Investigators. *J Epidemiol Community Health* 1998;52:707-15.
28. Serra-Majem L, Ribas L, Tresserras R, Ngo J, Salleras L. How could changes in diet explain changes in coronary heart disease mortality in Spain? The Spanish paradox. *Am J Clin Nutr* 1995;61:1351S-9S.
29. Gordon DJ, Probstfield JL, Garrison RJ, Neaton JD, Castelli WP, Knoke JD *et al.* High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American studies. *Circulation* 1989;79:8-15.
30. Stampfer MJ, Sacks FM, Salvini S, Willett WC, Hennekens CH. A prospective study of cholesterol, apolipoproteins, and the risk of myocardial infarction. *N Engl J Med* 1991;325:373-81.
31. Sentí M, Masià R, Pena A, Elosua R, Aubó C, Bosch M *et al.* Anthropometric and dietary predictors of high density lipoprotein cholesterol concentration in a population-based study. The REGICOR study [Determinantes antropométricos y dietéticos de la concentración sérica del colesterol de las lipoproteínas de alta densidad en un estudio de base poblacional. El estudio REGICOR]. *Rev Esp Cardiol* 1998;51:979-87.
32. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115-26.
33. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993;362:801-09.
34. Witztum JL. The oxidation hypothesis of atherosclerosis. *Lancet* 1994;344:793-95.
35. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature*. 2000;407:233-41
36. Marrugat J, Elosua R, Gil M. Epidemiología y prevención de las enfermedades cardiovasculares, In: Martínez-Navarro F, Antó JM, editors. *Salud Pública*. Madrid: McGraw-Hill Interamericana; 1997. p. 529-66.
37. Steinberg D. Antioxidants and atherosclerosis. A current assessment. *Circulation* 1991;84:1420-25.
38. Navab M, Berliner JA, Watson AD, Hama SY, Territo MC, Lusis AJ *et al.* The Yin and Yang of oxidation in the development of the fatty streak. A review based on the 1994 George Lyman Duff Memorial Lecture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:831-42.
39. Miller GJ, Miller NE. Plasma-high-density-lipoprotein concentration and development of ischaemic heart-disease. *Lancet* 1975;1:16-19.
40. Gordon T, Castelli WP, Hjortland MC, Kannel WB, Dawber TR. High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study. *Am J Med* 1977;62:707-14.

41. Rhoads GG, Gulbrandsen CL, Kagan A. Serum lipoproteins and coronary heart disease in a population study of Hawaii Japanese men. *N Engl J Med* 1976;294:293-98.
42. Frick MH, Elo O, Haapa K, Heinonen OP, Heinsalmi P, Helo P *et al.* Helsinki Heart Study: primary-prevention trial with gemfibrozil in middle-aged men with dyslipidemia. Safety of treatment, changes in risk factors, and incidence of coronary heart disease. *N Engl J Med* 1987;317:1237-45.
43. The Lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial results. I. Reduction in incidence of coronary heart disease. *JAMA* 1984;251:351-64.
44. Gordon DJ, Probstfield JL, Garrison RJ, Neaton JD, Castelli WP, Knoke JD *et al.* High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American studies. *Circulation* 1989;79:8-15.
45. Badimon JJ, Badimon L, Galvez A, Dische R, Fuster V. High density lipoprotein plasma fractions inhibit aortic fatty streaks in cholesterol-fed rabbits. *Lab Invest* 1989;60:455-61.
46. Miyazaki A, Sakuma S, Morikawa W, Takiue T, Miake F, Terano T *et al.* Intravenous injection of rabbit apolipoprotein A-I inhibits the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:1882-88.
47. Badimon JJ, Badimon L, Fuster V. Regression of atherosclerotic lesions by high density lipoprotein plasma fraction in the cholesterol-fed rabbit. *J Clin Invest* 1990;85:1234-41.
48. Karathanasis SK, Ferris E, Haddad IA. DNA inversion within the apolipoproteins AI/CIII/AIV-encoding gene cluster of certain patients with premature atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 1987;84:7198-202.
49. Ordovas JM, Cassidy DK, Civeira F, Bisgaier CL, Schaefer EJ. Familial apolipoprotein A-I, C-III, and A-IV deficiency and premature atherosclerosis due to deletion of a gene complex on chromosome 11. *J Biol Chem* 1989;264:16339-42.
50. Matsunaga T, Hiasa Y, Yanagi H, Maeda T, Hattori N, Yamakawa K *et al.* Apolipoprotein A-I deficiency due to a codon 84 nonsense mutation of the apolipoprotein A-I gene. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 1991;88:2793-97.
51. Stein O, Dabach Y, Hollander G, Ben Naim M, Halperin G, Breslow JL *et al.* Delayed loss of cholesterol from a localized lipoprotein depot in apolipoprotein A-I-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 1997;94:9820-24.
52. Fielding CJ, Fielding PE. Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *J Lipid Res* 1995;36:211-28.
53. Nagano Y, Arai H, Kita T. High density lipoprotein loses its effect to stimulate efflux of cholesterol from foam cells after oxidative modification. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 1991;88:6457-61.
54. Salmon S, Maziere C, Auclair M, Theron L, Santus R, Maziere JC. Malondialdehyde modification and copper-induced autooxidation of high-density lipoprotein decrease cholesterol efflux from human cultured fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 1992;1125:230-35.
55. Morel DW. Reduced cholesterol efflux to mildly oxidized high density lipoprotein. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;200:408-16.



- 
56. Rifichi VA, Khachadurian AK. Oxidation of high density lipoproteins: characterization and effects on cholesterol efflux from J774 macrophages. *Biochim Biophys Acta* 1996;1299:87-94.
57. Gesquiere L, Loreau N, Blache D. Impaired cellular cholesterol efflux by oxysterol-enriched high density lipoproteins. *Free Radic Biol Med* 1997;23:541-47.
58. Brewer HB, Jr., Fairwell T, LaRue A, Ronan R, Houser A, Bronzert TJ. The amino acid sequence of human APOA-I, an apolipoprotein isolated from high density lipoproteins. *Biochem Biophys Res Commun* 1978;80:623-30.
59. Rubin EM, Krauss RM, Spangler EA, Verstuyft JG, Clift SM. Inhibition of early atherogenesis in transgenic mice by human apolipoprotein AI. *Nature* 1991;353:265-67.
60. Paszty C, Maeda N, Verstuyft J, Rubin EM. Apolipoprotein AI transgene corrects apolipoprotein E deficiency- induced atherosclerosis in mice. *J Clin Invest* 1994;94:899-903.
61. Benoit P, Emmanuel F, Caillaud JM, Bassinet L, Castro G, Gallix P *et al.* Somatic gene transfer of human ApoA-I inhibits atherosclerosis progression in mouse models. *Circulation* 1999;99:105-10.
62. Gordon DJ, Rifkind BM. High-density lipoprotein--the clinical implications of recent studies. *N Engl J Med* 1989;321:1311-16.
63. Plump AS, Erickson SK, Weng W, Partin JS, Breslow JL, Williams DL. Apolipoprotein A-I is required for cholesteryl ester accumulation in steroidogenic cells and for normal adrenal steroid production. *J Clin Invest* 1996;97:2660-71.
64. Karathanasis SK, McPherson J, Zannis VI, Breslow JL. Linkage of human apolipoproteins A-I and C-III genes. *Nature* 1983;304:371-73.
65. Brooks-Wilson A, Marcil M, Clee SM, Zhang LH, Roomp K, van Dam M *et al.* Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nat Genet* 1999;22:336-45.
66. Lawn RM, Wade DP, Garvin MR, Wang X, Schwartz K, Porter JG *et al.* The Tangier disease gene product ABC1 controls the cellular apolipoprotein-mediated lipid removal pathway. *J Clin Invest* 1999;104:R25-R31.
67. Szakacs G, Langmann T, Ozvegy C, Orso E, Schmitz G, Varadi A *et al.* Characterization of the ATPase cycle of human ABCA1: implications for its function as a regulator rather than an active transporter. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;288:1258-64.
68. Bodzioch M, Orso E, Klucken J, Langmann T, Bottcher A, Diederich W *et al.* The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. *Nat Genet* 1999;22:347-51.
69. Rust S, Rosier M, Funke H, Real J, Amoura Z, Piette JC *et al.* Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. *Nat Genet* 1999;22:352-55.
70. Mackness MI, Durrington PN. HDL, its enzymes and its potential to influence lipid peroxidation. *Atherosclerosis* 1995;115:243-53.

71. Jonas A. Lecithin cholesterol acyltransferase. *Biochim Biophys Acta* 2000;1529:245-56.
72. Sparks DL, Anantharamaiah GM, Segrest JP, Phillips MC. Effect of the cholesterol content of reconstituted LpA-I on lecithin:cholesterol acyltransferase activity. *J Biol Chem* 1995;270:5151-57.
73. Kugiyama K, Kerns SA, Morrisett JD, Roberts R, Henry PD. Impairment of endothelium-dependent arterial relaxation by lysolecithin in modified low-density lipoproteins. *Nature* 1990;344:160-62.
74. Murohara T, Kugiyama K, Ohgushi M, Sugiyama S, Ohta Y, Yasue H. LPC in oxidized LDL elicits vasocontraction and inhibits endothelium-dependent relaxation. *Am J Physiol* 1994;267:H2441-H2449.
75. Glomset JA. The plasma lecithins:cholesterol acyltransferase reaction. *J Lipid Res* 1968;9:155-67.
76. Liu M, Subbaiah PV. Hydrolysis and transesterification of platelet-activating factor by lecithin-cholesterol acyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 1994;91:6035-39.
77. Subbaiah PV, Liu M. Disparate effects of oxidation on plasma acyltransferase activities: inhibition of cholesterol esterification but stimulation of transesterification of oxidized phospholipids. *Biochim Biophys Acta* 1996;1301:115-26.
78. Goyal J, Wang K, Liu M, Subbaiah PV. Novel function of lecithin-cholesterol acyltransferase. Hydrolysis of oxidized polar phospholipids generated during lipoprotein oxidation. *J Biol Chem* 1997;272:16231-39.
79. Acton S, Rigotti A, Landschulz KT, Xu S, Hobbs HH, Krieger M. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science* 1996;271:518-20.
80. Stein Y, Dabach Y, Hollander G, Halperin G, Stein O. Metabolism of HDL-cholesteryl ester in the rat, studied with a nonhydrolyzable analog, cholesteryl linoleyl ether. *Biochim Biophys Acta* 1983;752:98-105.
81. Glass C, Pittman RC, Weinstein DB, Steinberg D. Dissociation of tissue uptake of cholesterol ester from that of apoprotein A-I of rat plasma high density lipoprotein: selective delivery of cholesterol ester to liver, adrenal, and gonad. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 1983;80:5435-39.
82. Murao K, Terpstra V, Green SR, Kondratenko N, Steinberg D, Quehenberger O. Characterization of CLA-1, a human homologue of rodent scavenger receptor BI, as a receptor for high density lipoprotein and apoptotic thymocytes. *J Biol Chem* 1997;272:17551-57.
83. Stein O, Israeli A, Leitersdorf E, Halperin G, Stein Y. Preferential uptake of cholesteryl ester-HDL by cultured macrophages. *Atherosclerosis* 1987;65:151-58.
84. Ji Y, Jian B, Wang N, Sun Y, Moya ML, Phillips MC *et al.* Scavenger receptor BI promotes high density lipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux. *J Biol Chem* 1997;272:20982-85.
85. Weinberg RB, Spector MS. Structural properties and lipid binding of human apolipoprotein A-IV. *J Biol Chem* 1985;260:4914-21.

86. Stein O, Stein Y, Lefevre M, Roheim PS. The role of apolipoprotein A-IV in reverse cholesterol transport studied with cultured cells and liposomes derived from an ether analog of phosphatidylcholine. *Biochim Biophys Acta* 1986;878:7-13.
87. Steinmetz A, Barbaras R, Ghalim N, Clavey V, Fruchart JC, Ailhaud G. Human apolipoprotein A-IV binds to apolipoprotein A-I/A-II receptor sites and promotes cholesterol efflux from adipose cells. *J Biol Chem* 1990;265:7859-63.
88. Stein O, Dabach Y, Hollander G, Ben Naim M, Oette K, Stein Y. Effects of interactions of apolipoprotein A-II with apolipoproteins A-I or A-IV on [<sup>3</sup>H]cholesterol efflux and uptake in cell culture. *Biochim Biophys Acta* 1995;1257:174-80.
89. Cohen RD, Castellani LW, Qiao JH, Van Lenten BJ, Lusis AJ, Reue K. Reduced aortic lesions and elevated high density lipoprotein levels in transgenic mice overexpressing mouse apolipoprotein A-IV. *J Clin Invest* 1997;99:1906-16.
90. Duverger N, Kruth H, Emmanuel F, Caillaud JM, Viglietta C, Castro G *et al.* Inhibition of atherosclerosis development in cholesterol-fed human apolipoprotein A-I-transgenic rabbits. *Circulation* 1996;94:713-17.
91. Plump AS, Scott CJ, Breslow JL. Human apolipoprotein A-I gene expression increases high density lipoprotein and suppresses atherosclerosis in the apolipoprotein E- deficient mouse. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 1994;91:9607-11.
92. Schultz JR, Gong EL, McCall MR, Nichols AV, Cliff SM, Rubin EM. Expression of human apolipoprotein A-II and its effect on high density lipoproteins in transgenic mice. *J Biol Chem* 1992;267:21630-36.
93. Schultz JR, Verstuyft JG, Gong EL, Nichols AV, Rubin EM. Protein composition determines the anti-atherogenic properties of HDL in transgenic mice. *Nature* 1993;365:762-64.
94. Warden CH, Hedrick CC, Qiao JH, Castellani LW, Lusis AJ. Atherosclerosis in transgenic mice overexpressing apolipoprotein A-II. *Science* 1993;261:469-72.
95. Castellani LW, Navab M, Van Lenten BJ, Hedrich CC, Hama SY, Goto AM *et al.* Overexpression of apolipoprotein all in transgenic mice converts high density lipoproteins to proinflammatory particles. *J Clin Invest* 1997;100:464-74.
96. Plump AS, Smith JD, Hayek T, Aalto-Setälä K, Walsh A, Verstuyft JG *et al.* Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E- deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell* 1992;71:343-53.
97. Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, Maeda N. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science* 1992;258:468-71.
98. Zhu Y, Bellosta S, Langer C, Bernini F, Pitas RE, Mahley RW *et al.* Low-dose expression of a human apolipoprotein E transgene in macrophages restores cholesterol efflux capacity of apolipoprotein E- deficient mouse plasma. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 1998;95:7585-90.
99. Castilho LN, Oliveira HC, Cazita PM, de Oliveira AC, Sesso A, Quintao EC. Oxidation of LDL enhances the cholesteryl ester transfer protein (CETP)- mediated cholesteryl ester transfer rate to

- HDL, bringing on a diminished net transfer of cholesteryl ester from HDL to oxidized LDL. *Clin Chim Acta* 2001;304:99-106.
100. Brown ML, Inazu A, Hesler CB, Agellon LB, Mann C, Whitlock ME *et al.* Molecular basis of lipid transfer protein deficiency in a family with increased high-density lipoproteins. *Nature* 1989;342:448-51.
101. Hayek T, Azrolan N, Verdery RB, Walsh A, Chajek-Shaul T, Agellon LB *et al.* Hypertriglyceridemia and cholesteryl ester transfer protein interact to dramatically alter high density lipoprotein levels, particle sizes, and metabolism. Studies in transgenic mice. *J Clin Invest* 1993;92:1143-52.
102. Tato F, Vega GL, Tall AR, Grundy SM. Relation between cholesterol ester transfer protein activities and lipoprotein cholesterol in patients with hypercholesterolemia and combined hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:112-20.
103. Zhong S, Sharp DS, Grove JS, Bruce C, Yano K, Curb JD *et al.* Increased coronary heart disease in Japanese-American men with mutation in the cholesteryl ester transfer protein gene despite increased HDL levels. *J Clin Invest* 1996;97:2917-23.
104. Foger B, Luef G, Ritsch A, Schmidauer C, Doblinger A, Lechleitner M *et al.* Relationship of high-density lipoprotein subfractions and cholesteryl ester transfer protein in plasma to carotid artery wall thickness. *J Mol Med* 1995;73:369-72.
105. Herrera VL, Makrides SC, Xie HX, Adari H, Krauss RM, Ryan US *et al.* Spontaneous combined hyperlipidemia, coronary heart disease and decreased survival in Dahl salt-sensitive hypertensive rats transgenic for human cholesteryl ester transfer protein. *Nat Med* 1999;5:1383-89.
106. Marotti KR, Castle CK, Boyle TP, Lin AH, Murray RW, Melchior GW. Severe atherosclerosis in transgenic mice expressing simian cholesteryl ester transfer protein. *Nature* 1993;364:73-75.
107. Okamoto H, Yonemori F, Wakitani K, Minowa T, Maeda K, Shinkai H. A cholesteryl ester transfer protein inhibitor attenuates atherosclerosis in rabbits. *Nature* 2000;406:203-07.
108. Hayek T, Masucci-Magoulas L, Jiang X, Walsh A, Rubin E, Breslow JL *et al.* Decreased early atherosclerotic lesions in hypertriglyceridemic mice expressing cholesteryl ester transfer protein transgene. *J Clin Invest* 1995;96:2071-74.
109. Mann CJ, Yen FT, Grant AM, Bihain BE. Mechanism of plasma cholesteryl ester transfer in hypertriglyceridemia. *J Clin Invest* 1991;88:2059-66.
110. Murtomaki S, Tahvanainen E, Antikainen M, Tiret L, Nicaud V, Jansen H *et al.* Hepatic lipase gene polymorphisms influence plasma HDL levels. Results from Finnish EARS participants. European Atherosclerosis Research Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:1879-84.
111. Van't Hooft FM, Lundahl B, Ragogna F, Karpe F, Olivecrona G, Hamsten A. Functional characterization of 4 polymorphisms in promoter region of hepatic lipase gene. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:1335-39.
112. Cohen JC, Vega GL, Grundy SM. Hepatic lipase: new insights from genetic and metabolic studies. *Curr Opin Lipidol* 1999;10:259-67.

113. Thuren T. Hepatic lipase and HDL metabolism. *Curr Opin Lipidol* 2000;11:277-83.
114. Bensadoun A, Berryman DE. Genetics and molecular biology of hepatic lipase. *Curr Opin Lipidol* 1996;7:77-81.
115. Pihlajamaki J, Karjalainen L, Karhapaa P, Vauhkonen I, Taskinen MR, Deeb SS *et al.* G-250A substitution in promoter of hepatic lipase gene is associated with dyslipidemia and insulin resistance in healthy control subjects and in members of families with familial combined hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:1789-95.
116. Sattler W, Stocker R. Greater selective uptake by Hep G2 cells of high-density lipoprotein cholesteryl ester hydroperoxides than of unoxidized cholesteryl esters. *Biochem J* 1993;294 ( Pt 3):771-78.
117. Mackness MI, Abbott C, Arrol S, Durrington PN. The role of high-density lipoprotein and lipid-soluble antioxidant vitamins in inhibiting low-density lipoprotein oxidation. *Biochem.J* 1993;294 ( Pt 3):829-34.
118. Mackness MI, Arrol S, Abbott C, Durrington PN. Protection of low-density lipoprotein against oxidative modification by high-density lipoprotein associated paraoxonase. *Atherosclerosis* 1993;104:129-35.
119. Matsuda Y, Hirata K, Inoue N, Suematsu M, Kawashima S, Akita H *et al.* High density lipoprotein reverses inhibitory effect of oxidized low density lipoprotein on endothelium-dependent arterial relaxation. *Circ Res* 1993;72:1103-09.
120. Plane F, Bruckdorfer KR, Kerr P, Steuer A, Jacobs M. Oxidative modification of low-density lipoproteins and the inhibition of relaxations mediated by endothelium-derived nitric oxide in rabbit aorta. *Br J Pharmacol* 1992;105:216-22.
121. Deckert V, Persegol L, Viens L, Lizard G, Athias A, Lallemand C *et al.* Inhibitors of arterial relaxation among components of human oxidized low-density lipoproteins. Cholesterol derivatives oxidized in position 7 are potent inhibitors of endothelium-dependent relaxation. *Circulation* 1997;95:723-31.
122. Galle J, Ochslin M, Schollmeyer P, Wanner C. Oxidized lipoproteins inhibit endothelium-dependent vasodilation. Effects of pressure and high-density lipoprotein. *Hypertension* 1994;23:556-64.
123. Bowry VW, Stanley KK, Stocker R. High density lipoprotein is the major carrier of lipid hydroperoxides in human blood plasma from fasting donors. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 1992;89:10316-20.
124. Fluiter K, Vietsch H, Biessen EA, Kostner GM, van Berkel TJ, Sattler W. Increased selective uptake in vivo and in vitro of oxidized cholesteryl esters from high-density lipoprotein by rat liver parenchymal cells. *Biochem J* 1996;319 ( Pt 2):471-76.
125. Fluiter K, Sattler W, De Beer MC, Connell PM, Van der Westhuyzen DR, van Berkel TJ. Scavenger receptor BI mediates the selective uptake of oxidized cholesterol esters by rat liver. *J Biol Chem* 1999;274:8893-99.

126. Hessler JR, Robertson AL, Jr., Chisolm GM, III. LDL-induced cytotoxicity and its inhibition by HDL in human vascular smooth muscle and endothelial cells in culture. *Atherosclerosis* 1979;32:213-29.
127. Parthasarathy S, Barnett J, Fong LG. High-density lipoprotein inhibits the oxidative modification of low-density lipoprotein. *Biochim Biophys Acta* 1990;1044:275-83.
128. Dansky HM, Charlton SA, Barlow CB, Tamminen M, Smith JD, Frank JS *et al.* Apo A-I inhibits foam cell formation in Apo E-deficient mice after monocyte adherence to endothelium. *J Clin Invest* 1999;104:31-39.
129. Suc I, Escargueil-Blanc I, Trolly M, Salvayre R, Negre-Salvayre A. HDL and ApoA prevent cell death of endothelial cells induced by oxidized LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:2158-66.
130. Cockerill GW, Rye KA, Gamble JR, Vadas MA, Barter PJ. High-density lipoproteins inhibit cytokine-induced expression of endothelial cell adhesion molecules. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:1987-94.
131. Ashby DT, Rye KA, Clay MA, Vadas MA, Gamble JR, Barter PJ. Factors influencing the ability of HDL to inhibit expression of vascular cell adhesion molecule-1 in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:1450-55.
132. Baenziger NL, Becherer PR, Majerus PW. Characterization of prostacyclin synthesis in cultured human arterial smooth muscle cells, venous endothelial cells and skin fibroblasts. *Cell* 1979;16:967-74.
133. Fleisher LN, Tall AR, Witte LD, Miller RW, Cannon PJ. Stimulation of arterial endothelial cell prostacyclin synthesis by high density lipoproteins. *J Biol Chem* 1982;257:6653-55.
134. Pomerantz KB, Tall AR, Feinmark SJ, Cannon PJ. Stimulation of vascular smooth muscle cell prostacyclin and prostaglandin E<sub>2</sub> synthesis by plasma high and low density lipoproteins. *Circ Res* 1984;54:554-65.
135. Yui Y, Aoyama T, Morishita H, Takahashi M, Takatsu Y, Kawai C. Serum prostacyclin stabilizing factor is identical to apolipoprotein A- I (Apo A-I). A novel function of Apo A-I. *J Clin Invest* 1988;82:803-07.
136. Moncada S, Vane JR. Arachidonic acid metabolites and the interactions between platelets and blood-vessel walls. *N Engl J Med* 1979;300:1142-47.
137. Moncada S, Herman AG, Higgs EA, Vane JR. Differential formation of prostacyclin (PGX or PGI<sub>2</sub>) by layers of the arterial wall. An explanation for the anti-thrombotic properties of vascular endothelium. *Thromb Res* 1977;11:323-44.
138. Thiemermann C. Biosynthesis and interaction of endothelium-derived vasoactive mediators. *Eicosanoids* 1991;4:187-202.
139. Ota Y, Kugiyama K, Sugiyama S, Matsumura T, Terano T, Yasue H. Complexes of apoA-1 with phosphatidylcholine suppress dysregulation of arterial tone by oxidized LDL. *Am J Physiol* 1997;273:H1215-H1222.

140. Kelso GJ, Stuart WD, Richter RJ, Furlong CE, Jordan-Starck TC, Harmony JA. Apolipoprotein J is associated with paraoxonase in human plasma. *Biochemistry* 1994;33:832-39.
141. Navab M, Hama-Levy S, Van Lenten BJ, Fonarow GC, Cardinez CJ, Castellani LW *et al.* Mildly oxidized LDL induces an increased apolipoprotein J/paraoxonase ratio. *J Clin Invest* 1997;99:2005-19.
142. Navab M, Hama-Levy S, Van Lenten BJ, Fonarow GC, Cardinez CJ, Castellani LW *et al.* Mildly oxidized LDL induces an increased apolipoprotein J/paraoxonase ratio. *J Clin Invest* 1997;99:2005-19.
143. Evangelou AM. Platelet-activating factor (PAF): implications for coronary heart and vascular diseases. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1994;50:1-28.
144. Imaizumi TA, Stafforini DM, Yamada Y, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA. Platelet-activating factor: a mediator for clinicians. *J Intern Med* 1995;238:5-20.
145. Tjoelker LW, Wilder C, Eberhardt C, Stafforini DM, Dietsch G, Schimpf B *et al.* Anti-inflammatory properties of a platelet-activating factor acetylhydrolase. *Nature* 1995;374:549-53.
146. Stafforini DM, Prescott SM, Zimmerman GA, McIntyre TM. Platelet-activating factor acetylhydrolase activity in human tissues and blood cells. *Lipids* 1991;26:979-85.
147. Stafforini DM, McIntyre TM, Carter ME, Prescott SM. Human plasma platelet-activating factor acetylhydrolase. Association with lipoprotein particles and role in the degradation of platelet-activating factor. *J Biol Chem* 1987;262:4215-22.
148. Rodrigo L, Mackness B, Durrington PN, Hernandez A, Mackness MI. Hydrolysis of platelet-activating factor by human serum paraoxonase. *Biochem J* 2001;354:1-7.
149. Steinbrecher UP, Pritchard PH. Hydrolysis of phosphatidylcholine during LDL oxidation is mediated by platelet-activating factor acetylhydrolase. *J Lipid Res* 1989;30:305-15.
150. Stremler KE, Stafforini DM, Prescott SM, McIntyre TM. Human plasma platelet-activating factor acetylhydrolase. Oxidatively fragmented phospholipids as substrates. *J Biol Chem* 1991;266:11095-103.
151. Couture P, Otvos JD, Cupples LA, Lahoz C, Wilson PW, Schaefer EJ *et al.* Association of the C-514T polymorphism in the hepatic lipase gene with variations in lipoprotein subclass profiles: The Framingham Offspring Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:815-22.
152. Watson AD, Berliner JA, Hama SY, La Du BN, Faull KF, Fogelman AM *et al.* Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase. Inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest* 1995;96:2882-91.
153. Gan KN, Smolen A, Eckerson HW, La Du BN. Purification of human serum paraoxonase/arylesterase. Evidence for one esterase catalyzing both activities. *Drug Metab Dispos* 1991;19:100-06.
154. Mackness MI. Possible medical significance of human serum paraoxonase, In: Reiner E, Aldridge WN, Hoskin FC, editors. *Enzymes hydrolysing organophosphorus compounds*. UK:Ellis-Horwood: 1989. p. 202-13.

155. Sorenson RC, Primo-Parmo SL, Kuo CL, Adkins S, Lockridge O, La Du BN. Reconsideration of the catalytic center and mechanism of mammalian paraoxonase/arylesterase. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 1995;92:7187-91.
156. Blatter MC, James RW, Messmer S, Barja F, Pometta D. Identification of a distinct human high-density lipoprotein subspecies defined by a lipoprotein-associated protein, K-45. Identity of K-45 with paraoxonase. *Eur J Biochem* 1993;211:871-79.
157. Shih DM, Gu L, Xia YR, Navab M, Li W, Hama S *et al.* Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. *Nature* 1998;394:284-87.
158. Davies HG, Richter RJ, Keifer M, Broomfield CA, Sowalla J, Furlong CE. The effect of the human serum paraoxonase polymorphism is reversed with diazoxon, soman and sarin. *Nat Genet* 1996;14:334-36.
159. Humbert R, Adler DA, Disteché CM, Hassett C, Omiecinski CJ, Furlong CE. The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism. *Nat Genet* 1993;3:73-76.
160. Durrington PN, Mackness B, Mackness MI. Paraoxonase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:473-80.
161. Haley RW, Marshall WW, McDonald GG, Daugherty MA, Petty F, Fleckenstein JL. Brain abnormalities in Gulf War syndrome: evaluation with <sup>1</sup>H MR spectroscopy. *Radiology* 2000;215:807-17.
162. Clendenning JB, Humbert R, Green ED, Wood C, Traver D, Furlong CE. Structural organization of the human PON1 gene. *Genomics* 1996;35:586-89.
163. Primo-Parmo SL, Sorenson RC, Teiber J, La Du BN. The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family. *Genomics* 1996;33:498-507.
164. Eiberg H, Mohr J, Schmiegelow K, Nielsen LS, Williamson R. Linkage relationships of paraoxonase (PON) with other markers: indication of PON-cystic fibrosis synteny. *Clin Genet* 1985;28:265-71.
165. Tsui LC, Buchwald M, Barker D, Braman JC, Knowlton R, Schumm JW *et al.* Cystic fibrosis locus defined by a genetically linked polymorphic DNA marker. *Science* 1985;230:1054-57.
166. Brophy VH, Hastings MD, Clendenning JB, Richter RJ, Jarvik GP, Furlong CE. Polymorphisms in the human paraoxonase (PON1) promoter. *Pharmacogenetics* 2001;11:77-84.
167. Brophy VH, Jampsa RL, Clendenning JB, McKinstry LA, Jarvik GP, Furlong CE. Effects of 5' Regulatory-Region Polymorphisms on Paraoxonase-Gene (PON1) Expression. *Am J Hum Genet* 2001;68:1428-36.
168. Adkins S, Gan KN, Mody M, La Du BN. Molecular basis for the polymorphic forms of human serum paraoxonase/arylesterase: glutamine or arginine at position 191, for the respective A or B allozymes. *Am J Hum Genet* 1993;52:598-608.



169. Roychoudhury, A. K. Human Polymorphic Genes: World Distribution. 1988. Oxford, Oxford University Press.  
Ref Type: Serial (Book, Monograph)
170. Geldmacher-von Mallinckrodt M, Diepgen TL, Duhme C, Hommel G. A study of the polymorphism and ethnic distribution differences of human serum paraoxonase. *Am J Phys Anthropol* 1983;62:235-41.
171. Simpson NE. Serum arylesterase levels of activity in twins and their parents. *Am J Hum Genet* 1971;23:375-82.
172. La Du BN. Human serum paraoxonase/arylesterase, In: Kalow W, editor. *Pharmacogenetics of drug metabolism*. New York: Pergamon Press; 1992.
173. Jakubowski H, Ambrosius WT, Pratt JH. Genetic determinants of homocysteine thiolactonase activity in humans: implications for atherosclerosis. *FEBS Lett* 2001;491:35-39.
174. Senti M, Tomás M, Elosua R, Sala J, Masia R. The Paraoxonase-1 Codon 192 polymorphism is associated with fasting total cholesterol and LDL-Cholesterol concentrations only in postmenopausal women. The REGICOR study. *Clin Chem Lab Med* 2002;40:677-83.
175. Mackness MI, Mackness B, Durrington PN, Connelly PW, Hegele RA. Paraoxonase: biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins. *Curr Opin Lipidol* 1996;7:69-76.
176. Watson CE, Draganov DI, Billecke SS, Bisgaier CL, La Du BN. Rabbits possess a serum paraoxonase polymorphism similar to the human Q192R. *Pharmacogenetics* 2001;11:123-34.
177. Leviev I, Negro F, James RW. Two alleles of the human paraoxonase gene produce different amounts of mRNA. An explanation for differences in serum concentrations of paraoxonase associated with the (Leu-Met54) polymorphism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:2935-39.
178. Garin MC, James RW, Dussoix P, Blanche H, Passa P, Froguel P *et al.* Paraoxonase polymorphism Met-Leu54 is associated with modified serum concentrations of the enzyme. A possible link between the paraoxonase gene and increased risk of cardiovascular disease in diabetes. *J Clin Invest* 1997;99:62-66.
179. Leviev I, Deakin S, James RW. Decreased stability of the M54 isoform of paraoxonase as a contributory factor to variations in human serum paraoxonase concentrations. *J Lipid Res* 2001;42:528-35.
180. Mackness B, Mackness MI, Arrol S, Turkie W, Durrington PN. Effect of the molecular polymorphisms of human paraoxonase (PON1) on the rate of hydrolysis of paraoxon. *Br J Pharmacol* 1997;122:265-68.
181. Leviev I, James RW. Promoter polymorphisms of human paraoxonase PON1 gene and serum paraoxonase activities and concentrations. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:516-21.
182. Suehiro T, Nakamura T, Inoue M, Shiinoki T, Ikeda Y, Kumon Y *et al.* A polymorphism upstream from the human paraoxonase (PON1) gene and its association with PON1 expression. *Atherosclerosis* 2000;150:295-98.

183. James RW, Leviev I, Ruiz J, Passa P, Froguel P, Garin MC. Promoter polymorphism T(-107)C of the paraoxonase PON1 gene is a risk factor for coronary heart disease in type 2 diabetic patients. *Diabetes* 2000;49:1390-93.
184. Van Lenten BJ, Wagner AC, Navab M, Fogelman AM. Oxidized phospholipids induce changes in hepatic paraoxonase and ApoJ but not monocyte chemoattractant protein-1 via interleukin-6. *J Biol Chem* 2001;276:1923-29.
185. Cascorbi I, Laule M, Mrozikiewicz PM, Mrozikiewicz A, Andel C, Baumann G *et al.* Mutations in the human paraoxonase 1 gene: frequencies, allelic linkages, and association with coronary artery disease. *Pharmacogenetics* 1999;9:755-61.
186. Primo-Parmo SL, Hsu C, Law DJ, La Du FN. Location and arrangement of three Paraoxonase genes: PON1, PON2, and PON3, on human chromosome 7. *Am J Hum Genet Suppl* 1996;59:A406.
187. La Du BN. Is paraoxonase-3 another hdl-associated protein protective against atherosclerosis? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:467-68.
188. Mochizuki H, Scherer SW, Xi T, Nickle DC, Majer M, Huizenga JJ *et al.* Human PON2 gene at 7q21.3: cloning, multiple mRNA forms, and missense polymorphisms in the coding sequence. *Gene* 1998;213:149-57.
189. Ng CJ, Wadleigh DJ, Gangopadhyay A, Hama S, Grijalva VR, Navab M *et al.* Paraoxonase-2 is a ubiquitously expressed protein with antioxidant properties and is capable of preventing cell-mediated oxidative modification of low density lipoprotein. *J Biol Chem* 2001;276:44444-49.
190. Hegele RA, Connelly PW, Scherer SW, Hanley AJ, Harris SB, Tsui LC *et al.* Paraoxonase-2 gene (PON2) G148 variant associated with elevated fasting plasma glucose in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:3373-77.
191. Boright AP, Connelly PW, Brunt JH, Scherer SW, Tsui L, Hegele RA. genetic variation in paraoxonase-1 and paraoxonase-2 is associated with variation in plasma lipoproteins in Alberta Hutterites. *Atherosclerosis* 1998;139:131-36.
192. Hegele RA, Harris SB, Connelly PW, Hanley AJ, Tsui LC, Zinman B *et al.* Genetic variation in paraoxonase-2 is associated with variation in plasma lipoproteins in Canadian Oji-Cree. *Clin Genet* 1998;54:394-99.
193. Busch CP, Ramdath DD, Ramsewak S, Hegele RA. Association of PON2 variation with birth weight in Trinidadian neonates of South Asian ancestry. *Pharmacogenetics* 1999;9:351-56.
194. Sanghera DK, Aston CE, Saha N, Kamboh MI. DNA polymorphisms in two paraoxonase genes (PON1 and PON2) are associated with the risk of coronary heart disease. *Am J Hum Genet* 1998;62:36-44.
195. Janka Z, Juhasz A, Rimanoczy AA, Boda K, Marki-Zay J, Kalman J. Codon 311 (Cys --> Ser) polymorphism of paraoxonase-2 gene is associated with apolipoprotein E4 allele in both Alzheimer's and vascular dementias. *Mol Psychiatry* 2002;7:110-12.

196. Leus FR, Zwart M, Kastelein JJ, Voorbij HA. PON(2) gene variants are associated with clinical manifestations of cardiovascular disease in familial hypercholesterolemia patients. *Atherosclerosis* 2001;154:641-49.
197. Reddy ST, Wadleigh DJ, Grijalva V, Ng C, Hama S, Gangopadhyay A *et al.* Human paraoxonase-3 is an HDL-associated enzyme with biological activity similar to paraoxonase-1 protein but is not regulated by oxidized lipids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:542-47.
198. Draganov DI, Stetson PL, Watson CE, Billecke SS, La Du BN. Rabbit serum paraoxonase 3 (PON3) is an HDL-associated lactonase and protects LDL against oxidation. *J Biol Chem* 2000.
199. Smolen A, Eckerson HW, Gan KN, Hailat N, La Du BN. Characteristics of the genetically determined allozymic forms of human serum paraoxonase/arylesterase. *Drug Metab Dispos* 1991;19:107-12.
200. Billecke S, Draganov D, Counsell R, Stetson P, Watson C, Hsu C *et al.* Human serum paraoxonase (pon1) isozymes Q and R hydrolyze lactones and cyclic carbonate esters. *Drug Metab Dispos* 2000;28:1335-42.
201. Mackness B, Mackness MI, Arrol S, Turkie W, Durrington PN. Effects of the human serum paraoxonase 55 and 192 genetic polymorphisms on the protection by high density lipoprotein against low density lipoprotein oxidative modification. *FEBS Lett* 1998;423:57-60.
202. Brealey CJ, Walker CH, Bladwin BC. A-esterase activities in relation to the differential toxicity of pirimiphos-methyl to birds and mammals. *Pestic Sci* 1980;11:546-54.
203. Ortigoza-Ferado J, Richter RJ, Hornung SK, Motulsky AG, Furlong CE. Paraoxon hydrolysis in human serum mediated by a genetically variable arylesterase and albumin. *Am J Hum Genet* 1984;36:295-305.
204. McElveen J, Mackness NI, Colley CM, Peard T, Warner S, Walker CH. Distribution of paraoxon hydrolytic activity in the serum of patients after myocardial infarction. *Clin Chem* 1986;32:671-73.
205. Ayub A, Mackness MI, Arrol S, Mackness B, Patel J, Durrington PN. Serum paraoxonase after myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:330-35.
206. Mackness B, Mackness MI, Arrol S, Turkie W, Julier K, Abuasha B *et al.* Serum paraoxonase (PON1) 55 AND 192 polymorphism and paraoxonase activity and concentration in non-insulin dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 1998;139:341-49.
207. Mackness MI, Harty D, Bhatnagar D, Winocour PH, Arrol S, Ishola M *et al.* Serum paraoxonase activity in familial hypercholesterolaemia and insulin- dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 1991;86:193-99.
208. Tomas M, Senti M, Garcia-Faria F, Vila J, Torrents A, Covas M *et al.* Effect of simvastatin therapy on paraoxonase activity and related lipoproteins in familial hypercholesterolemic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:2113-19.

209. Blatter Garin MC, Abbott C, Messmer S, Mackness M, Durrington P, Pometta D *et al.* Quantification of human serum paraoxonase by enzyme-linked immunoassay: population differences in protein concentrations. *Biochem J* 1994;304:549-54.
210. James RW, Blatter Garin MC, Calabresi L, Miccoli R, Von Eckardstein A, Tilly-Kiesi M *et al.* Modulated serum activities and concentrations of paraoxonase in high density lipoprotein deficiency states. *Atherosclerosis* 1998;139:77-82.
211. Cao H, Girard-Globa A, Berthezene F, Moulin P. Paraoxonase protection of LDL against peroxidation is independent of its esterase activity towards paraoxon and is unaffected by the Q-R genetic polymorphism. *J Lipid Res* 1999;40:133-39.
212. Watson AD, Berliner JA, Hama SY, La Du BN, Faull KF, Fogelman AM *et al.* Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase. Inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest* 1995;96:2882-91.
213. Aviram M, Billecke S, Sorenson R, Bisgaier C, Newton R, Rosenblat M *et al.* Paraoxonase active site required for protection against LDL oxidation involves its free sulfhydryl group and is different from that required for its arylesterase/paraoxonase activities: selective action of human paraoxonase allozymes Q and R. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:1617-24.
214. Eckerson HW, Wyte CM, La Du BN. The human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism. *Am J Hum Genet* 1983;35:1126-38.
215. Aviram M, Rosenblat M, Billecke S, Eroglu J, Sorenson R, Bisgaier CL *et al.* Human serum paraoxonase (PON 1) is inactivated by oxidized low density lipoprotein and preserved by antioxidants. *Free Radic Biol Med* 1999;26:892-904.
216. Augustinsson KB, Henricson B. A genetically controlled esterase in rat plasma. *Biochim Biophys Acta* 1966;124:323-31.
217. Jakubowski H. Calcium-dependent human serum homocysteine thiolactone hydrolase. A protective mechanism against protein N-homocysteinylation. *J Biol Chem* 2000;275:3957-62.
218. Biggadike K, Angell RM, Burgess CM, Farrell RM, Hancock AP, Harker AJ *et al.* Selective plasma hydrolysis of glucocorticoid gamma-lactones and cyclic carbonates by the enzyme paraoxonase: an ideal plasma inactivation mechanism. *J Med Chem* 2000;43:19-21.
219. Bodor N, Buchwald P. Drug targeting via retrometabolic approaches. *Pharmacol Ther* 1997;76:1-27.
220. Mackness MI, Arrol S, Durrington PN. Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein [published erratum appears in *FEBS Lett* 1991 Nov 4;292(1-2):307]. *FEBS Lett* 1991;286:152-54.
221. Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL, Newton RS, Primo-Parmo SL, La Du BN. Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase. *J Clin Invest* 1998;101:1581-90.

222. Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Frank JS, Demer LL, Edwards PA *et al.* Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation* 1995;91:2488-96.
223. Mackness B, Mackness MI, Durrington PN, Arrol S, Evans AE, McMaster D *et al.* Paraonase activity in two healthy populations with differing rates of coronary heart disease. *Eur J Clin Invest* 2000;30:4-10.
224. Mashima R, Yamamoto Y, Yoshimura S. Reduction of phosphatidylcholine hydroperoxide by apolipoprotein A-I: purification of the hydroperoxide-reducing proteins from human blood plasma. *J Lipid Res* 1998;39:1133-40.
225. Garner B, Waldeck AR, Witting PK, Rye KA, Stocker R. Oxidation of high density lipoproteins. II. Evidence for direct reduction of lipid hydroperoxides by methionine residues of apolipoproteins AI and AII. *J Biol Chem* 1998;273:6088-95.
226. Mackness MI, Walker CH, Carlson LA. Low A-esterase activity in serum of patients with fish-eye disease. *Clin Chem* 1987;33:587-88.
227. Mackness MI, Peuchant E, Dumon MF, Walker CH, Clerc M. Absence of "A"-esterase activity in the serum of a patient with Tangier disease. *Clin Biochem* 1989;22:475-78.
228. Shih DM, Gu L, Hama S, Xia YR, Navab M, Fogelman AM *et al.* Genetic-dietary regulation of serum paraonase expression and its role in atherogenesis in a mouse model. *J Clin Invest* 1996;97:1630-39.
229. Patel BN, Mackness MI, Harty DW, Arrol S, Boot-Handford RP, Durrington PN. Serum esterase activities and hyperlipidaemia in the streptozotocin- diabetic rat. *Biochim Biophys Acta* 1990;1035:113-16.
230. Kudchodkar BJ, Lacko AG, Dory L, Fungwe TV. Dietary fat modulates serum paraonase 1 activity in rats. *J Nutr* 2000;130:2427-33.
231. Watson AD, Leitinger N, Navab M, Faull KF, Hörkkö S, Witztum JL *et al.* Structural Identification by Mass Spectrometry of Oxidized Phospholipids in Minimally Oxidized Low Density Lipoprotein that Induce Monocyte/Endothelial Interactions and Evidence for Their Presence in Vivo. *J Biol Chem* 1997;272:13597-607.
232. Watson AD, Subbanagounder G, Welsbie DS, Faull KF, Navab M, Jung ME *et al.* Structural identification of a novel pro-inflammatory epoxyisoprostane phospholipid in mildly oxidized low density lipoprotein. *J Biol Chem* 1999;274:24787-98.
233. Shih DM, Xia YR, Wang XP, Miller E, Castellani LW, Subbanagounder G *et al.* Combined serum paraonase knockout/apolipoprotein E knockout mice exhibit increased lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *J Biol Chem* 2000;275:17527-35.
234. Oda MN, Bielicki JK, Ho TT, Berger T, Rubin EM, Forte TM. Paraonase 1 overexpression in mice and its effect on high-density lipoproteins. *Biochem.Biophys.Res.Commun* 2002;290:921-27.
235. Fuhrman B, Volkova N, Aviram M. Oxidative stress increases the expression of the CD36 scavenger receptor and the cellular uptake of oxidized low-density lipoprotein in macrophages from

- atherosclerotic mice: protective role of antioxidants and of paraoxonase. *Atherosclerosis* 2002;161:307-16.
236. Aviram M, Hardak E, Vaya J, Mahmood S, Milo S, Hoffman A *et al.* Human Serum Paraoxonases (PON1) Q and R Selectively Decrease Lipid Peroxides in Human Coronary and Carotid Atherosclerotic Lesions : PON1 Esterase and Peroxidase-Like Activities. *Circulation* 2000;101:2510-17.
237. Kuo CL, La Du BN. Comparison of purified human and rabbit serum paraoxonases. *Drug Metab Dispos* 1995;23:935-44.
238. Sorenson RC, Bisgaier CL, Aviram M, Hsu C, Billecke S, La Du BN. Human serum Paraoxonase/Arylesterase's retained hydrophobic N-terminal leader sequence associates with HDLs by binding phospholipids : apolipoprotein A-I stabilizes activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:2214-25.
239. Mackness MI, Arrol S, Mackness B, Durrington PN. Alloenzymes of paraoxonase and effectiveness of high-density lipoproteins in protecting low-density lipoprotein against lipid peroxidation [letter]. *Lancet* 1997;349:851-52.
240. Eckerson HW, Romson J, Wyte C, La Du BN. The human serum paraoxonase polymorphism: identification of phenotypes by their response to salts. *Am J Hum Genet* 1983;35:214-27.
241. Augustinsson KB, Ekedahl G. On the specificity of arylesterases. *Acta Med Scand* 1962;16:240-48.
242. Mackness B, Durrington PN, Abuashia B, Boulton AJ, Mackness MI. Low paraoxonase activity in type II diabetes mellitus complicated by retinopathy. *Clin Sci (Colch)* 2000;98:355-63.
243. Furlong CE, Cole TB, Jarvik GP, Costa LG. Pharmacogenomic considerations of the paraoxonase polymorphisms. *Pharmacogenomics* 2002;3:341-48.
244. Mackness B, Davies GK, Turkie W, Lee E, Roberts DH, Hill E *et al.* Paraoxonase status in coronary heart disease: are activity and concentration more important than genotype? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:1451-57.
245. Pati N, Pati U. Paraoxonase gene polymorphism and coronary artery disease in Indian subjects. *Int J Cardiol* 1998;66:165-68.
246. Hasselwander O, Savage DA, McMaster D, Loughrey CM, McNamee PT, Middleton D *et al.* Paraoxonase polymorphisms are not associated with cardiovascular risk in renal transplant recipient. *Kidney International* 1999;56:289-98.
247. Brophy VH, Jarvik GP, Richter RJ, Rozek LS, Schellenberg GD, Furlong CE. Analysis of paraoxonase (PON1) L55M status requires both genotype and phenotype. *Pharmacogenetics* 2000;10:453-60.
248. Karakaya A, Ibis S, Kural T, Kose SK, Karakaya AE. Serum paraoxonase activity and phenotype distribution in Turkish subjects with coronary heart disease and its relationship to serum lipids and lipoproteins. *Chem Biol Interact* 1999;118:193-200.

249. Jarvik GP, Rozek LS, Brophy VH, Hatsukami TS, Richter RJ, Schellenberg GD *et al.* Paraoxonase (PON1) phenotype is a better predictor of vascular disease than is PON1(192) or PON1(55) genotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:2441-47.
250. Ruiz J, Blanche H, James RW, Garin MC, Vaisse C, Charpentier G *et al.* Gln-Arg192 polymorphism of paraoxonase and coronary heart disease in type 2 diabetes. *Lancet* 1995;346:869-72.
251. Sanghera DK, Saha N, Aston CE, Kamboh MI. Genetic polymorphism of paraoxonase and the risk of coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:1067-73.
252. Zama T, Murata M, Matsubara Y, Kawano K, Aoki N, Yoshino H *et al.* A 192Arg variant of the human paraoxonase (HUMPONA) gene polymorphism is associated with an increased risk for coronary artery disease in the Japanese. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:3565-69.
253. Imai Y, Morita H, Kurihara H, Sugiyama T, Kato N, Ebihara A *et al.* Evidence for association between paraoxonase gene polymorphisms and atherosclerotic diseases. *Atherosclerosis* 2000;149:435-42.
254. Serrato M, Marian AJ. A variant of human paraoxonase/arylesterase (HUMPONA) gene is a risk factor for coronary artery disease. *J Clin Invest* 1995;96:3005-08.
255. Sen-Banerjee S, Siles X, Campos H. Tobacco smoking modifies association between Gln-Arg192 polymorphism of human paraoxonase gene and risk of myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:2120-26.
256. Suehiro T, Nakauchi Y, Yamamoto M, Arai K, Itoh H, Hamashige N *et al.* Paraoxonase gene polymorphism in Japanese subjects with coronary heart disease. *Int J Cardiol* 1996;57:69-73.
257. Ko YL, Ko YS, Wang SM, Hsu LA, Chang CJ, Chu PH *et al.* The Gln-Arg 191 polymorphism of the human paraoxonase gene is not associated with the risk of coronary artery disease among Chinese in Taiwan. *Atherosclerosis* 1998;141:259-64.
258. Aynacioglu AS, Kepekci Y. The human paraoxonase Gln-Arg192 (Q/R) polymorphism in Turkish patients with coronary artery disease. *Int.J Cardiol* 2000;74:33-37.
259. Herrmann SM, Blanc H, Poirier O, Arveiler D, Luc G, Evans A *et al.* The Gln/Arg polymorphism of human paraoxonase (PON 192) is not related to myocardial infarction in the ECTIM Study. *Atherosclerosis* 1996;126:299-303.
260. Antikainen M, Murtomaki S, Syvanne M, Pahlman R, Tahvanainen E, Jauhiainen M *et al.* The Gln-Arg191 polymorphism of the human paraoxonase gene (HUMPONA) is not associated with the risk of coronary artery disease in Finns. *J Clin Invest* 1996;98:883-85.
261. Gnasso A, Motti C, Irace C, Di G, I, Pujia A, Leto E *et al.* The Arg allele in position 192 of PON1 is associated with carotid atherosclerosis in subjects with elevated HDLs. *Atherosclerosis* 2002;164:289.
262. Rice GI, Ossei-Gerning N, Stickland MH, Grant PJ. The paraoxonase Gln-Arg 192 polymorphism in subjects with ischaemic heart disease. *Coron Artery Dis* 1997;8:677-82.

263. Koch M, Hering S, Barth C, Ehren M, Enderle MD, Pfohl M. Paraoxonase 1 192 Gln/Arg gene polymorphism and cerebrovascular disease: interaction with type 2 diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2001;109:141-45.
264. Heijmans BT, Westendorp RG, Lagaay AM, Knook DL, Kluff C, Slagboom PE. Common paraoxonase gene variants, mortality risk and fatal cardiovascular events in elderly subjects. *Atherosclerosis* 2000;149:91-97.
265. Turban S, Fuentes F, Ferlic L, Brugada R, Gotto AM, Ballantyne CM *et al.* A prospective study of paraoxonase gene Q/R192 polymorphism and severity, progression and regression of coronary atherosclerosis, plasma lipid levels, clinical events and response to fluvastatin. *Atherosclerosis* 2001;154:633-40.
266. Pfohl M, Koch M, Enderle MD, Kühn R, Füllhase J, Karsch KR *et al.* Paraoxonase 192 Gln/Arg gene polymorphism, coronary artery disease, and myocardial infarction in type 2 diabetes. *Diabetes* 1999;48:623-27.
267. Odawara M, Tachi Y, Yamashita K. Paraoxonase polymorphism (Gln 192-Arg) is associated with coronary heart disease in Japanese noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:2257-60.
268. Gardemann A, Philipp M, Hess K, Katz N, Tillmanns H, Haberbosch W. The paraoxonase leu-Met54 and gln-Arg191 gene polymorphisms are not associated with the risk of coronary heart disease. *Atherosclerosis* 2000;152:421-31.
269. Aubo C, Senti M, Marrugat J, Tomas M, Vila J, Sala J *et al.* Risk of myocardial infarction associated with Gln/Arg 192 polymorphism in the human paraoxonase gene and diabetes mellitus. The REGICOR Investigators. *Eur Heart J* 2000;21:33-38.
270. Ombres D, Pannitteri G, Montali A, Candeloro A, Seccareccia F, Campagna F *et al.* The gln-Arg192 polymorphism of human paraoxonase gene is not associated with coronary artery disease in Italian patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:1611-16.
271. Senti M, Aubo C, Tomas M. Differential effects of smoking on myocardial infarction risk according to the Gln/Arg 192 variants of the human paraoxonase gene. *Metabolism* 2000;49:557-59.
272. Senti M, Tomas M, Vila J, Marrugat J, Elosua R, Sala J *et al.* Relationship of age-related myocardial infarction risk and Gln/Arg 192 variants of the human paraoxonase1 gene: the REGICOR study. *Atherosclerosis* 2001;156:443-49.
273. Senti M, Tomas M, Marrugat J, Elosua R. Paraoxonase1-192 polymorphism modulates the nonfatal myocardial infarction risk associated with decreased HDLs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:415-20.
274. Zuliani G, Cherubini A, Volpato S, Palmieri E, Mecocci P, De Rango P *et al.* Genetic factors associated with the absence of atherosclerosis in octogenarians. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2002;57:M611-M615.



275. Voetsch B, Benke KS, Damasceno BP, Siqueira LH, Loscalzo J. Paraoxonase 192 Gln-->Arg polymorphism: an independent risk factor for nonfatal arterial ischemic stroke among young adults. *Stroke* 2002;33:1459-64.
276. Salonen JT, Malin R, Tuomainen TP, Nyyssonen K, Lakka TA, Lehtimäki T. Polymorphism in high density lipoprotein paraoxonase gene and risk of acute myocardial infarction in men: prospective rested case-control study. *Br Med J* 1999;319:487-89.
277. Schmidt R, Schmidt H, Fazekas F, Kapeller P, Roob G, Lechner A *et al.* MRI cerebral white matter lesions and paraoxonase PON1 polymorphisms : three-year follow-up of the austrian stroke prevention study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:1811-16.
278. Schmidt H, Schmidt R, Niederkorn K, Gradert A, Schumacher M, Watzinger N *et al.* Paraoxonase PON1 polymorphism leu-Met54 is associated with carotid atherosclerosis: results of the Austrian Stroke Prevention Study. *Stroke* 1998;29:2043-48.
279. Sanghera DK, Saha N, Kamboh MI. The codon 55 polymorphism in the paraoxonase 1 gene is not associated with the risk of coronary heart disease in Asian Indians and Chinese. *Atherosclerosis* 1998;136:217-23.
280. Arca M, Ombres D, Montali A, Campagna F, Mangieri E, Tanzilli G *et al.* PON1 L55M polymorphism is not a predictor of coronary atherosclerosis either alone or in combination with Q192R polymorphism in an Italian population. *Eur J Clin Invest* 2002;32:9-15.
281. Deakin S, Leviev I, Nicaud V, Brulhart Meynet MC, Tiret L, James RW. Paraoxonase-1 L55M polymorphism is associated with an abnormal oral glucose tolerance test and differentiates high risk coronary disease families. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:1268-73.
282. Leviev I, Poirier O, Nicaud V, Evans A, Kee F, Arveiler D *et al.* High expressor paraoxonase PON1 gene promoter polymorphisms are associated with reduced risk of vascular disease in younger coronary patients. *Atherosclerosis* 2002;161:463-67.
283. Rubiés-Prat, J. Temas actuales. Hiperlipidemias y arteriosclerosis. Publicaciones Médicas. 1992. Barcelona, Espaxs, S.A.  
Ref Type: Serial (Book,Monograph)
284. Alteraciones de los lípidos y lipoproteínas en Primer de Cardiología preventiva. American Heart Association SM. 1996. Pfizer.  
Ref Type: Serial (Book,Monograph)
285. Prevención primaria de las enfermedades cardiovasculares en control de la colesterolemia en España, 2000. Un instrumento para la prevención cardiovascular. Ministerio de Sanidad y Consumo. 2000.  
Ref Type: Serial (Book,Monograph)
286. Sun XM, Patel DD, Knight BL, Soutar AK. Influence of genotype at the low density lipoprotein(LDL) receptor gene locus on the clinical phenotype and response to lipid-lowering drug therapy in heterozygous familial hypercholesterolaemia, The Familial Hypercholesterolaemia Regression Study Group. *Atherosclerosis* 1998;136:175-85.

287. Boullier A, Hennuyer N, Tailleux A, Furman C, Duverger N, Caillaud JM *et al.* Increased levels of high-density lipoprotein cholesterol are ineffective in inhibiting the development of immune responses to oxidized low-density lipoprotein and atherosclerosis in transgenic rabbits expressing human apolipoprotein (apo) A-I with severe hypercholesterolaemia. *Clin Sci (Lond)* 2001;100:343-55.
288. Nevin DN, Zambon A, Furlong CE, Richter RJ, Humbert R, Hokanson JE *et al.* Paraoxonase genotypes, lipoprotein lipase activity, and HDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:1243-49.
289. Hegele RA, Brunt JH, Connelly PW. A polymorphism of the paraoxonase gene associated with variation in plasma lipoproteins in a genetic isolate. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:89-95.
290. Senti M, Aubo C, Elosua R, Sala J, Tomas M, Marrugat J. Effect of physical activity on lipid levels in a population-based sample of men with and without the Arg192 variant of the human paraoxonase gene. *Genet Epidemiol* 2000;18:276-86.
291. Leus FR, Wittekoek ME, Prins J, Kastelein JJ, Voorbij HA. Paraoxonase gene polymorphisms are associated with carotid arterial wall thickness in subjects with familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 2000;149:371-77.
292. Paolisso G, Manzella D, Tagliamonte MR, Barbieri M, Marfella R, Zito G *et al.* The BB-Paraoxonase Genotype Is Associated with Impaired Brachial Reactivity after Acute Hypertriglyceridemia in Healthy Subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:1078-82.
293. Girona J, La Ville AE, Sola R, Plana N, Masana L. Simvastatin decreases aldehyde production derived from lipoprotein oxidation. *Am J Cardiol* 1999;83:846-51.
294. Tvorogova MG, Susekov AV, Semenova OA, Kukharchuk VV, Titov VN. [Variability of the hypolipidemic action of simvastatin and fluvastatin in patients with primary hyperlipoproteinemia]. *Ter Arkh* 1998;70:8-13.
295. MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20,536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2002;360:7-22.
296. Pedersen TR, Olsson AG, Faergeman O, Kjekshus J, Wedel H, Berg K *et al.* Lipoprotein changes and reduction in the incidence of major coronary heart disease events in the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Circulation* 1998;97:1453-60.
297. Lagrost L, Athias A, Lemort N, Richard JL, Desrumaux C, Chatenet-Duchene L *et al.* Plasma lipoprotein distribution and lipid transfer activities in patients with type IIb hyperlipidemia treated with simvastatin. *Atherosclerosis* 1999;143:415-25.
298. MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol-lowering therapy and of antioxidant vitamin supplementation in a wide range of patients at increased risk of coronary heart disease death: early safety and efficacy experience. *Eur Heart J* 1999;20:725-41.
299. Ntanios FY, Jones PJ, Frohlich JJ. Effect of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor on sterol absorption in hypercholesterolemic subjects. *Metabolism* 1999;48:68-73.

300. Kwak B, Mulhaupt F, Veillard N, Pelli G, Mach F. The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin inhibits IFN-gamma induced MHC class II expression in human vascular endothelial cells. *Swiss Med Wkly* 2001;131:41-46.
301. Cipollone F, Prontera C, Pini B, Marini M, Fazio M, De Cesare D *et al.* Overexpression of functionally coupled cyclooxygenase-2 and prostaglandin E synthase in symptomatic atherosclerotic plaques as a basis of prostaglandin E(2)-dependent plaque instability. *Circulation* 2001;104:921-27.
302. Inoue I, Goto S, Mizotani K, Awata T, Mastunaga T, Kawai S *et al.* Lipophilic HMG-CoA reductase inhibitor has an anti-inflammatory effect: reduction of mRNA levels for interleukin-1beta, interleukin-6, cyclooxygenase-2, and p22phox by regulation of peroxisome proliferator- activated receptor alpha (PPARalpha) in primary endothelial cells. *Life Sci* 2000;67:863-76.
303. Influence of pravastatin and plasma lipids on clinical events in the West of Scotland Coronary Prevention Study (WOSCOPS). *Circulation* 1998;97:1440-45.
304. Downs JR, Clearfield M, Weis S, Whitney E, Shapiro DR, Beere PA *et al.* Primary prevention of acute coronary events with lovastatin in men and women with average cholesterol levels: results of AFCAPS/TexCAPS. Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study. *JAMA* 1998;279:1615-22.
305. Pedersen TR. Statin trials and goals of cholesterol-lowering therapy after AMI. *Am Heart J* 1999;138:S177-S182.
306. Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL, Newton RS. Atorvastatin and gemfibrozil metabolites but not the parent drugs, are potent antioxidants against lipoprotein oxidation. *Atherosclerosis* 1998;138:271-80.
307. Leviev, I., James, R, and . Simvastatin increases plasma levels of the antioxidants enzyme paraoxonase by *PON1* gene activation. *Atherosclerosis special issue* **151(1)**, **41**. 2000. Ref Type: Abstract
308. Jarvik GP, Tsai NT, McKinstry LA, Wani R, Brophy VH, Richter RJ *et al.* Vitamin C and E intake is associated with increased paraoxonase activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:1329-33.
309. Malin R, Laaksonen R, Knuuti J, Janatuinen T, Vesalainen R, Nuutila P *et al.* Paraoxonase genotype modifies the effect of pravastatin on high-density lipoprotein cholesterol. *Pharmacogenetics* 2001;11:625-33.
310. Turay J, Gniakova V, Valka J. Changes in paraoxonase and apolipoprotein A-I, B, C-III and E in subjects with combined familiar hyperlipoproteinemia treated with ciprofibrate. *Drugs Exp Clin Res* 2000;26:83-88.
311. Elisaf M. Effects of fibrates on serum metabolic parameters. *Curr Med Res Opin* 2002;18:269-76.
312. Paragh G, Balogh Z, Seres I, Harangi M, Boda J, Kovacs P. Effect of gemfibrozil on HDL-Associated serum paraoxonase activity and lipoprotein profile in patients with hyperlipidaemia. *Clinical Drug Investigation* 2000;19:277-82.

313. Balogh Z, Seres I, Harangi M, Kovacs P, Kakuk G, Paragh G. Gemfibrozil increases paraoxonase activity in type 2 diabetic patients. A new hypothesis of the beneficial action of fibrates? *Diabetes Metab* 2001;27:604-10.
314. Durrington PN, Mackness MI, Bhatnagar D, Julier K, Prais H, Arrol S *et al.* Effects of two different fibric acid derivatives on lipoproteins, cholesteryl ester transfer, fibrinogen, plasminogen activator inhibitor and paraoxonase activity in type IIb hyperlipoproteinaemia. *Atherosclerosis* 1998;138:217-25.
315. Malin R, Rantalaiho V, Huang XH, Wirta O, Pasternack A, Leinonen JS *et al.* Association between M/L55-polymorphism of paraoxonase enzyme and oxidative DNA damage in patients with type 2 diabetes mellitus and in control subjects. *Hum Genet* 1999;105:179-80.
316. Syvanne M, Ahola M, Lahdenpera S, Kahri J, Kuusi T, Virtanen KS *et al.* High density lipoprotein subfractions in non-insulin-dependent diabetes mellitus and coronary artery disease. *J Lipid Res* 1995;36:573-82.
317. Tkac I, Kimball BP, Lewis G, Uffelman K, Steiner G. The severity of coronary atherosclerosis in type 2 diabetes mellitus is related to the number of circulating triglyceride-rich lipoprotein particles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:3633-38.
318. Hedrick CC, Thorpe SR, Fu MX, Harper CM, Yoo J, Kim SM *et al.* Glycation impairs high-density lipoprotein function. *Diabetologia* 2000;43:312-20.
319. Ikeda Y, Suehiro T, Inoue M, Nakauchi Y, Morita T, Arai K *et al.* Serum Paraoxonase Activity and Its Relationship to Diabetic Complications in Patients With Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *Metabolism* 1998;47:598-602.
320. Abbott CA, Mackness MI, Kumar S, Boulton AJ, Durrington PN. Serum paraoxonase activity, concentration, and phenotype distribution in diabetes mellitus and its relationship to serum lipids and lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:1812-18.
321. Sakai T, Matsuura B, Onji M. Serum Paraoxonase activity and Genotype Distribution in Japanese Patients with Diabetes Mellitus. *Internal Medicine* 1998;37:581-84.
322. Mackness B, Durrington PN, Boulton AJ, Hine D, Mackness MI. Serum paraoxonase activity in patients with type 1 diabetes compared to healthy controls. *Eur J Clin Invest* 2002;32:259-64.
323. Kao Y, Donaghue K, Chan A, Knight J, Silink M. A variant of Paraoxonase (PON1) Gene is associated with diabetic retinopathy in IDDM. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:2589-92.
324. Barbieri M, Bonafe M, Marfella R, Ragno E, Giugliano D, Franceschi C *et al.* LL-paraoxonase genotype is associated with a more severe degree of homeostasis model assessment IR in healthy subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:222-25.
325. Furlong CE. PON1 status and neurologic symptom complexes in Gulf War veterans. *Genome Res* 2000;10:153-55.
326. Cherry N, Mackness M, Durrington P, Povey A, Dippnall M, Smith T *et al.* Paraoxonase (PON1) polymorphisms in farmers attributing ill health to sheep dip. *Lancet* 2002;359:763-64.

327. Mackness B, Durrington PN, Mackness MI. Low paraoxonase in Persian Gulf War Veterans self-reporting Gulf War Syndrome. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;276:729-33.
328. Paragh G, Balla P, Katona E, Seres I, Egerhazi A, Degrell I. Serum paraoxonase activity changes in patients with Alzheimer's disease and vascular dementia. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2002;252:63-67.
329. Haley RW, Billecke S, La Du BN. Association of low PON1 type Q (type A) arylesterase activity with neurologic symptom complexes in Gulf War veterans. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999;157:227-33.
330. Kondo I, Yamamoto M. Genetic polymorphism of paraoxonase 1 (PON1) and susceptibility to Parkinson's disease. *Brain Res* 1998;806:271-73.
331. Akhmedova S, Anisimov S, Yakimovsky A, Schwartz E. Gln --> Arg 191 polymorphism of paraoxonase and Parkinson's disease. *Hum Hered* 1999;49:178-80.
332. Carmine A, Buervenich S, Sydow O, Anvret M, Olson L. Further evidence for an association of the Paraoxonase 1 (PON1) Met-54 allele with Parkinson's disease. *Mov Disord* 2002;17:764-66.
333. Akhmedova SN, Yakimovsky AK, Schwartz EI. Paraoxonase 1 Met-Leu 54 polymorphism is associated with Parkinson's disease. *J Neurol Sci* 2001;184:179-82.
334. Wang J, Liu Z. No association between paraoxonase 1 (PON1) gene polymorphisms and susceptibility to Parkinson's disease in a Chinese population. *Mov Disord* 2000;15:1265-67.
335. Taylor MC, Le Couteur DG, Mellick GD, Board PG. Paraoxonase polymorphisms, pesticide exposure and Parkinson's disease in a Caucasian population. *J Neural Transm* 2000;107:979-83.
336. Zuliani G, Ble' A, Zanca R, Munari MR, Zurlo A, Vavalle C *et al.* Genetic polymorphisms in older subjects with vascular or Alzheimer's dementia. *Acta Neurol Scand* 2001;103:304-08.
337. Sodeyama N, Yamada M, Itoh Y, Suematsu N, Matsushita M, Otomo E *et al.* No association of paraoxonase gene polymorphism with atherosclerosis or Alzheimer's disease. *Neurology* 1999;53:1146-48.
338. Trznadel K, Pawlicki L, Kedziora J, Luciak M, Blaszczyk J, Buczynski A. Superoxide anion generation, erythrocytes superoxide dismutase activity, and lipid peroxidation during hemoperfusion and hemodialysis in chronic uremic patients. *Free Radic Biol Med* 1989;6:393-97.
339. Ak G, Ozgonul M, Sozmen EY, Aslan SL, Sozmen B. Renal cortical thickness and PON1 activity both decrease in chronic renal failure. *J Nephrol* 2002;15:144-49.
340. Itahara T, Suehiro T, Ikeda Y, Inoue M, Nakamura T, Kumon Y *et al.* Serum paraoxonase and arylesterase activities in hemodialysis patients. *J Atheroscler Thromb* 2000;7:152-58.
341. Schiavon R, Battaglia P, De Fanti E, Fasolin A, Biasioli S, Targa L *et al.* HDL3-related decreased serum paraoxonase (PON) activity in uremic patients: comparison with the PON1 allele polymorphism. *Clin Chim Acta* 2002;324:39.
342. Schiavon R, De Fanti E, Giavarina D, Biasioli S, Cavalcanti G, Guidi G. Serum paraoxonase activity is decreased in uremic patients. *Clin Chim Acta* 1996;247:71-80.

343. Juretic D, Tadijanovic M, Rekcic B, Simeon-Rudolf V, Reiner E, Baricic M. Serum paraoxonase activities in hemodialyzed uremic patients: cohort study. *Croat Med J* 2001;42:146-50.
344. Dantoine TF, Debord J, Charmes JP, Merle L, Marquet P, Lachatre G *et al.* Decrease of serum paraoxonase activity in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol* 1998;9:2082-88.
345. Powell KE, Thompson PD, Caspersen CJ, Kendrick JS. Physical activity and the incidence of coronary heart disease. *Annu Rev Public Health* 1987;8:253-87.
346. Bijnen FC, Caspersen CJ, Mosterd WL. Physical inactivity as a risk factor for coronary heart disease: a WHO and International Society and Federation of Cardiology position statement. *Bull World Health Organ* 1994;72:1-4.
347. Marrugat J, Elosua R, Covas MI, Molina L, Rubies-Prat J. Amount and intensity of physical activity, physical fitness, and serum lipids in men. The MARATHOM Investigators. *Am J Epidemiol* 1996;143:562-69.
348. Physical activity, physical fitness and hypertension. *Med Sci Sports Exerc* 1993;25:i-x.
349. Helmrich SP, Ragland DR, Leung RW, Paffenbarger RS. Physical activity and reduced occurrence of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1991;325:147-52.
350. Ekelund LG, Haskell WL, Johnson JL, Whaley FS, Criqui MH, Sheps DS. Physical fitness as a predictor of cardiovascular mortality in asymptomatic North American men. The Lipid Research Clinics Mortality Follow-up Study. *N Engl J Med* 1988;319:1379-84.
351. Sen CK. Oxidants and antioxidants in exercise. *J Appl Physiol* 1995;79:675-86.
352. Clarkson PM. Antioxidants and physical performance. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1995;35:131-41.
353. Brites FD, Evelson PA, Christiansen MG, Nicol MF, Basilico MJ, Wikinski RW *et al.* Soccer players under regular training show oxidative stress but an improved plasma antioxidant status. *Clin Sci (Colch)* 1999;96:381-85.
354. Brites, F., Travacio, M., Gambino, G., Verona, J., Llesuy, S., and Wikinski, R. Regular exercise improves lipid and antioxidant profile. *Atherosclerosis* 151(1), 261. 2000. Ref Type: Abstract
355. Alessio HM, Blasi ER. Physical activity as a natural antioxidant booster and its effect on a healthy life span. *Res Q Exerc Sport* 1997;68:292-302.
356. Alessio HM, Goldfarb AH. Lipid peroxidation and scavenger enzymes during exercise: adaptive response to training. *J Appl Physiol* 1988;64:1333-36.
357. Venditti P, Di Meo S. Effect of training on antioxidant capacity, tissue damage, and endurance of adult male rats. *Int J Sports Med* 1997;18:497-502.
358. Ohkuwa T, Sato Y, Naoi M. Glutathione status and reactive oxygen generation in tissues of young and old exercised rats. *Acta Physiol Scand* 1997;159:237-44.

359. Pawlowska D, Moniuszko-Jakoniuk J, Soltys M. The effect of chronic physical exercise on the activity of hydrolytic enzymes in acute poisoning with parathion-methyl in rats. *Pol J Pharmacol Pharm* 1985;37:639-46.
360. Pawlowska D, Moniuszko-Jakoniuk J, Soltys M. Parathion-methyl effect on the activity of hydrolytic enzymes after single physical exercise in rats. *Pol J Pharmacol Pharm* 1985;37:629-38.
361. Benitez S, Sanchez-Quesada JL, Lucero L, Arcelus R, Ribas V, Jorba O *et al.* Changes in low-density lipoprotein electronegativity and oxidizability after aerobic exercise are related to the increase in associated non- esterified fatty acids. *Atherosclerosis* 2002;160:223-32.
362. Artaud-Wild SM, Connor SL, Sexton G, Connor WE. Differences in coronary mortality can be explained by differences in cholesterol and saturated fat intakes in 40 countries but not in France and Finland. A paradox. *Circulation* 1993;88:2771-79.
363. Richard JL. [Coronary risk factors. The French paradox]. *Arch Mal Coeur Vaiss* 1987;80 Spec No:17-21.
364. Keys A. A multivariate analysis of diet and coronary heart disease. Cambridge, London: Harvard University Press; 1980. p. 67.
365. Fidanza F, Puddu V, Imbimbo AB, Menotti A, Keys A. Coronary heart disease in seven countries. VII. Five-year experience in rural Italy. *Circulation* 1970;41:163-175.
366. Aravanis C, Corcondilas A, Dontas AS, Lekos D, Keys A. Coronary heart disease in seven countries. IX. The Greek islands of Crete and Corfu. *Circulation* 1970;41:188-100.
367. Buzina R, Keys A, Mohacek I, Marinkovic M, Hahn A, Blackburn H. Coronary heart disease in seven countries. V. Five-year follow-up in Dalmatia and Slavonia. *Circulation* 1970;41:140-151.
368. Taylor HL, Blackburn H, Keys A, Parlin RW, Vasquez C, Puchner T. Coronary heart disease in seven countries. IV. Five-year follow-up of employees of selected U.S. railroad companies. *Circulation* 1970;41:120-139.
369. Blackburn H, Taylor HL, Keys A. Coronary heart disease in seven countries. XVI. The electrocardiogram in prediction of five-year coronary heart disease incidence among men aged forty through fifty-nine. *Circulation* 1970;41:1154-1161.
370. Taylor HL, Menotti A, Puddu V, Monti M, Keys A. Coronary heart disease in seven countries. XI. Five years of follow-up of railroad men in Italy. *Circulation* 1970;41:1113-1122.
371. Kimura N, Keys A. Coronary heart disease in seven countries. X. Rural southern Japan. *Circulation* 1970;41:1101-1112.
372. Kris-Etherton PM. Monounsaturated fatty acids and risk of cardiovascular disease. *Circulation* 1999;100:1253-58.
373. Lairon D. Dietary fatty acids and arteriosclerosis. *Biomed Pharmacother* 1997;51:333-36.
374. Nordoy A, Goodnight SH. Dietary lipids and thrombosis. Relationships to atherosclerosis. *Arteriosclerosis* 1990;10:149-63.

375. Lahoz C, Alonso R, Ordovas JM, Lopez-Farre A, de Oya M, Mata P. Effects of dietary fat saturation on eicosanoid production, platelet aggregation and blood pressure. *Eur J Clin Invest* 1997;27:780-87.
376. Kozima Y, Urano T, Serizawa K, Takada Y, Takada A. Impaired fibrinolytic activity induced by ingestion of butter: effect of increased plasma lipids on the fibrinolytic activity. *Thromb Res* 1993;70:191-202.
377. Grundy SM, Denke MA. Dietary influences on serum lipids and lipoproteins. *J Lipid Res* 1990;31:1149-72.
378. Kesteloot, H. and Joossens, J. V. Nutrition and international patterns of disease. Marmot, M. and Elliot, P. 369-382. 1995. Oxford, Oxford University Press. Coronary heart disease epidemiology. From etiology to Public Health. Ref Type: Serial (Book, Monograph)
379. Riemersma RA, Wood DA, Butler S, Elton RA, Oliver M, Salo M *et al.* Linoleic acid content in adipose tissue and coronary heart disease. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1986;292:1423-27.
380. Mata P, Garrido JA, Ordovas JM, Blazquez E, Alvarez-Sala LA, Rubio MJ *et al.* Effect of dietary monounsaturated fatty acids on plasma lipoproteins and apolipoproteins in women. *Am J Clin Nutr* 1992;56:77-83.
381. Grundy SM. Comparison of monounsaturated fatty acids and carbohydrates for lowering plasma cholesterol. *N Engl J Med* 1986;314:745-48.
382. Keys A, Menotti A, Karvonen MJ, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R *et al.* The diet and 15-year death rate in the seven countries study. *Am J Epidemiol* 1986;124:903-15.
383. Carluccio MA, Massaro M, Bonfrate C, Siculella L, Maffia M, Nicolardi G *et al.* Oleic acid inhibits endothelial activation : A direct vascular antiatherogenic mechanism of a nutritional component in the mediterranean diet. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:220-28.
384. Tsimikas S, Philis-Tsimikas A, Alexopoulos S, Sigari F, Lee C, Reaven PD. LDL isolated from Greek subjects on a typical diet or from American subjects on an oleate-supplemented diet induces less monocyte chemotaxis and adhesion when exposed to oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:122-30.
385. Mata P, Varela O, Alonso R, Lahoz C, de Oya M, Badimon L. Monounsaturated and polyunsaturated n-6 fatty acid-enriched diets modify LDL oxidation and decrease human coronary smooth muscle cell DNA synthesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:2088-95.
386. Reaven P, Parthasarathy S, Grasse BJ, Miller E, Steinberg D, Witztum JL. Effects of oleate-rich and linoleate-rich diets on the susceptibility of low density lipoprotein to oxidative modification in mildly hypercholesterolemic subjects. *J Clin Invest* 1993;91:668-76.
387. Bonanome A, Pagnan A, Biffanti S, Opportuno A, Sorgato F, Dorella M *et al.* Effect of dietary monounsaturated and polyunsaturated fatty acids on the susceptibility of plasma low density lipoproteins to oxidative modification. *Arterioscler Thromb* 1992;12:529-33.



388. Sola R, La Ville AE, Richard JL, Motta C, Bargallo MT, Girona J *et al.* Oleic acid rich diet protects against the oxidative modification of high density lipoprotein. *Free Radic Biol Med* 1997;22:1037-45.
389. Sanchez-Muniz FJ, Cuesta C, Garrido-Polonio MC. Evaluation of a sunflower oil used for frying by different analytical indexes and column and gas chromatography. *Z. Ernährungswiss* 1994;33:16-23.
390. Myers SJ, Harris ND. Effect of electronic cooking on fatty acids in meats. *J Am Diet Assoc* 1975;67:232-34.
391. D'Archivio, M., Vari, R., Giovannini, C., Matarrese, P., Scazzocchio, B., Maialetti, F., and Masella, R. Phenolic compounds contained in extra-virgin olive oil inhibit macrophage-mediated oxidation of LDL: effects of intracellular redox balance. *Atherosclerosis* 2(suppl 2), 114. 2001. Ref Type: Abstract
392. Wiseman SA, Mathot JN, de Fouw NJ, Tijburg LB. Dietary non-tocopherol antioxidants present in extra virgin olive oil increase the resistance of low density lipoproteins to oxidation in rabbits. *Atherosclerosis* 1996;120:15-23.
393. Arrol S, Mackness MI, Durrington PN. Vitamin E supplementation increases the resistance of both LDL and HDL to oxidation and increases cholesteryl ester transfer activity. *Atherosclerosis* 2000;150:129-34.
394. Yusuf S, Dagenais G, Pogue J, Bosch J, Sleight P. Vitamin E supplementation and cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 2000;342:154-60.
395. Collins R, Peto R, Armitage J. The MRC/BHF Heart Protection Study: preliminary results. *Int J Clin Pract* 2002;56:53-56.
396. Meyer DF, Mayans MO, Groot PH, Suckling KE, Bruckdorfer KR, Perkins SJ. Time-course studies by neutron solution scattering and biochemical assays of the aggregation of human low-density lipoprotein during Cu(2+)-induced oxidation. *Biochem J* 1995;310 ( Pt 2):417-26.
397. Lavy A, Fuhrman B, Markel A, Dankner G, Ben Amotz A, Presser D *et al.* Effect of dietary supplementation of red or white wine on human blood chemistry, hematology and coagulation: favorable effect of red wine on plasma high-density lipoprotein. *Ann Nutr Metab* 1994;38:287-94.
398. Vaya J, Belinky PA, Aviram M. Antioxidant constituents from licorice roots: isolation, structure elucidation and antioxidative capacity toward LDL oxidation. *Free Radic Biol Med* 1997;23:302-13.
399. Rantala M, Silaste ML, Tuominen A, Kaikkonen J, Salonen JT, Alfthan G *et al.* Dietary modifications and gene polymorphisms alter serum paraoxonase activity in healthy women. *J Nutr* 2002;132:3012-17.
400. Mackness M, Boullier A, Hennuyer N, Mackness B, Hall M, Tailleux A *et al.* Paraonase activity is reduced by a pro-atherosclerotic diet in rabbits. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;269:232-36.

401. Wallace AJ, Sutherland WH, Mann JI, Williams SM. The effect of meals rich in thermally stressed olive and safflower oils on postprandial serum paraoxonase activity in patients with diabetes. *Eur J Clin Nutr* 2001;55:951-58.
402. De Roos, N. M., Schouten, E. G., Scheeek, L. M., van Tol, A., and Katan, M. B. Replacement of dietary saturated fat with trans fat reduces serum paraoxonase activity in healthy men and women. *Atherosclerosis* 2(suppl 2), 114. 2001.  
Ref Type: Abstract
403. Sutherland WH, Walker RJ, de Jong SA, van Rij AM, Phillips V, Walker HL. Reduced postprandial serum paraoxonase activity after a meal rich in used cooking fat. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:1340-47.
404. Aviram M, Dornfeld L, Rosenblat M, Volkova N, Kaplan M, Coleman R *et al.* Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and platelet aggregation: studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice [In Process Citation]. *Am J Clin Nutr* 2000;71:1062-76.
405. Kleemola P, Freese R, Jauhiainen M, Pahlman R, Alfthan G, Mutanen M. Dietary determinants of serum paraoxonase activity in healthy humans. *Atherosclerosis* 2002;160:425-32.
406. van der Gaag MS, van Tol A, Scheek LM, James RW, Urgert R, Schaafsma G *et al.* Daily moderate alcohol consumption increases serum paraoxonase activity; a diet-controlled, randomised intervention study in middle- aged men. *Atherosclerosis* 1999;147:405-10.
407. Hayek T, Fuhrman B, Vaya J, Rosenblat M, Belinky P, Coleman R *et al.* Reduced progression of atherosclerosis in apolipoprotein E- deficient mice following consumption of red wine, or its polyphenols quercetin or catechin, is associated with reduced susceptibility of LDL to oxidation and aggregation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:2744-52.
408. Mata P, Lopez-Miranda J, Pocovi M, Alonso R, Lahoz C, Marin C *et al.* Human apolipoprotein A-I gene promoter mutation influences plasma low density lipoprotein cholesterol response to dietary fat saturation. *Atherosclerosis* 1998;137:367-76.
409. Lopez-Miranda J, Ordovas JM, Espino A, Marin C, Salas J, Lopez-Segura F *et al.* Influence of mutation in human apolipoprotein A-1 gene promoter on plasma LDL cholesterol response to dietary fat. *Lancet* 1994;343:1246-49.
410. Ordovas J, López-Miranda J, Mata P, Pérez-Jiménez F, Lichtenstein AH, Schaefer EJ. Gene-diet interaction in determining plasma lipid response to dietary intervention. *Atherosclerosis* 1995;118:s11-s27.
411. Lopez-Miranda J, Ordovas JM, Mata P, Lichtenstein AH, Clevidence B, Judd JT *et al.* Effect of apolipoprotein E phenotype on diet-induced lowering of plasma low density lipoprotein cholesterol. *J Lipid Res* 1994;35:1965-75.
412. Pryor WA, Stone K. Oxidants in cigarette smoke. Radicals, hydrogen peroxide, peroxyxynitrate, and peroxyxynitrite. *Ann N Y Acad Sci* 1993;686:12-27.
413. Fortmann SP, Haskell WL, Williams PT. Changes in plasma high density lipoprotein cholesterol after changes in cigarette use. *Am J Epidemiol* 1986;124:706-10.

414. Scheffler E, Huber L, Fruhbis J, Schulz I, Ziegler R, Dresel HA. Alteration of plasma low density lipoprotein from smokers. *Atherosclerosis* 1990;82:261-65.
415. Nishio E, Watanabe Y. Cigarette smoke extract inhibits plasma paraoxonase activity by modification of the enzyme's free thiols. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;236:289-93.
416. James RW, Leviev I, Righetti A. Smoking Is Associated With Reduced Serum Paraoxonase Activity and Concentration in Patients With Coronary Artery Disease. *Circulation* 2000;101:2252-57.
417. Malin R, Loimaala A, Nenonen A, Mercuri M, Vuori I, Pasanen M *et al.* Relationship between high-density lipoprotein paraoxonase gene M/L55 polymorphism and carotid atherosclerosis differs in smoking and nonsmoking men. *Metabolism* 2001;50:1095-101.
418. Martin GM. Genetics and the pathobiology of ageing. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1997;352:1773-80.
419. Bilato C, Crow MT. Atherosclerosis and the vascular biology of aging. *Aging (Milano)* 1996;8:221-34.
420. Ecobichon DJ, Stephens DS. Perinatal development of human blood esterases. *Clin Pharmacol Ther* 1973;14:41-47.
421. Furlong CE, Li WF, Richter RJ, Shih DM, Lusic AJ, Alleva E *et al.* Genetic and temporal determinants of pesticide sensitivity: role of paraoxonase (PON1). *Neurotoxicology* 2000;21:91-100.
422. Milochevitch C, Khalil A. Study of the paraoxonase and platelet-activating factor acetylhydrolase activities with aging. *Prostaglandins Leukot. Essent Fatty Acids* 2001;65:241-46.
423. Bonafe M, Marchegiani F, Cardelli M, Olivieri F, Cavallone L, Giovagnetti S *et al.* Genetic analysis of Paraoxonase (PON1) locus reveals an increased frequency of Arg192 allele in centenarians. *Eur J Hum Genet* 2002;10:292-96.
424. Effects of estrogen or estrogen/progestin regimens on heart disease risk factors in postmenopausal women. The Postmenopausal Estrogen/Progestin Interventions (PEPI) Trial. The Writing Group for the PEPI Trial. *JAMA* 1995;273:199-208.
425. Gebara OC, Mittleman MA, Sutherland P, Lipinska I, Matheney T, Xu P *et al.* Association between increased estrogen status and increased fibrinolytic potential in the Framingham Offspring Study. *Circulation* 1995;91:1952-58.
426. Koh KK, Mincemoyer R, Bui MN, Csako G, Pucino F, Guetta V *et al.* Effects of hormone-replacement therapy on fibrinolysis in postmenopausal women. *N Engl J Med* 1997;336:683-90.
427. Sarrel PM. Ovarian hormones and the circulation. *Maturitas* 1990;12:287-98.
428. Lieberman EH, Gerhard MD, Uehata A, Walsh BW, Selwyn AP, Ganz P *et al.* Estrogen improves endothelium-dependent, flow-mediated vasodilation in postmenopausal women. *Ann Intern Med* 1994;121:936-41.
429. Daly E, Vessey MP, Hawkins MM, Carson JL, Gough P, Marsh S. Risk of venous thromboembolism in users of hormone replacement therapy. *Lancet* 1996;348:977-80.

430. Cushman M, Legault C, Barrett-Connor E, Stefanick ML, Kessler C, Judd HL *et al.* Effect of postmenopausal hormones on inflammation-sensitive proteins: the Postmenopausal Estrogen/Progestin Interventions (PEPI) Study. *Circulation* 1999;100:717-22.
431. Mackness MI, Mackness B, Durrington PN, Fogelman AM, Berliner J, Lusis AJ *et al.* Paraoxonase and coronary heart disease. *Curr Opin Lipidol* 1998;9:319-24.
432. Sutherland WH, Manning PJ, de Jong SA, Allum AR, Jones SD, Williams SM. Hormone-replacement therapy increases serum paraoxonase arylesterase activity in diabetic postmenopausal women. *Metabolism* 2001;50:319-24.
433. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993;362:801-09.
434. Libby P, Egan D, Skarlatos S. Roles of infectious agents in atherosclerosis and restenosis: an assessment of the evidence and need for future research. *Circulation* 1997;96:4095-103.
435. Britt WJ. Vaccines against human cytomegalovirus: time to test. *Trends Microbiol* 1996;4:34-38.
436. Jousilahti P, Vartiainen E, Tuomilehto J, Puska P. Symptoms of chronic bronchitis and the risk of coronary disease. *Lancet* 1996;348:567-72.
437. Feingold KR, Memon RA, Moser AH, Grunfeld C. Paraoxonase activity in the serum and hepatic mRNA levels decrease during the acute phase response. *Atherosclerosis* 1998;139:307-15.
438. Hedrick CC, Hassan K, Hough GP, Yoo JH, Simzar S, Quinto CR *et al.* Short-term feeding of atherogenic diet to mice results in reduction of HDL and paraoxonase that may be mediated by an immune mechanism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:1946-52.
439. Van Lenten BJ, Hama SY, de Beer FC, Stafforini DM, McIntyre TM, Prescott SM *et al.* Anti-inflammatory HDL becomes pro-inflammatory during the acute phase response. Loss of protective effect of HDL against LDL oxidation in aortic wall cell cocultures. *J Clin Invest* 1995;96:2758-67.
440. Lambert M, Boullier A, Hachulla E, Fruchart JC, Teissier E, Hatron PY *et al.* Paraoxonase activity is dramatically decreased in patients positive for anticardiolipin antibodies [In Process Citation]. *Lupus* 2000;9:299-300.
441. Tillett HE, Smith JW, Gooch CD. Excess deaths attributable to influenza in England and Wales: age at death and certified cause. *Int J Epidemiol* 1983;12:344-52.
442. James RW, Blatter Garin MC, Calabresi L, Miccoli R, Von Eckardstein A, Tilly-Kiesi M *et al.* Modulated serum activities and concentrations of paraoxonase in high density lipoprotein deficiency states. *Atherosclerosis* 1998;139:77-82.
443. Sakai T, Matsuura B, Onji M. Serum Paraoxonase activity and Genotype Distribution in Japanese Patients with Diabetes Mellitus. *Internal Medicine* 1998;37:581-84.
444. Gan KN, Smolen A, Eckerson HW, La Du BN. Purification of human serum paraoxonase/arylesterase. Evidence for one esterase catalyzing both activities. *Drug Metab Dispos* 1991;19:100-06.

445. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988;16:1215.
446. Humbert R, Adler DA, Disteché CM, Hassett C, Omiecinski CJ, Furlong CE. The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism. *Nat Genet* 1993;3:73-76.
447. Lopes-Virella MF, Stone P, Ellis S, Colwell JA. Cholesterol determination in high-density lipoproteins separated by three different methods. *Clin Chem* 1977;23:882-84.
448. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972;18:499-502.
449. Vasankari T, Kujala U, Heinonen O, Kapanen J, Ahotupa M. Measurement of serum lipid peroxidation during exercise using three different methods: diene conjugation, thiobarbituric acid reactive material and fluorescent chromolipids. *Clin Chim Acta* 1995;234:63-69.
450. Dill DB, Costill DL. Calculation of percentage changes in volumes of blood, plasma, and red cells in dehydration. *J Appl Physiol* 1999;37:247-48.
451. Stuart WD, Krol B, Jenkins SH, Harmony JA. Structure and stability of apolipoprotein J-containing high-density lipoproteins. *Biochemistry* 1992;31:8552-59.
452. Arad Y, Ramakrishnan R, Ginsberg HN. Lovastatin therapy reduces low density lipoprotein apoB levels in subjects with combined hyperlipidemia by reducing the production of apoB-containing lipoproteins: implications for the pathophysiology of apoB production. *J Lipid Res* 1990;31:567-82.
453. Bersot T, Mahley RW. Clinical classification of lipid abnormalities, In: Fuster V, Ross R, Topol EJ, editors. *Atherosclerosis and coronary artery disease*. Philadelphia, New York: Lippincott-Raven Publishers; 1996. p. 163-90.
454. Somani SM, Rybak LP. Comparative effects of exercise training on transcription of antioxidant enzyme and the activity in old rat heart. *Indian J Physiol Pharmacol* 1996;40:205-12.
455. Sen CK, Packer L. Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *FASEB J* 1996;10:709-20.
456. Liu ML, Bergholm R, Makimattila S, Lahdenpera S, Valkonen M, Hilden H *et al*. A marathon run increases the susceptibility of LDL to oxidation in vitro and modifies plasma antioxidants. *Am J Physiol* 1999;276:E1083-E1091.
457. Sun Y, Oberley LW. Redox regulation of transcriptional activators. *Free Radic Biol Med* 1996;21:335-48.
458. Berliner JA, Heinecke JW. The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. *Free Radic Biol Med* 1996;20:707-27.
459. Marrugat J, Senti M. High cholesterol may not have same effect on cardiovascular risk in southern Europe as elsewhere. *Br Med J* 2000;320:250.

460. Fito M, Gimeno E, Covas MI, Miro E, Lopez-Sabater MC, Farre M *et al.* Postprandial and short-term effects of dietary virgin olive oil on oxidant/antioxidant status. *Lipids* 2002;37:245-51.
461. Tomas M, Senti M, Elosua R, Vila J, Sala J, Masia R *et al.* Interaction between the Gln-Arg 192 variants of the paraoxonase gene and oleic acid intake as a determinant of high-density lipoprotein cholesterol and paraoxonase activity. *Eur J Pharmacol* 2001;432:121-28.
462. Cheema SK, Clandinin MT. Diet fat alters expression of genes for enzymes of lipogenesis in lean and obese mice. *Biochim Biophys Acta* 1996;1299:284-88.
463. Sfeir Z, Ibrahim A, Amri E, Grimaldi P, Abumrad N. Regulation of FAT/CD36 gene expression: further evidence in support of a role of the protein in fatty acid binding/transport. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1997;57:17-21.
464. Jump DB. Dietary polyunsaturated fatty acids and regulation of gene transcription. *Curr Opin Lipidol* 2002;13:155-64.
465. Amri EZ, Teboul L, Vannier C, Grimaldi PA, Ailhaud G. Fatty acids regulate the expression of lipoprotein lipase gene and activity in preadipose and adipose cells. *Biochem J* 1996;314 ( Pt 2):541-46.