



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultad de ciencias

Memoria del Trabajo de Fin de Grado

Implicación de la paraoxonasa 1 en los mecanismos de protección antioxidante. Efecto de la alimentación con una dieta hiperlipídica en ratas machos y hembras

Lidia Ruiz López

Grado en Bioquímica

Año académico 2013-14

DNI del alumno: 41574437M

Trabajo tutelado por: Isabel Lladó Sampol
Departamento de Biología Fundamental y Ciencias de la Salud

Se autoriza a la Universidad a incluir mi trabajo en el Repositorio Institucional para su consulta en acceso abierto y difusión en línea, con finalidades exclusivamente académicas y de investigación

Palabras clave del trabajo: Paraoxonasa, mecanismos antioxidantes, apoproteínas

ÍNDICE

Introducción	Pág. 2
Objetivo y planteamiento experimental	Pág.9
Materiales y métodos	Pág.10
Resultados y discusión	Pág.16
Conclusiones	Pág.21
Bibliografía	Pág.22

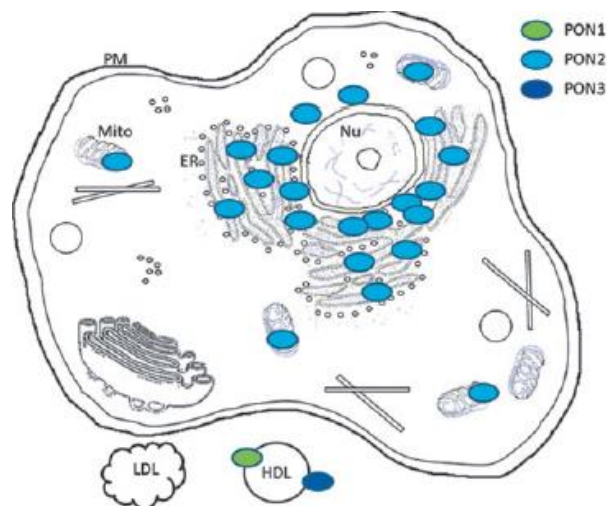
RESUMEN

La familia paraoxonasa (PON) está formada por 3 enzimas: PON1, PON2 y PON3. La PON1 es una enzima Ca^{2+} dependiente que se sintetiza principalmente en el hígado, está presente en las HDL y se considera responsable de muchas de las características antiaterogénicas y cardioprotectoras de estas ya que ayuda a reducir la oxidación de las LDL. La PON1 es sensible a cambios en su entorno: ya sean cambios endógenos (oxidación del ambiente, ácidos grasos presentes en las HDL, etc), cambios exógenos (ingesta de grasas, antioxidantes, etc) o factores ambientales (especies reactivas de nitrógeno, oxígeno, metales, etc). Estos factores pueden afectar tanto a su actividad, a sus niveles en el suero o a su expresión en el hígado. En este estudio se ha estudiado la participación de la PON1 en los mecanismos antioxidantes y se han observado los cambios de la PON1 frente a una dieta *high fat* en ratas macho y hembra. La dieta utilizada no produjo cambios significativos ni en la actividad de la PON1 ni en sus niveles en suero, pero sí encontramos algunas diferencias de sexo tanto en la actividad enzimática como en el daño lipídico.

INTRODUCCIÓN

La paraoxonasa 1 (PON1) forma parte de la familia paraoxonasa (PON) y se encuentra asociada a las HDL juntamente con la Apo-AI y la ApoJ, entre otras proteínas. La PON1 contiene 355 aminoácidos, un peso molecular de 43 kDa y posee varias actividades catalíticas: actividad paraoxonasa, arilesterasa y lactonasa, además, su actividad depende de Ca^{2+} . El gen *PON1* está localizado en el brazo largo del cromosoma 7, entre q21.3 y q22.1 y se expresa principalmente en el hígado. Esta proteína, se mantiene unida a las HDL a través de su región N-terminal gracias a interacciones hidrófobas. Estudios *in vitro* demuestran que posee una gran variedad de sustratos, algunos de los cuales participan en la progresión de las lesiones ateroscleróticas¹.

Además de la PON1, la familia PON está compuesta por 3 tipos diferentes de paraoxonasas, compartiendo hasta un 70% de homología. Los diferentes tipos presentan diferente distribución de tejido y en conjunto, protegen contra las enfermedades de las arterias coronarias. En humanos PON1 y PON3 se expresan mayoritariamente en el hígado, encontrando también un bajo nivel de expresión en el riñón². PON2 se expresa en diversos órganos incluyendo el corazón, riñón, hígado, pulmón, placenta, intestino delgado, bazo, estómago y el testículo. Aunque también, las células de la pared arterial, incluyendo células endoteliales, células del músculo liso y macrófagos pueden expresar PON2³. Tras la expresión, la PON1 y la PON3 se asocian con las HDL circulantes, en cambio, PON2 se localiza intracelularmente asociada al retículo endoplasmático⁴ (Figura 1).



a

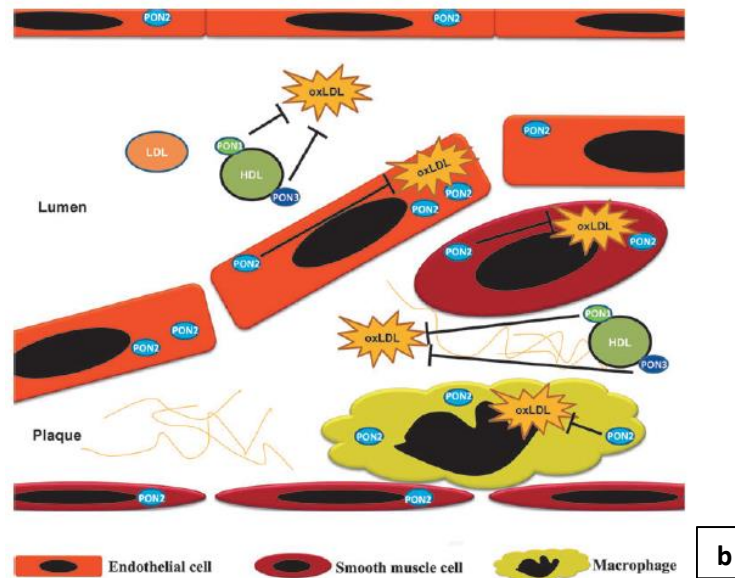


FIGURA 1. a) Distribución celular de las diferentes paraoxonasas. Tras la expresión, la PON1 y la PON3 se secretan y se asocian con las HDL circulantes y la PON2 permanece en la región perinuclear, donde se asocia con el ER y la envoltura nuclear (ER, retículo endoplasmático; LDL, lipoproteína de baja densidad; Mito, mitocondrias; Nu, nuclear; PM, membrana plasmática). **b) Distribución de las diferentes PONs y sus funciones en el bloqueo de los efectos de las LDLox en las placas ateroscleróticas.** PON1 y PON3 actúan en la placa aterosclerótica mediante la asociación con las HDL. PON2 se expresa en las células endoteliales, células de músculo liso y en los macrófagos³⁷.

La PON1 empezó a estudiarse en el ámbito de la toxicología debido a su capacidad para hidrolizar sustratos tóxicos; entre ellos, metabolitos procedentes de insecticidas, tipo oxones, los cuales, es capaz de metabolizar con diferente eficiencia: paraxon, paration, diazinon, chlorpyrifos, etc. También, algunos organofosforados, y lactonas, aunque ninguno de estos sustratos se encuentra de manera fisiológica en los organismos. Como sustratos fisiológicos podemos encontrar los metabolitos oxidados de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAS), los cuales, tienen una estructura similar a las lactonas. Se ha descrito a la Hcy-tiolactona como uno de los sustratos naturales de la PON1, este sustrato reacciona con las proteínas y causa N-homocisteinilación a través de la formación de enlaces amida entre los residuos lisina de las proteínas, alterando la función de estas, estos estudios han demostrado que la PON1 puede proteger frente a la N-homocisteinilación de proteínas *in vivo*⁵. La habilidad para hidrolizar metabolitos oxidados y Hcy-tiolactonas permite a la familia PON proteger a los individuos frente al estrés oxidativo y enfermedades inflamatorias, incluyendo la aterosclerosis.

▪ **Implicación de la PON1 en los mecanismos de acción antioxidantes**

Estudios recientes indican que la acumulación de peróxidos lipídicos es mayor cuando se incuban únicamente LDL que cuando se incuban LDL junto con HDL (Figura 2). Se ha relacionado esta actividad antioxidante de las HDL con la actividad de la PON1, es decir, de las proteínas presentes en las HDL que poseen actividad enzimática que se indican en la (Tabla 1), se cree que la PON1 es la principal responsable de la descomposición de los peróxidos lipídicos antes de que se acumulen en las LDL y causen su oxidación (oxLDL), protegiendo al endotelio de posibles lesiones¹.

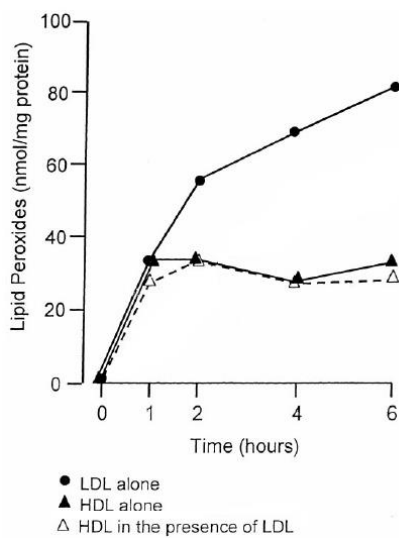


FIGURA 2. Acumulación de peróxidos lipídicos en LDL y HDL incubadas bajo condiciones de oxidación¹.

Cambios en el tamaño de las HDL influyen fuertemente en la afinidad y la unión de la PON1, afectando a su capacidad antioxidante¹. Estudios con ratones *knockout* para la PON1 demuestran la capacidad de esta enzima para reducir la oxidación de las LDL y evitar así el riesgo aterogénico, las HDL aisladas de estos ratones no fueron capaces de prevenir la oxidación de las LDL. Además, la asociación entre la baja actividad de la PON1 en plasma y la formación de placas de aterosclerosis se ha visto en diversos estudios en ratones, humanos y otras especies⁶.

Podemos decir que, en general, el cluster PON ejerce una función antiaterosclerótica en los niveles siguientes: PON1 y PON3 ejercen su efecto sobre las HDL en el suero, y PON2 protege a los macrófagos y posiblemente a otras células al actuar intracelularmente. También, se ha demostrado la disminución de la actividad de la PON1 en enfermedades humanas tales como la obesidad⁷, la diabetes⁸ y algunas enfermedades neurodegenerativas⁹.

Proteínas presentes en las HDL con actividad enzimática
PON1
LCAT
PAFAH
Proteinasa
Fosfolipasa D
Albumina
Apo AI

TABLA 1. Proteínas presentes en las HDL que poseen actividad enzimática¹.

- ***Los niveles de PON1 se relacionan con los de la Apo-AI y con los de la ApoJ en las HDL***

Como se ha mencionado anteriormente, la Apo-AI y la ApoJ están presentes en las HDL y juegan un papel muy importante tanto en la función de éstas como en la actividad enzimática de la PON1.

La **Apo-AI**, en humanos, está codificada por el gen *APO-AI*, contiene 243 aminoácidos y una masa de 28 kDa. Forma parte de los quilomicrones, sintetizados por el intestino, aunque rápidamente pasa a las HDL en el plasma. Se sintetiza como una pre-proteína en los hepatocitos y enterocitos y después de la escisión intracelular del pre-péptido, las proproteínas se secretan al plasma o al sistema linfático¹⁰. Algunos estudios han demostrado que la escisión posterior del propéptido de la Apo-AI parece ser esencial para la conversión de las HDL nacientes (pre β -HDL) en HDL maduras¹¹. Una vez en las HDL supone más del 70% del contenido proteico en masa, cumpliendo una función muy importante en su estructura. Después de la escisión del prosegmento, la apoA-I puede interactuar directamente con el transportador ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1), el cual media el flujo de salida de colesterol y fosfolípidos desde las células a las apolipoproteínas pobres en lípidos, que luego formarán las HDL¹². Además, se cree que la zona central de la apoproteína está implicada en la activación de la Lecitin colesterol acil transferasa (LCAT), esta enzima se encarga de la esterificación de los lípidos procedentes de los tejidos, en las HDL, ayudando a que las células envíen los lípidos y el colesterol sobrante a las HDL que viajarán por el torrente sanguíneo hacia el hígado. Defectos en el gen que codifica la Apo-AI se asocian con niveles muy bajos de HDL y consecuentemente una baja actividad de la PON1, por ejemplo, en el caso de la enfermedad de Tangier¹³. Un estudio realizado confirmó la capacidad de la Apo-AI para aumentar la actividad específica de la PON1, proponiendo una interacción directa péptido-péptido entre la Apo-AI y la PON1, se basa en los resultados de mutaciones de un solo aminoácido en la región N-terminal de la apoAI que aumentan o disminuyen su capacidad para mejorar la actividad de la enzima específica, este estudio también se apoya por otros ensayos en los que se observa una reducción significativa de la actividad de la PON1 en ratones knockout para Apo-AI¹⁴.

La **ApoJ o clusterina** también forma parte de las HDL y está codificada por el gen *CLU*. Es un heterodímero unido por puentes disulfuro y su forma madura tiene una masa de alrededor de 40kDa. Tiene una función de tipo chaperona y está implicada en diversas actividades que incluyen la muerte celular programada, la adhesión célula-célula y el reciclaje de la membrana. También es capaz de unirse y formar complejos con diversas proteínas tales como la PON1, inmunoglobulinas, lípidos y bacterias¹⁵. Algunos ensayos han mostrado que el estrés oxidativo parece desempeñar un

papel importante en la regulación de su expresión¹⁶. Aunque existen pocos estudios que proporcionen alguna evidencia de una interacción funcional entre la PON1 y la ApoJ en condiciones fisiológicas. Sin embargo, la ApoJ es un péptido altamente hidrofóbico con fuertes propiedades de unión a lípidos. Por lo que existe la posibilidad de que se una y secuestre lípidos oxidados ayudando a la PON1 a actuar como escudo contra los efectos perjudiciales del estrés oxidativo¹⁷.

▪ **Efectos de la dieta sobre PON1**

La población sana de algunos países presenta diferente actividad de la PON1 en suero, estas variaciones no pueden ser atribuibles únicamente a diferencias genotípicas, la explicación podría encontrarse en las diferencias nutricionales de la población. En la (Tabla 2) se muestra como diferentes compuestos presentes en la dieta pueden alterar la actividad enzimática de la PON1.

Antioxidante	Incremento en la actividad de PON1
Vitamina C, E	5-23%
Quecetin	18-59%
Té verde	50%
Extracto de semilla de uva	32%
Arándanos	10-67%
Jugo de granada	23%

TABLA 2. Antioxidantes dietéticos que incrementan que actividad de PON1³⁸

Existen individuos cuya actividad de la PON1 en suero es baja con respecto a todos los sustratos, este hecho puede deberse a factores adquiridos que actúan sobre la composición de los lípidos que componen las HDL, donde opera la PON1, en la región promotora del gen PON1, o a factores aún no identificados. Por tanto, es lógico pensar que la cantidad y la composición de los lípidos de la dieta son factores clave en la modulación de PON1. El efecto de los lípidos de la dieta sobre la actividad de PON1 se ha investigado principalmente en modelos animales, obteniendo evidencias de que los ácidos grasos de la dieta regulan el metabolismo de los lípidos del plasma, modificando el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares e inflamatorias. Además de sus papeles como componentes estructurales de las lipoproteínas y las membranas biológicas, los ácidos grasos modulan la transducción de señales y la expresión de multitud de genes en el hígado, el tejido adiposo blanco y el músculo¹⁸.

Funciones de la PON1
Proteger contra los efectos de la peroxidación lipídica de las HDL, LDL y de las membranas celulares
Detoxificar metabolitos tóxicos (homocisteínas, homocisteinas-tiolactonas) los cuales causan daños formando complejos con las proteínas en los residuos en lisina.
Proteger contra el estrés oxidativo que se produce en situación post prandial
Inhibe la síntesis de colesterol en los macrófagos
Modulador del metabolismo lipídico en el tejido adiposo blanco en humanos

TABLA 3. Resumen de las funciones más relevantes de la PON1

En concreto, se ha visto que dietas ricas en ácidos grasos saturados¹⁹ poliinsaturados^{19,20}, *trans*²¹ y oxidados²² disminuyen la actividad de la PON1, en cambio, una dieta rica ácidos grasos monoinsaturados^{23,24} aumenta la actividad de esta enzima.

La posible modulación inducida por la dieta de la actividad de PON1, se muestra en la *Figura 3*, y su papel antioxidante podría constituir un enfoque útil para la prevención de enfermedades humanas asociadas con el daño oxidativo. Finalmente, un resumen de las funciones que cumple la PON1 en los organismos se presenta en la *Tabla 3*.

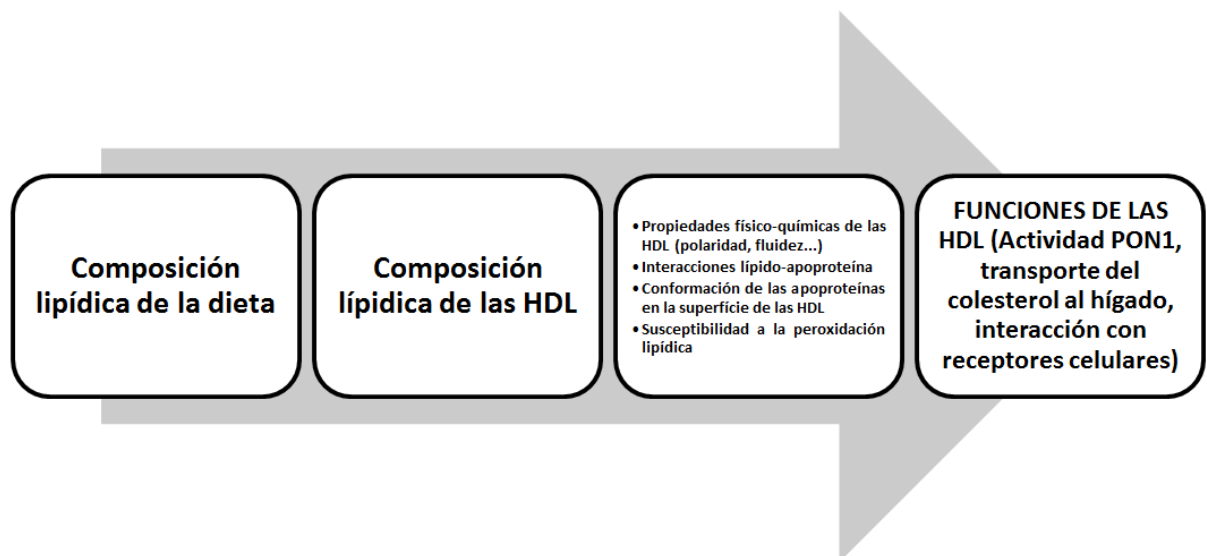


FIGURA 3. Efecto de los lípidos de la dieta sobre la composición y propiedades fisicoquímicas de las HDL y las consecuencias sobre sus funciones³⁶.

▪ *Otros factores que afectan la actividad de PON1*

Obesidad. En diferentes estudios con sujetos obesos se ha observado una disminución de la actividad de la PON1, encontrando también, una concentración de peróxidos más elevada que en sujetos control. Además, la concentración de LDL fue mayor, siendo más susceptibles a la oxidación (LDLox). Se observaron diferencias en la composición de las HDL, los individuos obesos mostraron una disminución en el contenido de proteína y un aumento en los niveles de colesterol y de triglicéridos. Se cree que, estos cambios pueden afectar a la unión de PON1 a la superficie de las HDL, lo que resulta en la disminución de la actividad de la enzima⁷.

Edad. Existen diversas teorías para explicar el proceso de envejecimiento, una de las más apoyadas es en la que se cree que el envejecimiento es el resultado parcial de un desequilibrio entre pro-oxidantes y antioxidantes, en el que el exceso y la acumulación de pro-oxidantes promueve el

proceso. Se han realizado estudios donde se ha visto que la actividad PON1 y la concentración de las HDL disminuyen significativamente con el envejecimiento. Esta disminución de la actividad de PON1 puede contribuir al aumento del riesgo cardiovascular que se observa en edades más tardías²⁵.

Las lipoproteínas y sus productos metabólicos regulan la expresión de la PON1. Las HDL son las principales transportadoras de la PON1, por tanto, juegan un papel importante en la concentración de la enzima. Este efecto puede observarse en síndromes que provocan la deficiencia de HDL donde la concentración de PON1 es muy reducida, por tanto, factores que aumenten la concentración de HDL aumentan la concentración de la enzima²⁶.

Existen también *medicamentos* que alteran la capacidad catalítica de la PON. En la (Tabla 4) podemos observar algunos de los medicamentos estudiados hasta la fecha que incrementan la actividad de la de la PON1.

Medicamentos	Incremento en la actividad de PON1
Estatinas	5-23%
Fibratos	18-59%
Probucol	50%
Ezetimibe	32%
Rosiglitazona	10-67%
Eritropoietina beta	23%

TABLA 4. Medicamentos que incrementan la actividad de la PON1 en animals o humanos³⁸.

También existen dos *polimorfismos* principales para la PON1, uno en la posición 55 (metionina/leucina, M/L) y otro en la posición 192 (arginina/glutamina (R/Q). El aislamiento y la purificación de PON1 192 RR y de PON1 55 LL ha permitido comprobar que son los alelos con la mayor actividad hidrolítica hacia el paraoxón, mientras que los alelos que se corresponden a PON1 192 QQ y PON1 55 MM son los que presentan la menor actividad. Los individuos que presentan alelos heterocigóticos presentan actividades catalíticas intermedias. Sin embargo, la capacidad de la PON1 para proteger a las LDL frente a la oxidación presenta una tendencia opuesta a la actividad hidrolítica del paraoxón. El alelo PON1 55 MM es el que presenta mayor protección frente a la oxidación de las LDL y en los últimos años se ha visto una relación entre el polimorfismo de PON1 192 y las ECV^{1,27}.

OBJETIVO Y PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL

El objetivo de este trabajo se resume a continuación: determinar los efectos de una dieta hiperlipídica sobre la actividad de la PON1 y los factores que la influyen en ratas macho y hembra.

Para conseguirlo, se realizó el siguiente planteamiento experimental: Se utilizó, para cada sexo, un grupo control (n=6/sexo) alimentado *ad libitum* con una dieta estándar y un segundo grupo (n=7/sexo) alimentado con una dieta *high fat*. Se determinaron los pesos corporales de los animales de ambos grupos, tras el sacrificio se obtuvieron las muestras de suero y de hígado. Se determinó la actividad enzimática de la PON1, los niveles séricos de triglicéridos, ácidos grasos libres (AGL) insulina, glucosa y los niveles de ARNm de la PON1 en el hígado, además de los niveles en suero de proteínas específicas (PON1, ApoJ y ApoAI). Por último también se determinó el daño lipídico.

MATERIALES Y MÉTODOS

▪ *Animales y tratamientos dietéticos*

Los protocolos experimentales aplicados en este trabajo se realizaron de acuerdo con las directrices generales aprobadas por el comité de ética institucional y normativa de la UE (2010/63/UE).

Se utilizaron ratas macho y hembra Wistar de seis semanas de edad (Charles River, Barcelona, España). Se alojó a los animales en el estabulario de la UIB, en un ambiente controlado a 22°C y con una humedad del 65% ± 3% en ciclos de 12h de luz-oscuridad con libre acceso a agua y comida durante una semana, para que se aclimataran. Se utilizaron doce ratas para el grupo control (n=6/sexo) y catorce para el grupo *High Fat* (n=7/sexo), con pesos similares (459 ± 4g para los machos y 259 ± 10g para las hembras), y se alimentaron con una dieta estándar *ad libitum* (Scientific Animal Food & Engineering, Route de Saint Bris, Francia), con una proporción del 19,6% de proteínas, 5% de materia grasa y 55,1% de carbohidratos (3438 Kcal/kg). A las ocho semanas de edad el grupo *High Fat* empezó a alimentarse con una dieta rica en grasas (Scientific Animal Food & Engineering, Route de Saint Bris, Francia) y rica en sacarosa, durante las siguientes 16 semanas, compuesta por un 17% de proteínas, 22,5% de materia grasa y 42,3% de carbohidratos. El peso corporal de los animales y la ingesta de los alimentos se evaluó cada 15 días durante las primeras 13 semanas y cada dos en las últimas dos semanas. La composición más detallada de las dietas se detalla en la (Tabla 4).

NUTRIENTES	%	Kcal/kg
GRASA	22,5	2025
SFA	36,9	
Palmítico	23,2	
Esteárico	11,8	
MUFA	63,0	
Oleico	43,6	
PUFA	15,3	
Omega 3	1,3	
Omega 6	13,9	
PROTEÍNAS	17	
CARBOHIDRATOS	42,3	1692
Sacarosa	29,3	

TABLA 4. Composición de la dieta *high fat*. En total se compone de 4397 Kcal/kg

El paraoxón (Sigma, D9286) se preparó a 25,5mM, en una campana de gases debido a su toxicidad, y se sonicó para mejorar su disolución (3 pulsos de 6 segundos separados por un minuto a una amplitud de un 30%) en tampón de ensayo que estaba compuesto de: glicina 0,05M con un pH 1,5 y 1mM CaCl₂.

Se pipetearon 235µl de tampón de ensayo y 5µl de paraoxón en la microplaca, cuando este se estabilizó (aproximadamente a 0,4-0,5 abs) se pipetearon 10 µl de muestra y se midió la absorbancia. Además, se realizaron blancos con 235µl de H₂O MiliQ y 5 µl de paraoxón para poder tener en cuenta su hidrólisis espontánea.

La actividad enzimática se calculó mediante la Ley de Beer-Lambert. El coeficiente de extinción molar corresponde a 18053 mM⁻¹·cm⁻¹ y el paso óptico a 0,78 cm. La actividad enzimática se expresó en mUI/ml.

▪ *Determinación de los niveles de ARNm de PON1 en hígado*

Previamente a la RT-PCR se extrajo el RNA total de las muestras de hígado mediante Tripure Isolation Reagent (Roche, Cat. No. 11 667 165 001):

Se añadió 1mL de Tripure a 100mg de hígado, se homogeneizó y se incubó 5 min a temperatura ambiente. Después de la incubación se añadieron 0,2 ml de cloroformo y se agitó vigorosamente durante 15 segundos seguidamente, se incubó durante 15 min. Para proceder a la separación de las tres fases se centrifugó durante 15min a 12000g a 4°C obteniendo tres fases diferenciadas: en la fase superior se obtuvo el ARN y en la interfase y en la inferior (fase orgánica) se obtuvieron el ADN y las proteínas. Se transfirió la fase superior (incolora) para la obtención del ARN total. A continuación se precipitó el RNA y se volvió a resuspender en agua libre de RNAsas.

Para la cuantificación del ARN se utilizó el espectrofotómetro (Nanodrop Shimadzu, Tokio, Japon), que nos permitió determinar la concentración de la muestra además de mostrarnos los ratios 260/280nm, para la observar la contaminación por ADN y 260/230nm, para saber la contaminación por compuestos fenólicos utilizados en la fase de extracción, de esta manera pudimos determinar la calidad de la muestra.

Se transcribió un microgramo de ARN a cDNA a 42°C durante 60 min con 25 U MuLV de transcriptasa inversa en 10 µl de mezcla de reacción de retrotranscripción, compuesta de: 10mM de Tris-HCl (pH 9,0), KCl 50 mM, 0.1% Triton X-100, 2.5mM MgCl₂, 2.5µM de hexámeros, 10 U de inhibidores de RNAsas y 500µM de cada dNTP en un termocilador (Applied Biosystems). Cada cDNA se diluyó 1/10 y la RT-PCR se realizó para la PON1 (gen diana) y para la GAPDH que se utilizó como housekeeping (Tabla 5).

Gen	Forward primers (5'→3') Reverse primers (5'→3')	Temperatura de hibridación (°C)	Temperatura de elongación (°C)	Tamaño del amplicón
GAPDH	ACTTTGGCATCGAAGGG CCGTTCAAGCTCTGGGATGAC	60	72	159
PON1 ARNm	TGGGCCTGTCATGGTCCAATGTTG TTATTCACAAGGGTGTCAAAGCTGCTGAG	60	72	246

TABLA 5. Primers y temperaturas utilizadas en la RT-PCR a tiempo real. La eficiencia de la PCR se calculó con el promedio de la eficiencia de cada muestra, que se calcula utilizando la siguiente fórmula: $e = \frac{F - F_0}{n - n_0}$, donde F y F₀ son valores de fluorescencia que pertenecen al segmento lineal de cada curva de cuantificación de PCR, y n y n₀ representan sus puntos de paso correspondientes.

Para la PCR a tiempo real se utilizó el Light-Cycler 480 SYBR Green I Master technology LightCycler 480 System II rapid thermal cycler (Roche Diagnostics, Alemania). Cada reacción contenía 5µl de LightCycler 480 SYBR Green I Master compuesto de: FastStart Taq DNA polymerase, dNTP mix, tampón de reacción, MgCl₂, y SYBR Green I dye), 0,5µM de primers específicos *sense* y *antisense* y 2,5µl la dilución de cDNA en un volumen final de 10µl. La amplificación programada consistió en un paso de preincubación para la desnaturalización de la plantilla de cDNA (2 min, 94°C), 40 ciclos de desnaturalización (95°C, 10s), seguidamente se produjo la hibridación (a temperatura primer-dependiente, 10s), extensión de la cadena (72°C, 12s) y la captura de la fluorescencia. La especificidad del producto se confirmó rutinariamente por un análisis de la curva de fusión y una electroforesis en gel de agarosa. Además, se llevó a cabo un control negativo sin cADN.

▪ *Cuantificación de proteínas séricas totales*

Previamente a la realización del Western blot se cuantificaron las proteínas totales presentes en el suero. Se utilizó el método de Bradford en microplaca, el cual se basa en la interacción del colorante Coomassie blue G-250 con las proteínas. El complejo formado se detecta a 595 nm a través de un espectrofotómetro (Bio-Tek Instruments, VT, USA).

En primer lugar, se realizó un patrón con BSA (0,5 mg/mL) por duplicado y posteriormente se pipetearon las muestras. Debido a la elevada concentración de proteínas en suero se realizó una dilución 1/120 de cada muestra y a partir de ésta se pipetearon 5µl en la placa de 96 pocillos juntamente con 5 µl de agua y 290 µl de reactivo de Bradford.

A partir del patrón se realizó una recta de regresión para poder cuantificar la cantidad de proteínas en las muestras expresada en µg/µl.

▪ ***Determinación de los niveles séricos de PON1, apoAI y ApoJ***

Esta determinación se llevó a cabo por Western blot. En primer lugar, se preparó el tampón de carga, con un 10% de β-mercaptoetanol (v/v), azul de bromofenol y glicerol. Seguidamente, se prepararon las muestras para cargar en el gel con una proporción con el tampón de carga 4:1 muestra:tampón (v/v).

Se prepararon los geles, el *stacking* al 5% y el *resolving* al 10%. Una vez polimerizados se añadió el tampón de electroforesis y se cargaron las muestras (30µg) y el marker (Precision Plus Protein Dual Color Standards, Bio-Rad). Posteriormente se inició la electroforesis durante 45 min a 200V.

Una vez obtenidos los geles se realizó la transferencia durante 30 min (TransBlot Turbo), a una membrana de nitrocelulosa. Se realizó la tinción con el PONCEAU S, para utilizarlo como *hosekeeping*. Se retiró la tinción con agua destilada y se procedió a bloquear la membrana con leche en polvo al 5% en TBS-T en agitación. En el caso de la PON1 el bloqueo se realizó *over night*, la apoAI y la ApoJ se bloquearon durante 1h en agitación. Una vez realizado el bloqueo se lavó la membrana con TBS-T durante 15', 5' y 5'. Se pusieron los anticuerpos primarios, para PON1 durante 1h (1:500 mouse, Abnova, H00005444-A01), para Apo-AI (1:1500 rabbit) y la ApoJ (1:1000 goat, Prosect CYT278) *over night*. Se volvió a lavar la membrana durante 15', 5' y 5' con TBS-T y seguidamente se incubaron las membranas con los anticuerpos secundarios, preparados a 1:20000 en TBS-T con leche el polvo al 1%. Se realizaron los últimos lavados de 15' y 5' con TBS-T y de 10' con TBS.

Se revelaron las membranas con el kit de quimioluminiscencia (clarity western ECL Substrate, BioRad) y las bandas se cuantificaron por análisis fotodensiométrico (Chemidoc XRS system, Bio-Rad, Hercules CA, USA). La cuantificación se realizó con Quantity One software (Bio-Rad). Finalmente, se identificaron las proteínas a través de sus pesos moleculares 43kDa para PON1, 28kDa para apoAI y 50kDa para apoJ.

▪ *Determinación en suero del daño lipídico*

El 4-HNE (4-hydroxynonenal) es el principal producto de la peroxidación lipídica endógena. Los ácidos grasos poliinsaturados de la familia omega-6 (linoleico y araquidónico) pueden producir el HNE como resultado del ataque de los radicales libres. Este HNE puede reaccionar con los residuos de histidina y lisina de las proteínas formando unos aductos estables²⁹.

Para cuantificar el daño lipídico se realizó un western blot con las mismas directrices que se siguieron para la ApoJ y la ApoAI (ver apartado anterior). El anticuerpo primario utilizado para el 4HNE fue: sc-130083 Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA.

▪ *Análisis estadístico*

Para el análisis de los niveles de ARNm de PON1, ApoJ y Apo-AI se utilizaron los valores de Ct (número de ciclos necesarios para que la señal fluorescente a sobrepase la señal umbral) que fueron analizados mediante GenEx stantad Software 5.3.6 (MultiAnalises, Sweden). Para cada gen se tuvo en cuenta la eficiencia de la reacción.

Los datos fueron analizados con la ayuda de un software estadístico (SPSS para Windows, SPSS, Chicago, IL, USA). Las diferencias entre los grupos experimentales en los parámetros estudiados fueron analizadas mediante ANOVA seguido de test t-student. Se consideraron datos significativos con un p valor <0.05 .

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

■ *Parámetros biométricos y séricos*

		Control		<i>high fat</i>		ANOVA
Peso Corporal (g)	<i>Machos</i>	459	± 4	483	± 6 ^b	S, D
	<i>Hembras</i>	249	± 2 ^a	269	± 10 ^{ab}	
Índice Adiposidad (%)	<i>Machos</i>	8.10	± 0.35	11.3	± 0.4 ^b	S, D, S*D
	<i>Hembras</i>	7.76	± 0.41	8.56	± 0.29 ^a	
Glucosa (mg/dl)	<i>Machos</i>	162	± 3	156	± 3	S*D
	<i>Hembras</i>	151	± 2 ^a	158	± 2 ^b	
Triglicéridos (mg/dl)	<i>Machos</i>	197	± 15	314	± 12 ^b	S, D, S*D
	<i>Hembras</i>	172	± 14	229	± 17 ^{ab}	
AGL (mg/dl)	<i>Machos</i>	15.7	± 1.5	20.8	± 0.4 ^b	D, S*D
	<i>Hembras</i>	17.4	± 0.6	17.1	± 1.0 ^a	
Insulina (ug/l)	<i>Machos</i>	0.897	± 0.183	0.798	± 0.094	S
	<i>Hembras</i>	0.560	± 0.056	0.500	± 0.013 ^a	

TABLA 6. Parámetros biométricos y séricos. El índice de adiposidad es la suma del peso de todos los depósitos adiposos (mesentéricos, retroperitoneales y gonadales) referidos al peso del animal, expresado en %. Los valores se expresan como la media ± SEM de 6-7 animales por grupo. ANOVA (p<0.05): S, efecto de sexo; D, efecto de dieta; S*D, efectos interactivos de dieta y sexo; NS, efectos no significativos. t-test Student (p<0.05) a, hembra vs macho; b *High Fat* vs Control.

Las ratas del grupo *High Fat*, tanto machos como hembras, aumentaron su peso corporal tras 16 semanas de tratamiento, factor que se relaciona con el incremento de adiposidad, el cual se incrementó en un 40% en machos y en un 10% en hembras en concordancia con otros estudios similares realizados con una dieta de caferería³⁰ y con una dieta *high fat* comercial con un 55,2% de grasa³¹. También se observa un incremento de los AGL y los triglicéridos, estos últimos se incrementan en un 60% y en un 33% en las ratas macho y en las hembras respectivamente (*Tabla 6*) como consecuencia de la dieta.

- **El daño lipídico puede relacionarse con los niveles y la actividad de PON1 en suero y su expresión en el hígado**

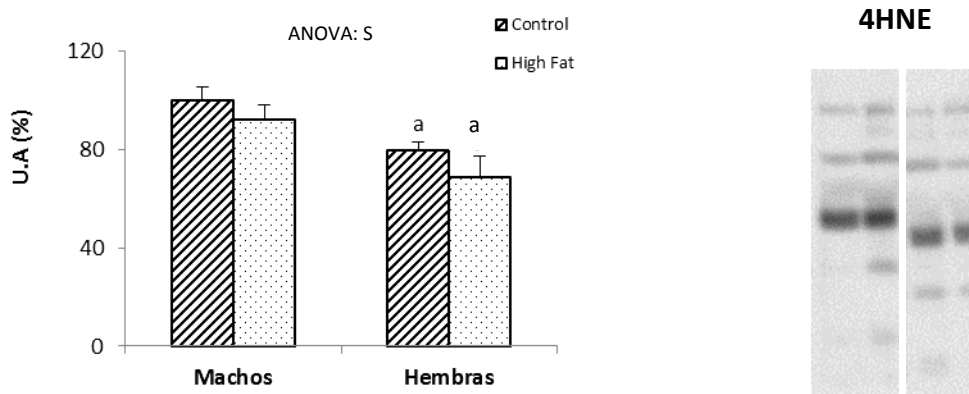


FIGURA 5. Niveles de 4HNE. Los niveles de 4HNE se expresan en % de unidades arbitrarias. Los niveles correspondientes al grupo de machos control representan el 100%. Los datos representan la media \pm SEM de 6-7 animales por grupo. T-student: a: hembras vs machos; b control vs High Fat ANOVA ($p < 0.05$): NS: no significativo; S, diferencia de sexo; D, efecto de dieta; S*D, efecto interactivo.

Como se observa en la (Figura 5) nuestros resultados, acerca del daño lipídico, reflejan diferencias entre sexos, para poder explicarlo otros estudios realizados³² han comparado la producción de radicales libres en mitocondrias hepáticas entre machos y hembras, observando que la producción de radicales libres es superior en machos. Además se ha visto que, las defensas antioxidantes son más activas en las hembras (glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa)³². Esta evidencia nos sugiere que las hembras podrían estar más protegidas frente al estrés oxidativo debido a la menor producción de radicales libres y al aumento de las defensas antioxidantes.

Estar sujetas a un estrés oxidativo inferior se puede correlacionar con los resultados mostrados en la Figura 5 en la cual, como se ha mencionado, el porcentaje de daño lipídico es inferior en las hembras. Un ambiente oxidativo inferior y una expresión mayor de otros mecanismos antioxidantes anteriormente mencionados, también podría producir como consecuencia una reducción significativa de los niveles de la actividad de PON1 en hembras como se observa en la Figura 6 ya que podrían tener una necesidad menor de ésta enzima antioxidante.

Se han realizado estudios que demuestran que la cantidad, la composición de los ácidos grasos de la dieta y el tiempo durante el que ésta se consume, modulan la actividad de la PON1¹⁹. Las alteraciones en la síntesis de PON1, su secreción, su estabilidad y su asociación a las HDL, podrían explicar, los posibles cambios en la PON1 debidos a la dieta. El estudio ya mencionado, en el cual se

utilizó una dieta *high fat* comercial con un contenido de grasas de un 55,2%³⁰, muestra una disminución de la actividad sérica de PON1 en ambos sexos por efecto del tratamiento dietético. En nuestros resultados no se observan diferencias ni en la actividad de PON1 ni en los niveles de daño lipídico debidos a la dieta (Figura 5 y 6), ya sea por las diferencias en el contenido de grasas respecto a nuestra dieta (22,5%) o debido a la presencia de ácidos grasos monoinsaturados (MUFAS) (Tabla 4), los cuales disminuyen los efectos negativos de los ácidos grasos saturados¹⁹, predominando así los efectos beneficiosos de los MUFAS^{23,24}. De esta manera, la protección antioxidante de la PON1 podría ser menos necesaria. Estos resultados difieren de estudios anteriores que demostraron que un aumento en la actividad de la PON1 se asociaba a la presencia de MUFAS^{19,33}, esta diferencia podría explicarse debido a la mayor duración de la dieta en nuestro estudio (4 meses), lo que llevaría a una respuesta adaptativa de la PON1 a una situación que implique un ambiente oxidativo menor.

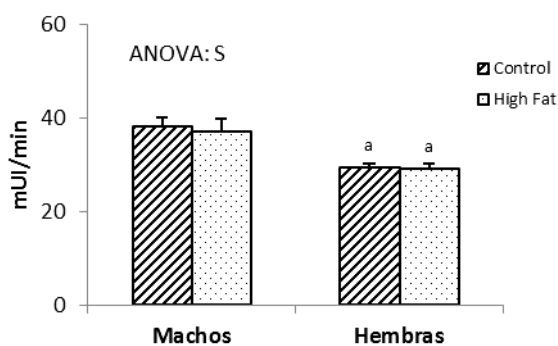


FIGURA 6. Actividad enzimática de la PON1 en suero. La actividad enzimática se expresa en mUI/min. t-Student ($p < 0.05$); High Fat vs control: a; hembras vs machos: b. ANOVA ($p < 0.05$): S, diferencia de sexo; D, efecto de dieta; S*D, efecto interactivo.

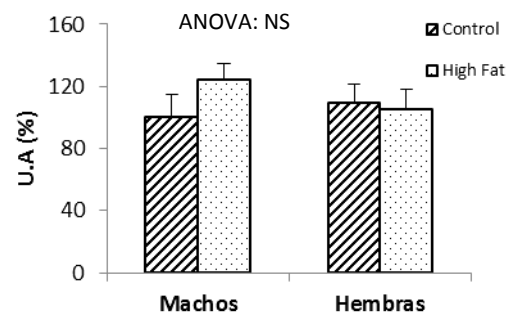


FIGURA 7. Niveles de la PON1 en suero. Los niveles de PON1 se expresan en % de unidades arbitrarias. Los niveles correspondientes al grupo de machos control representan el 100%. Los datos representan la media \pm SEM de 6-7 animales por grupo. T-student: a: hembras vs machos; b control vs High Fat ANOVA ($p < 0.05$): NS: no significativo; S, diferencia de sexo; D, efecto de dieta; S*D, efecto interactivo.

En relación al contenido de sacarosa de la dieta *high fat* utilizada, ensayos realizados donde la sacarosa representaba un 68% del contenido total de la dieta muestran un incremento de actividad de la PON1³⁴.

Exponen³⁴ que, una dieta rica en sacarosa provoca un aumento del nivel de triglicéridos (TG) en el suero como consecuencia de la hidrólisis de la sacarosa en sus constituyentes, glucosa y fructosa, y su posterior conversión en TG en el hígado. En nuestro estudio (Tabla 6) podemos observar que la dieta provoca un importante incremento de los niveles de TG, tanto en machos (60%) como en

hembras (33%). Este estudio³⁴, también muestra que, en comparación con el grupo control, la administración de una dieta rica en sacarosa provoca hipertrigliceridemia y un aumento significativo de la actividad de PON1. En cuanto a los TG, observan un aumento de los niveles de un 20% a las tres semanas y de un 47% después de 5 semanas. En comparación con nuestro estudio podemos observar que el aumento de los TG se produce de una forma muy rápida ya que, en nuestro caso es del 60% en machos y del 33% en hembras después de 16 semanas. Para explicar el aumento de la actividad de PON1³⁴, basan sus resultados en la influencia de las VLDL en la secreción de la PON1 ya que, otros experimentos *in vitro*³⁵, han demostrado que las VLDL pueden promover la secreción de la PON1. Han visto que, existen niveles bajos de PON1 activa que se asocian con las VLDL en el suero humano y que la actividad de la PON1 asociada a las VLDL es proporcional a las concentraciones de TGs en plasma. Nuestros resultados no muestran un aumento significativo de la actividad de PON1 respecto a la dieta y comparándolos con los de *Marija Macan et al*³⁴ las diferencias podrían deberse a las diferencias en el contenido de sacarosa en la dieta (29,3% frente a un 63%).

En cuanto a los niveles de la PON1 en el suero (*Figura 7*) no se observaron diferencias significativas ni entre sexos ni entre el grupo control y el *High Fat*, aunque observamos una tendencia a incrementarse en el grupo *High Fat* macho.

Se sabe que, las posibles alteraciones en el suero de la PON1 influyen en su síntesis hepática. La expresión de genes de la familia PON y de factores implicados en la síntesis de las HDL, se modulan a través de las vías de señalización de receptores celulares y nucleares, tales como los PPARs (peroxisome proliferator-activated receptors). La presencia de radicales libres y de productos de peroxidación lipídica parecen estar implicados en la disminución de la expresión de PPAR δ y la PON1 hepática³⁶.

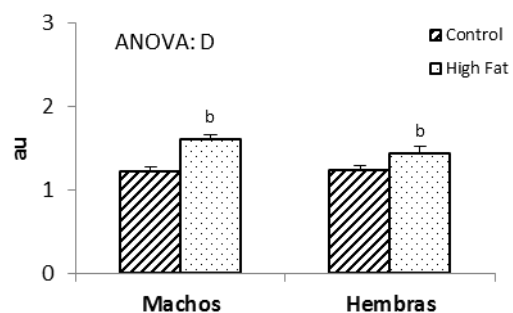


FIGURA 8. Niveles de ARNm de PON1 en el hígado. Se utilizó el GAPDH-Metabion como housekeeper. Las comparaciones estadísticas se realizaron entre ratas a: machos vs hembras; b: High Fat vs control y. ANOVA ($p < 0.05$): NS: no significativo; S, diferencia de sexo; D, efecto de dieta; S*D, efecto interactivo.

En nuestro estudio se obtuvo un incremento en la expresión de la PON1 en ambos sexos debido a la dieta, en ratas macho se incrementó un 32% y en ratas hembras un 16% (*Figura 8*), por tanto se puede pensar que la dieta no indujo a una mayor producción de radicales libres y productos de peroxidación, que como se ha explicado disminuyen la expresión de la PON1, a diferencia de otros

estudios³⁰. El porcentaje inferior en la expresión de PON1 en ratas hembra puede apoyar el argumento de que las hembras se encuentran en un estado de estrés oxidativo más reducido, siendo menos necesaria la expresión del gen de la PON1.

Finalmente, también se ha visto que el aumento de estos niveles de expresión no serían suficientes para aumentar los niveles de PON1 en suero tal y como se muestra en la (Figura 7) o bien, que las moléculas de ARNm de PON1 puedan tener una menor estabilidad.

▪ **Los niveles de ApoJ y Apo-AI se pueden relacionar con los niveles de HDL y de PON1 en suero**

La Apo-AI es un marcador de los niveles de HDL en plasma, ya que es uno de sus constituyentes proteicos principales. En la (Figura 9) se muestran los niveles en suero de la Apo-AI, los resultados reflejaron un efecto interactivo, es decir, los machos y las hembras respondieron de manera diferente a la dieta: las hembras con un incremento y los machos con una reducción.

Aunque los cambios debidos a la dieta no fueron significativos la tendencia en las hembras a incrementar los niveles de Apo-AI se podría considerar como una respuesta protectora ya que, como se ha mencionado los niveles de la Apo-AI se relacionan directamente con los de HDL. A su vez, estos niveles de HDL se relacionan con un menor riesgo aterogénico debido a una mayor eliminación del colesterol.

Por otro lado, la ApoJ está presente en la subpoblación de HDL que contiene la PON1. En la Figura 10 observamos una diferencia de sexo en los niveles de ApoJ que podrían relacionarse con los niveles de la actividad enzimática también inferiores en hembras (Figura 6). También observamos diferencias significativas debidas a la dieta, la cual produjo una disminución de la ApoJ tanto en ratas hembra como macho, por tanto, la dieta *high fat* utilizada podría causar la reducción de la subpoblación de HDL que transporta la PON1.

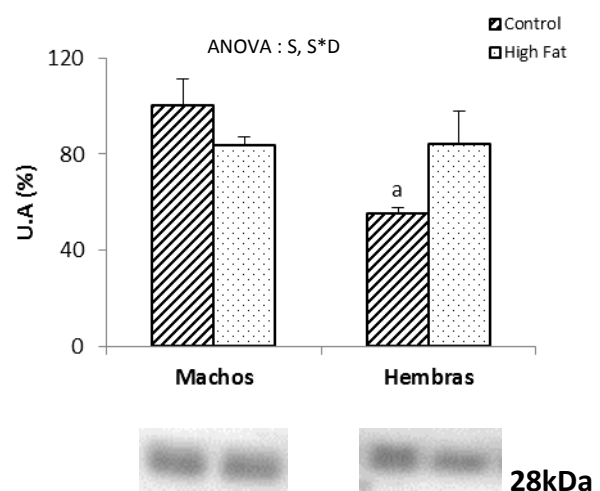


FIGURA 9. Niveles de la ApoAI en suero. Los niveles de ApoAI se expresan en % de unidades arbitrarias. Los niveles correspondientes al grupo de machos control representan el 100%. Los datos representan la media \pm SEM de 6-7 animales por grupo. T-student: a: hembras vs machos; b control vs High Fat ANOVA ($p < 0.05$): NS: no significativo; S, diferencia de sexo; D, efecto de dieta; S*D, efecto interactivo.

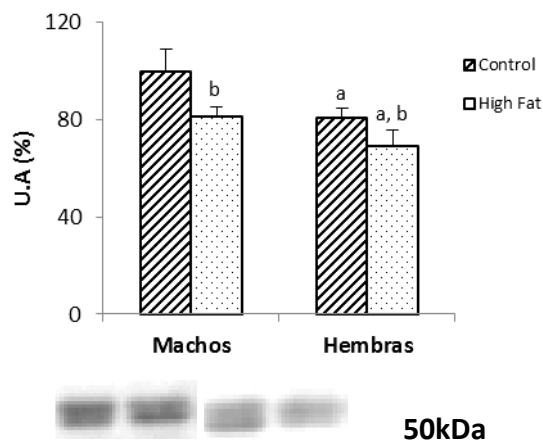


FIGURA 10. Niveles de la ApoJ en suero. Los niveles de ApoJ se expresan en % de unidades arbitrarias. Los niveles correspondientes al grupo de machos control representan el 100%. Los datos representan la media \pm SEM de 6-7 animales por grupo. T-student: a: hembras vs machos; b control vs High Fat ANOVA ($p < 0.05$): NS: no significativo; S, diferencia de sexo; D, efecto de dieta; S*D, efecto interactivo.

CONCLUSIÓN

Existen diferencias entre sexos en la magnitud de la respuesta a la dieta en la actividad de la PON1 y los factores que la modulan. Hemos comprobado que las alteraciones producidas por la alimentación con una dieta rica en grasas y sacarosa fueron más acentuadas en las ratas macho que en las hembras. Así, en los machos, la dieta aumentó los niveles séricos de la PON1 y su expresión hepática, mientras que los niveles de Apo-AI y ApoJ disminuyeron. Estos resultados apoyan la idea de que los machos serían más susceptibles a los cambios dietéticos mostrando más alteraciones en los parámetros lipídicos circulantes y en los factores que determinan la actividad PON1.

REFERENCIAS

1. Durrington PN, Mackness B, Mackness MI. Paraoxonase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21(4):473-480.
2. Reddy ST, Wadleigh DJ, Grijalva V, 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(4):542-547.
3. Ng CJ, Wadleigh DJ, Gangopadhyay A, 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(48):44444-44449.
4. Horke S, Witte I, Wilgenbus P, Krüger M, Strand D, Förstermann U. Paraoxonase-2 reduces oxidative stress in vascular cells and decreases endoplasmic reticulum stress-induced caspase activation. *Circulation.* 2007;115(15):2055-2064.
5. Perla-Kaján J, Jakubowski H. Paraoxonase 1 protects against protein N-homocysteinylolation in humans. *FASEB J.* 2010;24(3):931-936.
6. Shih DM, Gu L, Xia YR, et al. Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. *Nature.* 1998;394(6690):284-287.
7. Ferretti G, Bacchetti T, Masciangelo S, Bicchiega V. HDL-paraoxonase and membrane lipid peroxidation: a comparison between healthy and obese subjects. *Obesity (Silver Spring).* 2010;18(6):1079-1084.
8. Ferretti G, Bacchetti T, Busni D, Rabini RA, Curatola G. Protective effect of paraoxonase activity in high-density lipoproteins against erythrocyte membranes peroxidation: a comparison between healthy subjects and type 1 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(6):2957-2962.
9. Paragh G, Balla P, Katona E, Seres I, Egerházi A, Degrell I. Serum paraoxonase activity changes in patients with Alzheimer's disease and vascular dementia. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 2002;252(2):63-67.
10. Eggerman TL, Hoeg JM, Meng MS, Tombragel A, Bojanovski D, Brewer HB. Differential tissue-specific expression of human apoA-I and apoA-II. *J Lipid Res.* 1991;32(5):821-828.
11. Pyle LE, Sviridov D, Fidge NH. Characterization of the maturation of human pro-apolipoprotein A-I in an in vitro model. *Biochemistry.* 2001;40(10):3101-3108.
12. Zannis VI, Chroni A, Krieger M. Role of apoA-I, ABCA1, LCAT, and SR-BI in the biogenesis of HDL. *J Mol Med (Berl).* 2006;84(4):276-294.
13. 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(6):475-478.
14. Oda MN, Bielicki JK, Berger T, Forte TM. Cysteine substitutions in apolipoprotein A-I primary structure modulate paraoxonase activity. *Biochemistry.* 2001;40(6):1710-1718.
15. 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(3):832-839.
16. Trougakos IP, Gonos ES. Regulation of clusterin/apolipoprotein J, a functional homologue to the small heat shock proteins, by oxidative stress in ageing and age-related diseases. *Free Radic Res.* 2006;40(12):1324-1334.
17. James RW, Deakin SP. The contribution of high density lipoprotein apolipoproteins and derivatives to serum paraoxonase-1 activity and function. *Adv Exp Med Biol.* 2010;660:173-181.
18. Pegorier JP, Le May C, Girard J. Control of gene expression by fatty acids. *J Nutr.* 2004;134(9):2444s-2449s.
19. Kudchodkar BJ, Lacko AG, Dory L, Fungwe TV. Dietary fat modulates serum paraoxonase 1 activity in rats. *J Nutr.* 2000;130(10):2427-2433.

20. Fuhrman B, Volkova N, Aviram M. Postprandial serum triacylglycerols and oxidative stress in mice after consumption of fish oil, soy oil or olive oil: possible role for paraoxonase-1 triacylglycerol lipase-like activity. *Nutrition*. 2006;22(9):922-930.
21. de Roos NM, Schouten EG, Scheek LM, van Tol A, Katan MB. Replacement of dietary saturated fat with trans fat reduces serum paraoxonase activity in healthy men and women. *Metabolism*. 2002;51(12):1534-1537.
22. 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(5):1340-1347.
23. Efrat M, Rosenblat M, Mahmood S, Vaya J, Aviram M. Di-oleoyl phosphatidylcholine (PC-18:1) stimulates paraoxonase 1 (PON1) enzymatic and biological activities: in vitro and in vivo studies. *Atherosclerosis*. 2009;202(2):461-469.
24. Cherki M, Derouiche A, Drissi A, et al. Consumption of argan oil may have an antiatherogenic effect by improving paraoxonase activities and antioxidant status: Intervention study in healthy men. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2005;15(5):352-360.
25. Seres I, Paragh G, Deschene E, Fulop T, Khalil A. Study of factors influencing the decreased HDL associated PON1 activity with aging. *Exp Gerontol*. 2004;39(1):59-66.
26. James RW, Blatter Garin MC, Calabresi L, et al. Modulated serum activities and concentrations of paraoxonase in high density lipoprotein deficiency states. *Atherosclerosis*. 1998;139(1):77-82.
27. Ito T, Yasue H, Yoshimura M, et al. Paraoxonase gene Gln192Arg (Q192R) polymorphism is associated with coronary artery spasm. *Hum Genet*. 2002;110(1):89-94.
28. Ferré N, Camps J, Prats E, et al. Serum paraoxonase activity: a new additional test for the improved evaluation of chronic liver damage. *Clin Chem*. 2002;48(2):261-268.
29. Petersen DR, Doorn JA. Reactions of 4-hydroxynonenal with proteins and cellular targets. *Free Radic Biol Med*. 2004;37(7):937-945.
30. Thomas-Moya E, Gomez-Perez Y, Fiol M, Gianotti M, Llado I, Proenza AM. Gender related differences in paraoxonase 1 response to high-fat diet-induced oxidative stress. *Obesity (Silver Spring)*. 2008;16(10):2232-2238.
31. Thomàs-Moyà E, Gianotti M, Proenza AM, Lladó I. Paraoxonase 1 response to a high-fat diet: gender differences in the factors involved. *Mol Med*. 2007;13(3-4):203-209.
32. Viña J, Sastre J, Pallardó FV, Borrás C. Posibles mecanismos por los que las mujeres viven más ue los varones. *Revista Española de Geriatria y Gerontología*. 2004;39(6):381-384.
33. Nguyen SD, Sok DE. Beneficial effect of oleoylated lipids on paraoxonase 1: protection against oxidative inactivation and stabilization. *Biochem J*. 2003;375(Pt 2):275-285.
34. Macan M, Vrkić N, Vrdoljak AL, Radić B, Bradamante V. Effects of high sucrose diet, gemfibrozil, and their combination on plasma paraoxonase 1 activity and lipid levels in rats. *Acta Biochim Pol*. 2010;57(3):321-326.
35. Deakin S, Moren X, James RW. Very low density lipoproteins provide a vector for secretion of paraoxonase-1 from cells. *Atherosclerosis*. 2005;179(1):17-25.
36. Ferretti G, Bacchetti T. Effect of dietary lipids on paraoxonase-1 activity and gene expression. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2012;22(2):88-94.
37. She et al. Z. G., H. Z. Chen, Y. Yan, H. Li, and D. P. Liu. 2012. "The human paraoxonase gene cluster as a target in the treatment of atherosclerosis." *Antioxid Redox Signal* 16 (6):597-632. doi: 10.1089/ars.2010.3774. Citar aquest article com els altres utilitzats al text i inclur-lo a la bibliografia
38. Costa, L. G., G. Giordano, and C. E. Furlong. 2011. "Pharmacological and dietary modulators of paraoxonase 1 (PON1) activity and expression: the hunt goes on." *Biochem Pharmacol* 81 (3):337-44. doi: 10.1016/j.bcp.2010.11.008.