



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

**INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD
ÁREA ACADÉMICA DE NUTRICIÓN**

TESIS

Estudio de la actividad de la paraoxonasa1 (PON1) sérica en ratas Wistar diabéticas inducidas con estreptozotocina y alimentadas con diferentes dietas.

Que para obtener el Título de
Licenciado en Nutrición

Licenciatura en Nutrición

P R E S E N T A

Carlos Olvera Sandoval

Bajo la Dirección de:
Dr. Gabriel Betanzos Cabrera



Pachuca, Hgo; Septiembre 2010



Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Nutrición Molecular del Instituto de Ciencias de la Salud (ICSa) de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo bajo la dirección del Dr. Gabriel Betanzos Cabrera. Proyecto parcialmente financiado por el CONACYT (46537) y la AMMFEN.



DEDICATORIA

Sin duda alguna a mis padres quienes me enseñaron desde niño a ser humilde, respetuoso y audaz, principalmente por impulsarme a esforzarme por ser un buen ser humano. Este trabajo va por ustedes papá y mamá, por el esfuerzo realizado y darme la oportunidad de tener una carrera y creer en mí, aunque hemos pasado por momentos difíciles siempre han estado apoyándome y brindándome todo su amor. A mi hermano Ivan quien más que un hermano ha sido un amigo y me ha tenido la paciencia del mundo, que sin duda gran parte de este trabajo se lo debo a él, gracias Vancho.

A toda mi familia, me llevaría muchas líneas especificar a cada integrante pero todos han aportado en mi persona experiencias de vida, a los que están y a los que ya no están, este trabajo es parte de ustedes.

A Renata quien con su incondicional apoyo y amor he logrado culminar este trabajo, este logro lo comparto contigo y espero que sea uno de muchos más que podamos realizar juntos en todo este viaje.

Al Dr. Raúl Olvera quien desde pequeño lo he considerado como inspiración y me ha dejado claro el mensaje de que hay que esforzarse por tener plenitud en todos los aspectos de la vida.

Al Dr. Gabriel Betanzos quien sin dudarlo me brindó la oportunidad de realizar este proyecto y depositó su confianza en mí.

“Soy un hombre de libertad, esa es toda la fortuna que tengo”

James Douglas Morrison

AGRADECIMIENTOS

Gracias a Dios por darme la oportunidad de existir y cederme la fortuna de poder sentir en toda la extensión de la palabra. Gracias por qué has sido benévolo conmigo y me has permitido ir sumando logros en toda mi vida.

A mis papás Carlos y Mari por su incansable lucha, por dejarme bien claro el mensaje de siempre ir más allá de mis expectativas. Por todo el tiempo que invirtieron en mi persona, por los consejos, regaños y reconocimientos. En ocasiones sentí que mis padres eran demasiado duros y cuando uno encuentra las cosechas de esas vivencias, no queda más que agradecer profundamente que me hayan educado y amado como lo hicieron ustedes. Gracias, los amo papás son los mejores.

A mi hermano Ivan quien ha sido pieza clave y me ha apoyado para tener este trabajo concluido. Gracias hermano por compartir conmigo tu cariño y apoyo. Recuerda que te espero a la vuelta de la esquina.

A mi esposa Renata por todo su amor y apoyo. Agradezco a Dios por haberte puesto en mi camino, este proyecto sirve como recordatorio de nuestra historia "que cosas". Gracias niña porque formas parte de mi vida y de la forma más especial. Te amo.

Gracias a toda mi familia porque no conozco mejor familia que la que poseo. En especial a mi tío Raul quien siempre me ayudó a sobresalir y a encontrar un sentido de vivir. Gracias tío siempre pongo en práctica todos tus consejos. Agradezco al Dr. Gabriel Betanzos quien me ha apoyado para realizar este proyecto y me ha tenido mucha paciencia, gracias por la confianza que depositó en mí. Gracias "Doc." porque el trato siempre fue amigable y respetuoso.

"Si Dios conmigo quien contra mí"

Romanos VIII : 31

ÍNDICE

CONTENIDO	PAGINA
ABREVIATURAS	
1. RESUMEN	I
ABSTRACT	II
2. MARCO TEORICO	1
2.1 Diabetes	1
2.1.1 Criterio general para el diagnóstico de diabetes	1
2.1.2 Clasificación de la diabetes según ADA 2010	2
2.1.3 Diabetes y Enfermedades Cardiovasculares	3
2.1.5 Epidemiología de la diabetes en México	3
2.2 Obesidad	5
2.2.1 Definición de obesidad	5
2.2.2 Clasificación de la obesidad	5
2.2.3 Obesidad como factor de riesgo	6
2.2.4 Tratamiento de la obesidad	6
2.2.5 Epidemiología de la obesidad en México	7
2.4 Paraoxonasa 1 (PON1)	8
2.2.3 Distribución de la PON1	9
2.2.4 Papel protector de la PON1	9
2.2.5 PON1 y su relación con las ECV	10
3. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	11
4. JUSTIFICACIÓN	12
5. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	13
5.1 Objetivo General	13
5.2 Objetivos Específicos	13
6. HIPÓTESIS	13
7. MATERIALES Y MÉTODOS	14
7.1 Animales y dietas	14
7.2 Inducción de diabetes por estreptozotocina (STZ)	15

7.3	Sacrificio	16
7.4	Medición de la actividad de la PON1 en suero sanguíneo	16
7.5	Ganancia de peso	16
7.6	Medición de indicadores bioquímicos	17
7.7	Análisis estadístico	17
8.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	18
8.2	Actividad de PON1	18
8.2.1	Actividad de PON1 grupo C contra STZ	18
8.2.2	Actividad de PON1 grupo C contra STZ-OB	19
8.2.3	Actividad de PON1 grupo C contra OB	20
8.2.4	Actividad de PON1 grupo C contra BP	21
8.2.5	Actividad de PON1 acumulada	23
8.2.6	Actividad de PON1 inicial contra final	24
8.3	Indicadores bioquímicos	25
8.3.1	Concentración de glucosa	25
8.3.2	Concentración de colesterol	27
8.3.3	Concentración de Triglicéridos	28
8.4	Peso corporal	29
9.	CONCLUSIONES	31
10.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	32

ABREVIATURAS

° C: Grados centígrados

μl: Microlitros

ADA: Asociación Americana de Diabetes

BP: Bajo en proteínas

C: Control

dL: Decilitro

DT1: Diabetes Tipo 1

DT2: Diabetes Tipo 2

ECV: Enfermedades cardiovasculares

EE: Error Estandar

ENSA: Encuesta Nacional de Salud

ENSANUT: Encuesta Nacional de Salud y Nutrición

g: Gramos

HDL: Lipoproteínas de alta densidad

IMC: Índice de Masa Corporal

kDa: Kilodaltones

Kg: Kilogramo

LCAT: Aciltransferasa colesterol/lecitina

LDL: Lipoproteínas de baja densidad

mg: Miligramo

min: Minutos

mL: Mililitros

mM: Milimolar

nm: Nanómetro

OB: Obeso

OMS: Organización Mundial de la Salud

PAF-AH: Factor Activador de Plaquetas Acilhidrolasa

pb: Pares de bases

pH: Potencial de Hidrógeno

PON1: Paraoxonasa 1

rpm: Revoluciones por minuto

STZ: Diabético inducido por estreptozotocina

STZ-OB: Combinación de diabético inducido y obeso

VET: Valor Energético Total

VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad

1. RESUMEN

La diabetes se asocia a un nivel elevado de estrés oxidativo, susceptibilidad a enfermedad coronaria y disminución de concentración de Paraoxonasa1 (PON1) y de su actividad. La PON1 sérica humana (arildialkilfosfatasa; EC 3.1.8.1) es una esterasa dependiente de calcio y está asociada fuertemente con lipoproteínas de alta densidad (HDL) en el plasma. Inicialmente se describió por su acción hidrolítica de compuestos organofosforados, posteriormente adquirió relevancia por sus propiedades antioxidantes sobre las LDL y es quizá el mecanismo principal de inhibición de la oxidación de las HDL, procesos directamente involucrados en la fase inicial de la aterosclerosis. El presente estudio evaluó el efecto de diferentes tipos de dieta sobre la actividad de la PON1 en suero de ratas Wistar diabéticas-inducidas por estreptozotocina (STZ) (un modelo de diabetes tipo 1). Se utilizaron 150 ratas Wistar macho entre 80 y 100 g de peso. Se formaron aleatoriamente 5 grupos con 30 animales cada uno. Un grupo control (C) que recibió una dieta comercial para roedores al igual que el grupo 2 (STZ) que fue diabetizado con STZ (60 mg/Kg peso); el grupo 3 (OB) recibió una dieta comercial adicionada con manteca de cerdo. El grupo 4 (STZ-OB) se diabetizó y recibió la misma dieta que el grupo 3 y el grupo 5 (BP) que recibió una dieta baja en proteínas (6% proteína en 100 g de alimento). Se obtuvo suero sanguíneo de 5 animales de cada grupo al inicio y cada mes hasta 5 meses, donde se determinó la actividad de la PON1, usando como sustrato al paraoxón. Adicionalmente se midieron glucosa, colesterol, triglicéridos y peso del animal en cada uno de los sacrificios. Los grupos STZ+OB, OB y BP presentaron menor actividad enzimática con respecto al grupo control (342.9 ± 40 , 311.2 ± 31.4 , 193.3 ± 12.9 contra 548.7 ± 28.5 con un valor de $p < 0.05$). Así mismo los grupos con menor actividad de la PON1 presentaron niveles altos de glucosa y triglicéridos respecto al grupo C. Los resultados sugieren que la alta ingesta de grasas y la reducción del aporte proteico en la alimentación modifican la actividad de la PON1 posiblemente por cambios en la expresión del gen de PON1. Así mismo los animales que son alimentados con grasas en la dieta disminuyen la actividad de la PON1 independientemente a la presencia de diabetes.

Palabras clave: diabetes, aterosclerosis, paraoxonasa, actividad enzimática, dietas.

ABSTRACT

Diabetes is associated with a high oxidative stress, coronary heart disease susceptibility, reduction of serum Paraoxonase 1 concentration and activity in serum. Human PON1 serum (aryldialkylphosphatase; EC 3.1.8.1) is a dependent calcium esterase and associate strongly with high density lipoproteins (HDL) in plasma. In the beginning, PON1 was described by its capability of hydrolyzing organophosphate compounds, and then acquired relevance by its antioxidants properties on LDL, probably the main mechanism of inhibition HDL oxidation, processes directly involved in the initiation in the developing of atherosclerosis. The present work evaluated the effect of different diets on serum PON1 activity in streptozotocin-induced diabetic Wistar rats by streptozotocin (STZ). 150 male Wistar rats of 80-100 g of weight were randomly divided into 5 groups with 30 animals each. The control group (C) and diabetic-induced (STZ) received a commercial diet; group 3 (OB) received a diet high in saturated fat. Group 4 (STZ-OB) was diabetic-induced and received the same diet as group 3, and the group 5 (BP) which received a low protein diet (6% protein in 100g food). Five animals of each group were sacrificed at the beginning and monthly up to fifth month, serum was obtained from blood where PON1 activity were measured, using paraoxon as substrate. Additionally glucose, cholesterol, triglycerides levels and weight were measured. STZ+OB, OB and BP groups displayed enzymatic activity lower than control group ($342,9 \pm 40$, $311,2 \pm 31,4$, $193,3 \pm 12,9$ against $548,7 \pm 28,5$ with $p < 0.05$). Also the groups with low PON1 activity presented high glucose and triglycerides levels compared to group C. These results suggest that a high-fat ingest and a low ingest of protein could modify PON1 activity possibly by changes in PON1 gene expression. Likewise, the animals that were fed with saturated fats showed decreased PON1 activity with or without the presence of diabetes.

Key words: diabetes, atherosclerosis, paraoxonase, enzymatic activity, diets.

2. MARCO TEORICO

2.1 Diabetes

La diabetes es una enfermedad crónica no transmisible progresiva en la que el organismo no produce insulina, o no es empleada de manera adecuada causada por la disfunción celular aguda o crónica del páncreas.^{1,2}

En México la mortalidad por enfermedades crónicas no transmisibles se ha incrementado en las últimas décadas, a grado tal que la diabetes y las enfermedades cardiovasculares se encuentran entre las primeras cinco causas de mortalidad.³⁻⁵

La diabetes es un síndrome complejo que afecta el metabolismo de los carbohidratos, los ácidos grasos, los aminoácidos y otros nutrimentos, y puede tener secuelas de diversa gravedad.⁶

Desde que se descubrió por vez primera, esta enfermedad ha estado estrechamente vinculada con la alimentación, y aunque a lo largo del tiempo las recomendaciones dietéticas han sufrido variaciones, el tratamiento nutricional es siempre un elemento fundamental en su terapia.⁷ Para esto es de gran importancia conocer cuando se puede diagnosticar la presencia de esta enfermedad.

2.1.1 Criterio general para el diagnóstico de diabetes

El principal criterio para el diagnóstico de diabetes es una concentración de glucosa en sangre en ayunas mayor a 126 mg/dL.⁸ Las personas con concentraciones irregulares de glucosa en sangre sin rebasar los 126 mg/dL, tienen un mayor riesgo de presentar diabetes tipo 2 (DT2), enfermedad cardíaca, ataque cerebral y presentan alguna de estas alteraciones:

- **Prediabetes** (100 a 125 mg/dL)
Alteración de la tolerancia a la glucosa (glucosa en ayunas menor que 126 mg/dL y un nivel de glucosa de entre 140 y 199 mg/dL dos horas después de haberse realizado la prueba oral de tolerancia a la glucosa).⁹⁻¹¹

2.1.2 Clasificación de la diabetes según ADA 2010

La clasificación de diabetes según la Asociación Americana de Diabetes incluye cuatro clases clínicas.¹²

A. Diabetes tipo 1 (DT1)

Es la destrucción de las células- β del páncreas, usualmente conduciendo a una deficiencia absoluta de insulina. Las personas que padecen este tipo de diabetes, generalmente son delgadas y sus síntomas comienzan de modo repentino antes de los 30 años de edad (sin embargo, pueden aparecer en cualquier edad) y dependen de la insulina exógena para evitar la cetoacidosis y la muerte.

B. Diabetes tipo 2 (DT2)

Predomina la resistencia a la insulina, con relativa deficiencia y defectos en la secreción de la insulina. Los individuos generalmente son obesos y tienen más de 30 años para la fecha del diagnóstico. No dependen de insulina exógena para sobrevivir pero a veces la necesitan para un control adecuado de su glucemia.

C. Otros tipos específicos de diabetes

- defectos genéticos en la función de las células beta
- defectos genéticos en la acción de la insulina
- enfermedades endócrinas del páncreas
- endocrinopatías
- diabetes inducida por fármacos o químicos
- diabetes inducida por infecciones.
- diversos síndromes genéticos que se asocian con diabetes

D. Diabetes gestacional.

Alteración del metabolismo de los hidratos de carbono, de severidad variable, que se inicia o se reconoce por primera vez durante el embarazo.

La DT1 se diagnostica generalmente en niños y adultos jóvenes.¹³ En el tipo 1, el páncreas produce cantidades insuficientes de insulina o no la produce.¹ La DT2 es la forma más común, con mayor frecuencia aparece en adultos de mediana edad, sin embargo, actualmente los adolescentes y adultos jóvenes la presentan con mayor frecuencia.^{14,15} Tanto la DT1 como la DT2 pueden ser hereditarias.

Los antecedentes familiares de diabetes pueden aumentar significativamente el riesgo de aparición de la enfermedad y a su vez la diabetes en su fase aguda puede presentar complicaciones como: retinopatía, nefropatías, neuropatías, amputación de extremidades y enfermedades cardiovasculares (ECV).¹⁶

2.1.3 Diabetes y Enfermedades Cardiovasculares

Las personas con diabetes frecuentemente experimentan cambios en los vasos sanguíneos que les llevan a la enfermedad cardiovascular. En las personas con diabetes, el revestimiento de los vasos sanguíneos puede engrosarse, haciendo que el flujo de la sangre a través de estos sea difícil. Cuando el flujo de la sangre se deteriora, menos nutrientes se llevan a los órganos, dando como resultado la cardiopatía o la embolia cerebral. Los vasos sanguíneos también pueden sufrir daños en otras partes del cuerpo debido a la diabetes, llevando a problemas en los ojos, en los riñones, y a la circulación pobre en las piernas y en los pies.¹⁷ La DT2 por lo general es consecuencia de la resistencia a la insulina. Cuando la resistencia a la insulina o la diabetes se presentan con otros factores de riesgo para la ECV (obesidad, presión arterial alta, colesterol anormal y triglicéridos altos), el riesgo de enfermedad cardíaca y ataque cerebral aumenta aún más.¹⁸

La resistencia a la insulina se asocia a la aterosclerosis (acumulaciones de grasa en las arterias) y a la enfermedad coronaria, incluso antes del diagnóstico de diabetes,¹⁹ por eso es importante prevenir y controlar la resistencia a la insulina y la diabetes. La obesidad y los malos hábitos alimentarios son factores de riesgo importantes que pueden desarrollar resistencia a la insulina, la diabetes y ECV.²⁰

2.1.4 Epidemiología de la diabetes en México

De acuerdo con las cifras de 2005, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que en el mundo hay más de 180 millones de personas con diabetes y muy probablemente, de no mediar intervención alguna, para 2030 se habrá más que duplicado. Según la OMS Casi el 80% de las muertes por diabetes se producen en países de ingresos bajos o medios.²¹

La ENSANUT 2006, señala que en México la prevalencia de diabetes por diagnóstico médico previo en adultos mayores de 20 años de edad se ha incrementado de 4.6% en 1993, 5.8% en 2000 a 7% en 2006.²²

Para el caso del estado de Hidalgo, la ENSANUT 2006 reporta que el 22.3% de los adultos de 20 años de edad o más acudieron en el año previo a la encuesta, para practicarse las pruebas de detección de diabetes a través de la determinación de glucosa en sangre (venosa o capilar), ubicando al Estado con este porcentaje arriba de la media Nacional (21%) presentando incrementos importantes para los servicios de detección en los últimos seis años.²³

La prevalencia de diabetes por diagnóstico médico previo en los adultos mayores de 20 años de edad o más para Hidalgo fue 7.1%, siendo mayor en mujeres (7.9%) que en hombres (5.9%). Para el grupo de edad de 60 años o más esta prevalencia fue de 19.1%.

El estado de Hidalgo presentó un ligero incremento de 5.5 a 7.1% de diagnósticos médicos en la prevalencia de diabetes en el 2006, comparando con lo reportado en la Encuesta Nacional de Salud 2000.^{24,25,26} En la actualidad se tiene que al año se registran 40 mil defunciones causadas por la diabetes.²⁷

Las muertes que ocurren cada año en México a causa de la DT1 y DT2 están relacionadas fundamentalmente con las complicaciones, entre las que destacan, por su frecuencia, la nefropatía, seguida de los trastornos de la circulación periférica, reflejando que la letalidad por complicaciones agudas ha disminuido con el uso de la insulina y de los hipoglucemiantes orales, los cuales han permitido la sobrevivencia de los enfermos por más tiempo, pero a la vez han propiciado el incremento de las complicaciones crónicas.²⁸

La mayoría de los casos de diabetes que se diagnostican en el país presentan la DT2 y es frecuente que muchos de los pacientes con este padecimiento no se den cuenta de su hiperglucemia durante varios años. Esta elevación silenciosa, persistente e inadvertida de la glucosa favorece la presencia de las complicaciones, ya que retarda el tratamiento, y el daño de los vasos sanguíneos inicia, por lo menos,

entre cuatro y siete años antes de que aparezcan los síntomas, con lo cual se incrementa el riesgo de complicaciones crónicas y con ellas de la muerte temprana que en los enfermos de diabetes es dos a cuatro veces mayor que la población general.²⁹ Sumando a esto las altas cifras de obesidad que se han reportado recientemente colocando a México como el país con serios problemas al respecto, el panorama luce desalentador.

2.2 Obesidad

2.2.1 Definición de obesidad

La obesidad se define como una acumulación excesiva de grasa en el cuerpo, hipertrofia general de tejido adiposo y es una condición patológica en la cual las reservas naturales de energía, almacenadas en el tejido adiposo de los humanos y otros mamíferos³⁰, se incrementa hasta un punto donde está asociado con ciertas condiciones de salud o un incremento de la mortalidad.³¹ Es un factor de riesgo conocido para enfermedades crónicas como: enfermedades cardíacas, diabetes, hipertensión arterial y algunas formas de cáncer.³² La evidencia sugiere que se trata de una enfermedad de origen multifactorial: genético, ambiental, psicológico entre otros.³³ Es una enfermedad crónica originada por muchas causas y con numerosas complicaciones y una forma de diagnosticar la obesidad es cuando el índice de masa corporal (IMC) en el adulto es mayor de 30 kg/m² según la OMS.

Aunque la obesidad es una condición clínica individual se ha convertido en un serio problema de salud pública que va en aumento: se ha visto que el peso corporal excesivo predispone para varias enfermedades, particularmente enfermedades cardiovasculares, DT2, apnea del sueño y osteoartritis.³⁴

2.2.2 Clasificación de la obesidad

Según el origen de la obesidad, ésta se clasifica en los siguientes tipos. Obesidad exógena (la obesidad debida a una alimentación excesiva) y obesidad endógena (la provocada por alteraciones metabólicas). Dentro de las causas endógenas, se habla de obesidad endocrina cuando está provocada por disfunción de alguna glándula

endocrina, como la tiroides y es menos frecuente, pues sólo entre un 5 y un 10% de los obesos lo son debido a estas causas. Este tipo de obesidad es debida a problemas como el hipotiroidismo, el síndrome de Cushing, problemas con la insulina, la diabetes, el síndrome de ovario poliquístico o el hipogonadismo, entre otros³⁵

La obesidad como tal, es una enfermedad en la cual están implicados diferentes factores, los genes, el ambiente, el sedentarismo, dieta habitual y hábitos y costumbres, todos condicionantes básicos que están implicados en la aparición de la misma.³⁶

2.2.3 Obesidad como factor de riesgo

La obesidad se ha vinculado con un riesgo mucho más elevado de enfermedad coronaria y con tres de sus principales factores de riesgo: la hipertensión arterial, la diabetes de comienzo en la edad adulta y las concentraciones elevadas de lípidos en sangre.³⁷

Ciertos tipos de cáncer se han asociado con personas obesas que en las que no lo son, tales como el cáncer de mama, útero y ovarios en las mujeres y cáncer de colon, recto y próstata en los varones. Los trastornos menstruales son también más frecuentes en las mujeres obesas y la enfermedad de la vesícula biliar se produce con el triple de frecuencia en ellas.³⁸

2.2.4 Tratamiento de la obesidad

Para perder peso, las personas obesas deben consumir menos calorías que las que gastan. Los regímenes, por lo general, se consideran menos importantes que los cambios permanentes en los hábitos alimentarios y de ejercicio físico.³⁹ De un modo creciente, los médicos han comenzado a prescribir fármacos para perder peso y generalmente, estos fármacos reducen el peso en un 10% aproximadamente en el término de 6 meses y mantienen dicha reducción mientras se sigue tomando el fármaco. Cuando el fármaco se interrumpe, se recupera rápidamente el peso.

La cirugía se aplica en estos casos para reducir el tamaño del estómago, de modo que disminuya la cantidad de alimento que se puede ingerir de una vez; este procedimiento quirúrgico puede producir pérdidas de peso muy notables, que alcanzan habitualmente la mitad del exceso de peso de la persona, por lo general de 36 a 68 Kg.⁴⁰

En general la pérdida de peso disminuye la presión arterial en la mayoría de las personas que tienen hipertensión arterial y permite a más de la mitad de las personas que desarrollan diabetes suprimir la insulina u otro tratamiento farmacológico.³⁷

2.2.5 Epidemiología de la obesidad en México

Diversos estudios señalan que México se encuentra en transición epidemiológica, proceso en el cual se observa un descenso dramático de la mortalidad por enfermedades infecciosas, y un aumento marcado en la mortalidad por enfermedades crónicas no transmisibles⁴¹ (Tabla 1).

Tabla 1. Distribución porcentual de causas de mortalidad general en México 1931 y 2004. Tomando como referencia las estadísticas de mortalidad de hace 80 años en contraste con datos recientes, es claro notar la transición epidemiológica tan marcada entre enfermedades infecciosas y crónico no transmisibles.

ENFERMEDAD	1931 (%)	2004 (%)
Enfermedades cardiovasculares	1.71	15.9
Enfermedades cerebrovasculares	0.6	12.7
Tumores malignos	0.1	11.3
Diabetes	1.0	5.8
Enfermedades infecciosas y parasitarias	6.5	2.1
Enfermedades gastrointestinales	19.5	0.95

Tomado de: Sánchez P., Pichardo E. y López R. 2004. Epidemiología de la obesidad. *Revista Gaceta Médica de México*. 140-(2) 3-17.

El país ha experimentado un descenso en sus tasas de mortalidad y morbilidad por enfermedades infecciosas, y un aumento relativo en enfermedades crónicas a partir de los años cincuenta.²⁶

En México, en general, se ha prestado mayor atención a los problemas de desnutrición que a los de mala nutrición por exceso. Sin embargo, los cambios que el país ha experimentado y el proceso de transición epidemiológica por el cual atraviesa, indican que la malnutrición por exceso también puede constituir un problema de salud pública importante. La creciente urbanización y el desarrollo económico producen cambios en las condiciones y en los estilos de vida. Estos cambios pueden generar modificaciones en la dieta y en los patrones de actividad física de la población, lo que puede aumentar el riesgo de obesidad.⁴²

Actualmente existen diversas opciones para combatir no solo la obesidad sino todo un conjunto de enfermedades que suelen ir conjugadas entre sí; a partir de esto, han surgido ramas de estudio para conocer afondo estos problemas. Puntualizando, el estudio del efecto de los nutrientes y componentes de diversos alimentos han adquirido relevancia para conocer posibles mecanismos de defensa con los que cuenta el organismo para contrarrestar estas enfermedades. La paraoxonasa 1 y el efecto que tienen distintos tipos de dietas insalubres tienen cabida con la descripción anterior.

2.3 Paraoxonasa 1 (PON1)

La PON1 es miembro de una familia de proteínas que incluye también a la PON2 y la PON3⁴³. La PON1 y la PON3 forman parte de las partículas de HDL, mientras que la PON2 se encuentra en una gran variedad de tejidos, como las células endoteliales, las células musculares lisas y los macrófagos. El mecanismo de acción de la familia de la PON aún no está claro. La PON1 tiene una actividad esterasa hacia varios sustratos como el fenilacetato y el paraoxón, mientras que la PON2 y la PON3 muestran una elevada actividad lactonasa^{58,44}.

La PON1 sérica humana (arildialkilfosfatasa; EC 3.1.8.1) es una esterasa dependiente de calcio sintetizada en hígado y está asociada fuertemente con lipoproteínas de alta densidad (HDL).^{45, 46} La PON1 es una glicoproteína de 44 kDa localizada en la superficie de la HDL y pertenece a una familia multigénica codificados por los genes PON1, 2, 3 localizados en el cromosoma 7 región q21.3.⁴⁷

La PON1 ha sido ampliamente estudiada en el campo de la toxicología por su capacidad de hidrolizar compuestos organofosforados de los cuales están incluidos productos metabólicos ampliamente usados como pesticidas.⁴⁸

2.3.1 Distribución de la PON1

El producto de expresión es detectado a través del suero de hígado así como en otros tejidos tales como los riñones y el intestino delgado, su concentración sérica es de alrededor de 50 mg/dL.⁴⁹ En el suero, la mayor parte de esta enzima está asociada con las partículas HDL, pero un nivel bajo de PON1 fue observado también en las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y en los quilomicrones postprandiales (Tabla 2).

Tabla 2. Principales características funcionales de los productos génicos de *PON1*, *PON2* y *PON3* indicando los tejidos donde se expresan.

	PON1	PON2	PON 3
Presenta actividad paraoxonasa / arilesterasa	Si	No se ha observado	Débil
Presenta actividad tiolactonasa	Si	No se ha observado	Si
Circula asociada a HDL	Si	No	Si
Protege LDL de la oxidación	Si	Si	Si
Expresión y distribución	Hígado, suero	Hígado, cerebro, riñón	Hígado, placenta, pulmón, testículos

Tomado de: Primo-Parmo, SL. et al. 1997. The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of multigene family. *Genomics*;33:498-507.

2.3.2 Papel protector de la PON1

Existen estudios que proponen a la PON1 como responsable de la inhibición del proceso oxidativo^{50,44} y contribuye a la protección antioxidante conferida por las HDL en la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) hidrolizando productos de la peroxidación lipídica⁴⁴. El efecto de las HDL unidas a PON1 o de la enzima aislada y purificada en el proceso de oxidación de las LDL, incluyendo su fase de

iniciación (formación de dienos conjugados), de propagación (formación de peróxido) y de descomposición (formación de aldehídos) puede ser analizado usando inhibidores específicos.⁵¹

La habilidad de PON1 para inhibir la oxidación de las lipoproteínas y también para reducir los peróxidos asociados a las lipoproteínas, se debe a dos propiedades. Primero, la enzima previene la acumulación de lípidos oxidados y segundo, usa y elimina las lipoproteínas oxidadas preformadas. Ambos efectos pueden resultar de su habilidad para hidrolizar peróxidos de lipoproteínas específicas durante la oxidación lipoproteica.⁵²

2.3.3 PON1 y su relación con las ECV

También se ha propuesto que la PON1 puede proteger contra la enfermedad cardiovascular, ya que como se mencionó, previene la formación de HDL oxidadas y LDL; también hidroliza la tiolactona de la homocisteína, lo cual altera las proteínas de la pared arterial.^{51,53} Asimismo, es capaz de hidrolizar el factor activador de plaquetas, que es un fosfolípido involucrado en el desarrollo de la enfermedad vascular.⁵⁴

Diversos estudios sugieren que un bajo nivel de actividad en plasma de esta enzima se encuentra asociada con un incremento en la prevalencia de aterosclerosis y puede ser un factor independiente para eventos coronarios.^{55,56} Ratones *knock out* del gen de la PON1 son más susceptibles a la oxidación de las lipoproteínas y aterosclerosis⁵⁷, mientras que los ratones transgénicos que sobreexpresan PON1 muestran un decremento en las lesiones ateroscleróticas.⁵⁸

Bajo estrés oxidativo, no sólo las LDL son susceptibles a la peroxidación lipídica, todos los lípidos séricos, incluyendo aquellos presentes en las HDL, también están propensos a la oxidación. Las enzimas asociadas a las HDL diferentes a la PON1, como la acetiltransferasa colesterol/lecitina (LCAT) y el factor activador de plaquetas acilhidrolasa (PAF-AH) están implicadas en las propiedades antioxidantes de las HDL.⁵⁹

3. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

La diabetes comprende un conjunto de enfermedades de etiología variable, caracterizadas por la elevación plasmática de glucosa y la predisposición al desarrollo de complicaciones crónicas macro y microvasculares, debido a defectos en la síntesis, secreción y/o acción de la insulina, así como a posibles alteraciones en la producción hepática de glucosa.⁶⁰

En la actualidad, la diabetes representa un problema de salud pública a nivel mundial con una prevalencia estimada del 95%. Además, en nuestra población 1 de cada 10 pacientes manifiestan la enfermedad antes de los 40 años de edad, representando el grupo con mayor riesgo de desarrollar complicaciones crónicas.⁶¹

Por su parte las enfermedades cardiovasculares (ECV) constituyen la primera causa de muerte en los países desarrollados. La hipótesis de la peroxidación de las LDL como mecanismo desencadenante del proceso aterosclerótico ha promovido estudios a fin de conocer los sistemas de que dispone el organismo para incrementar la defensa antioxidante y, por tanto, tener mecanismos de defensa contra esta enfermedad. Entre ellos se encuentra la enzima Paraoxonasa. Esta enzima está principalmente relacionada con las HDL y parece contribuir al mantenimiento y recuperación de la estructura y estado antioxidativo de las LDL. Estudios de casos y controles han encontrado una asociación entre el hábito de fumar y una disminución de la actividad PON1 en el suero de pacientes con enfermedad cardiovascular. También se ha observado que extractos de humo de tabaco inhiben la actividad PON1 *in Vitro*.⁶²

Actualmente se han realizado estudios que demuestran variaciones en la actividad de la PON1 en pacientes diabéticos y sanos⁶³, sin embargo existe aun la necesidad de conocer si esta actividad es modificada o alterada por factores ambientales, de estilo de vida o nutricios. Por lo que en este trabajo se evaluó la actividad de la PON1 en un modelo animal diabetizado y alimentado con dietas insalubres para el humano.

4. JUSTIFICACIÓN

La actividad o concentración de PON1 en suero varían notablemente tanto en la población general como en pacientes afectados de varias enfermedades, lo cual dificulta la interpretación clínica de sus resultados. En individuos normales se ha encontrado variaciones de hasta 40 veces en la actividad PON1⁶⁴. Desde hace años se sabe que estas grandes variaciones están influidas básicamente por los distintos por los distintos polimorfismos del gen PON1 pero recientemente se investigan si factores, ambientales, nutrimentales o estilo de vida pueden contribuir a estas variaciones. El efecto de la dieta ha sido investigado por varios estudios de intervención y por estudios poblacionales. Se ha descrito que el consumo de cantidades considerables de zumo de granada puede aumentar la actividad PON1.⁶⁵ Sin embargo, diversos estudios poblacionales no han encontrado asociaciones claras entre factores nutricionales y la actividad de la PON1. El empleo de un modelo animal diabetizado, condicionado a un ambiente homogéneo y sujeto a diversos tratamientos nutricios nos permite conocer más a fondo el efecto que tienen determinado tipo de dietas sobre la actividad de la PON1, situación que difícilmente podríamos evaluar en humanos. Algunos autores han propuesto el tratamiento con PON1 humana como una alternativa terapéutica a considerar en el futuro para tratar secuelas de la DT2 como lo son las ECV.

La posibilidad de incrementar mediante farmacoterapia y/o dietoterapia la actividad paraoxonásica ofrece nuevas perspectivas de actuación a la hora de tratar y prevenir las ECV. Por lo que en este estudio se pretende conocer si determinados tipos de dietas pueden influir directamente en los niveles y actividad de PON1 y así conocer e identificar posibles tipos de dietas que se relacionen directamente con la actividad de la PON1.

5. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

5.1 Objetivo General

Determinar el efecto de diferentes tipos de dieta sobre la actividad de la Paraoxonasa 1 (PON1) en suero de ratas Wistar diabéticas-inducidas.

5.2 Objetivos Específicos

- Conocer la influencia que tienen dietas aterogénicas y baja en proteínas sobre la actividad de la PON1 en ratas diabéticas.
- Encontrar la relación entre la actividad de la PON1 con diferentes indicadores bioquímicos en ratas diabetizadas alimentadas con diferentes dietas.
- Establecer, la asociación de la actividad de la PON1 con los diferentes tratamientos empleados en el trabajo.

6. HIPÓTESIS

La actividad de la PON1 se encuentra disminuida en ratas diabéticas y alimentadas con dieta abundante en grasas saturadas comparada con ratas alimentadas con contenido bajo en proteína y sanas.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

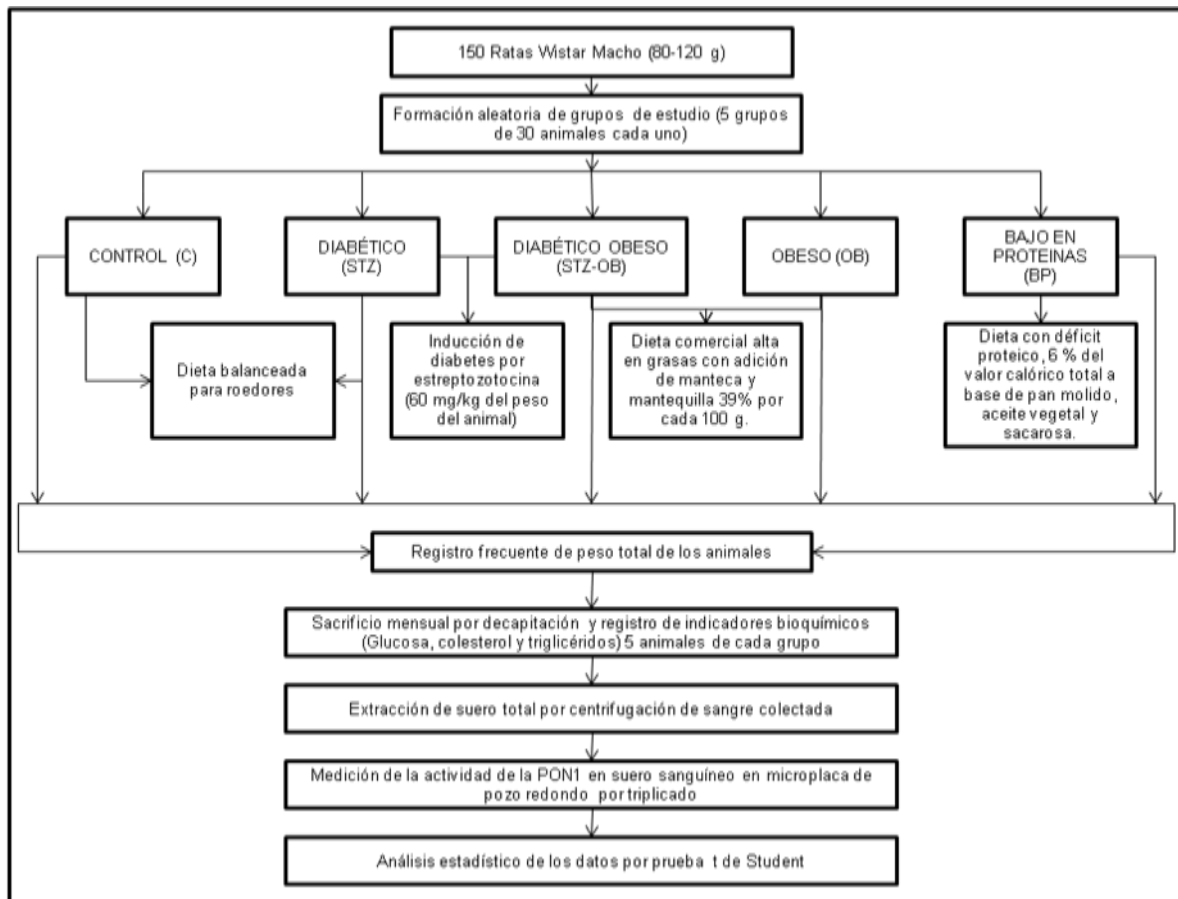


Figura 1. Esquema general del proceso metodológico.

7.1 Animales y dietas

El experimento se realizó con 150 ratas Wistar macho de entre 80 y 100 g de peso (Figura 2). Los animales se mantuvieron en jaulas a temperatura y ciclo de luz controlados, agua *ad libitum* y durante una semana se alimentaron con alimento comercial no purificado (Harlan Teklad, 18% de proteína) para tener homogeneidad en el tipo de alimentación. Posteriormente, se formaron aleatoriamente 5 grupos con 30 animales cada uno, el grupo 1 (control) se alimentó con una dieta comercial balanceada para roedores (Harlan Inc), el grupo 2 (STZ) se le indujo diabetes con estreptozotocina (Sigma, Co) a razón de 60 mg/Kg peso y recibió la misma dieta que

el grupo 1; el grupo 3 (OB) recibió una dieta obesigénica a base de un alimento comercial (Purina Nucleus) alto en grasa con 18% del valor energético total (VET) y adicionado con grasas saturadas, donde se incluyeron manteca de cerdo y mantequilla, el grupo 4 (STZ-OB) se le indujo diabetes y recibió la misma dieta que el grupo 3 y el grupo 5 (BP) una dieta baja en proteínas 6% proteína del VET a base de pan molido y azúcar como fuente de carbohidratos y proteínas y aceite vegetal como fuente de lípidos. Las dietas adicionadas con grasas saturadas y baja en proteínas fueron calculadas y elaboradas en el laboratorio de Nutrición (ICSA-UAEH) a razón de 100 gramos de peso total (Tabla 3).

Tabla 3. Composición nutrimental de las distintas dietas empleadas en el experimento calculadas por 100 gramos de alimento.

Nutrimento por 100 g de alimento	Alimentos empleados en el experimento				
	Harlan Teklad para roedores		Purina nucleus (Adicionado con manteca de cerdo y mantequilla)		Alimento bajo en Proteínas
	CONTROL	STZ	OB	STZ-OB	BP
Fibra	5 g		3 g		0.6 g
Energía	330 Kcal.		648 Kcal.		500 Kcal.
Hidratos de carbono	69 g		30.7 g		81.25 g
Proteínas	19 g		11 g		7.5 g
Grasas totales	6 g		53.5 g		10.5 g
Otros	1 g		1.8 g		0.15 g

7.2 Inducción de diabetes por estreptozotocina (STZ)

La estreptozotocina es una nitroso-urea natural aislada del *Streptomyces achromogenes*. Es un agente alquilante monofuncional que posee afinidad especial por las células β del páncreas y tiene un efecto antigluconeogénico, de tal manera que es tóxico para las mismas.⁶⁶

Los grupos STZ y STZ-OB se trataron con una dosis de estreptozotocina a razón de 60 mg/Kg peso por vía intraperitoneal en regulador de citratos a 0.1 M pH 4.5. Antes y una semana después del tratamiento se midieron niveles de glucosa para verificar que los animales se diabetizaron.

7.3 Sacrificio

Se sacrificaron cada 30 días 5 animales por cada grupo de estudio por decapitación. De cada muestra se obtuvo la sangre total y una vez coagulada se centrifugó a 5000 rpm por 7 minutos para obtener el suero sanguíneo, el cual se congeló inmediatamente para su posterior medición de la actividad de la PON1.

7.4 Medición de la actividad de la PON1 en suero sanguíneo

La medición de la actividad de la PON se realizó mediante un método semi-automatizado recientemente reportado⁶⁷, el cual emplea un sistema de medición en microplaca de 96 pozos y un lector de micro-placas (Bio-Tek Junior). La programación de los parámetros dentro del lector fueron los siguientes: Modo cinético, filtro de 405 nm, tiempo log 0.42 min, intervalo de tiempo 0.5 min, tiempo total de medición 3 min. La temperatura de medición de la actividad fue a temperatura entre 24.5-25.5 °C.

Básicamente, el método consistió en adicionar 10 µL del suero en una columna de la microplaca (8 pozos), se agregaron 0.2 mL del sustrato de paraoxón (3.3 mM), mismo que debe prepararse en el momento de su uso, el cual consiste en agregar paraoxón a un regulador conteniendo 2 mM de CaCl₂ y 100 mM de Tris pH= 8.0. Cabe mencionar que el pH es muy importante, debido a que otras actividades hidrolíticas del paraoxón pueden ocurrir a pH mayores de 8.5. Como muestras blanco, se agregaron 0.2 mL del sustrato de paraoxón en otra columna de pozos. Una vez preparadas las mezclas, la microplaca es colocada en lector Bio-Tek y la medición será efectuada. Los valores de absorbancia a 405 nm fueron capturados y procesados (incluyendo el factor de corrección de paso de luz) por el mismo lector para tener valores expresados en nmol·min⁻¹·mL⁻¹.

7.5 Ganancia de peso

Se tomaron lecturas de peso corporal cada tres días desde el inicio del proyecto hasta el final del mismo con la finalidad de observar cambios en la ganancia o

perdida de peso en los distintos grupos de estudio. De la misma forma se tomó peso previo a la realización de cada sacrificio.

7.6 Medición de indicadores bioquímicos

Previo al inicio de cada sacrificio fue retirado el alimento a los animales para el sacrificio 8 horas antes con la finalidad de obtener lecturas de glucosa, colesterol y triglicéridos. La medición de indicadores bioquímicos se realizó mediante un microlector (Roche; Accutrend CGT) empleando tiras reactivas que reaccionan con el suero generando un producto colorido. La intensidad del color es proporcional a la cantidad de glucosa y triglicéridos presentes.

7.7 Análisis estadístico

Los resultados de las diferentes mediciones fueron promediados por cada periodo de sacrificio y se obtuvo el error estándar (EE). Por tratarse de grupos de estudios estadísticamente pequeños se realizó un análisis estadístico *t de Student* para observar diferencias significativas entre los distintos tratamientos dietéticos. Los datos fueron considerados estadísticamente significativos cuando “*p*” fue menor a 0.05 ($p < 0.05$)

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.2 Actividad de PON1

Se realizó un análisis de la actividad de la enzima por cada periodo de sacrificio tomando los promedios de las lecturas de cada muestra de estudio expresado en $\text{nmolmin}^{-1}\text{mL}^{-1}$ y el error estándar de cada una de ellas.

8.2.1 Actividad de PON1 grupo C contra STZ

Se realizó un comparativo entre los valores obtenidos para el grupo C contra el grupo STZ y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas durante el periodo que comprendió el estudio y contrario lo pensado dichos grupos se comportaron de forma muy similar (Figura 2).

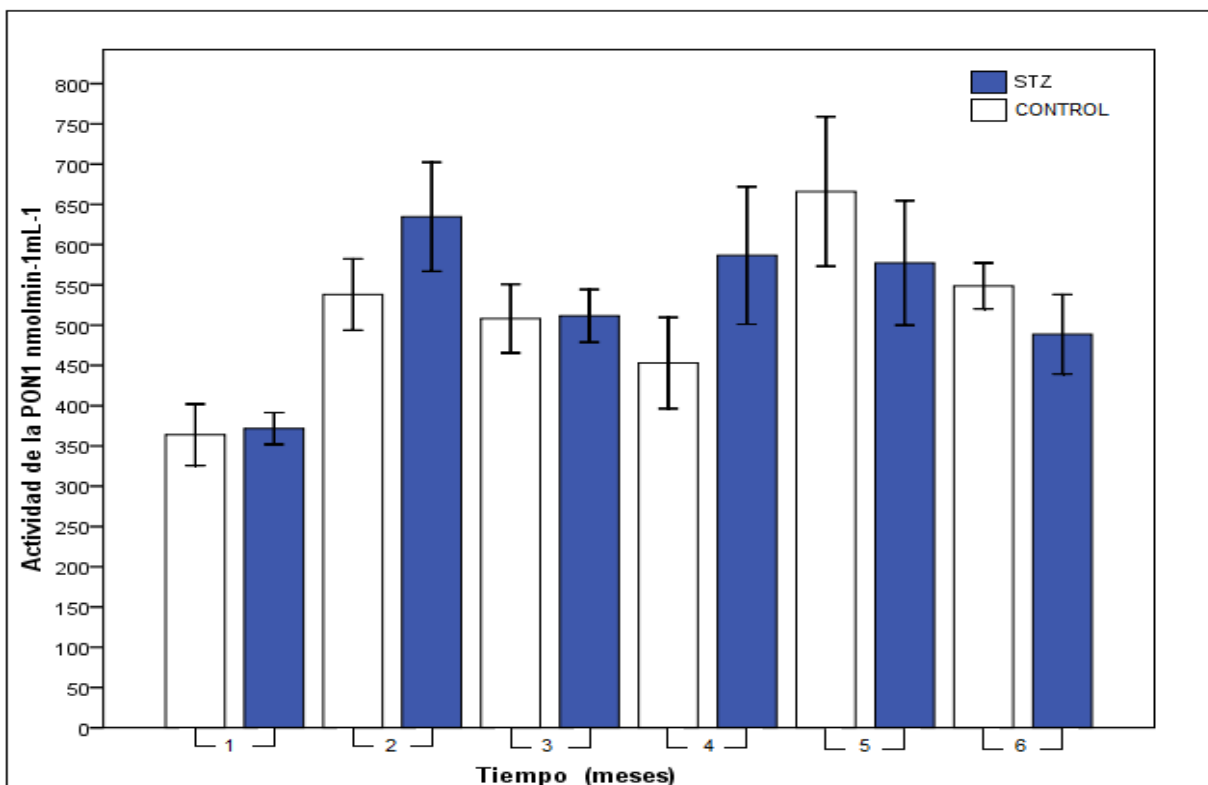


Figura 2. Comparativo de actividad enzimática de la PON 1 para los grupos C y STZ. Ambos grupos presentaron valores similares entre ellos a lo largo del experimento, aunque a partir del tercer mes se ve una ligera caída para el grupo STZ, posiblemente debido a la etapa crónica de la enfermedad.

Existe evidencia científica que afirma que la presencia de diabetes tiene efecto negativo sobre la concentración y actividad de la PON1 y a su vez esta actividad es afectada de forma negativa en presencia de complicaciones asociadas a la DT2.⁶⁷⁻⁷⁰

A pesar de estos estudios hay reportes que han demostrado que en una etapa temprana de detección de DT2 la actividad de la PON1 no sufre cambios en cuanto a su actividad.⁷² Sin embargo estos estudios no han tomado en cuenta que la población estudio con la cual han realizado estos experimentos está sometida a diversos factores de tipo ambiental-nutricional que podrían afectar de forma considerable la actividad de la PON1.

La similitud de los datos resultantes de actividad de la PON1 en los grupos C y STZ probablemente se deba a que ambos grupos fueron alimentados con un tipo de dieta exclusiva para roedores, lo cual significa que este tipo de alimento tiene un balance entre cada nutrimento que la compone y este haya sido responsable de actividades de la PON1 tan similares.

8.2.2 Actividad de PON1 grupo C contra STZ-OB

Al comparar la actividad de la PON1 del grupo C comparada contra el grupo STZ-OB, este último presentó diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo C (342.9 ± 40 contra 548.7 ± 28.5 , $p = 0.013$).

Como se aprecia en la figura 3, al inicio del experimento los valores de la PON1 para estos dos grupos se comportaban de forma similar, cabe mencionar que esto se debió a que en el primer sacrificio no hubo efecto alguno de los tratamientos y se tomó como referencia para este estudio. Sin embargo a partir del primer mes transcurrido se observa un descenso considerable de actividad de la PON1 para el grupo STZ-OB.

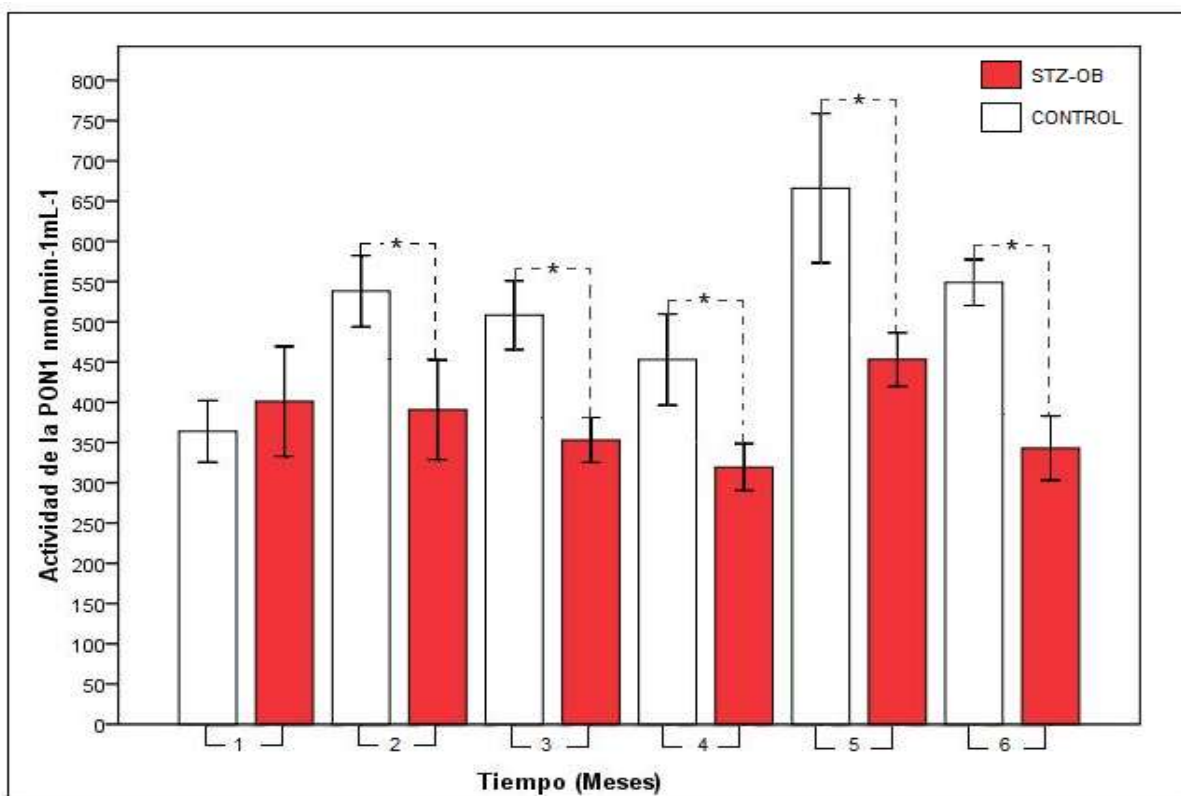


Figura 3. Actividad de la PON1 sérica grupo STZ-OB. Se aprecia que el grupo STZ+OB, presentó menor actividad enzimática con respecto al grupo C (El promedio acumulado fue: 342.9 ± 40 contra 548.7 ± 28.5 , $p = 0.013$). * Diferencias estadísticamente significativas $p < 0.05$.

Esta disminución de la actividad de la PON1 parece estar afectada de forma negativa por la presencia de grasas en este grupo y sumado a esto la presencia de diabetes (Tabla 3). Estos resultados apoyan versiones científicas que sustentan que la presencia de cierto tipo de grasa en la dieta modifica la actividad de la enzima PON1.⁷²⁻⁷⁴

8.2.3 Actividad de PON1 grupo C contra OB

En cuanto al grupo OB se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en comparación con el grupo C (311.2 ± 31.4 contra 548.7 ± 28.5 , $p = 0.004$) como se muestra en la figura 4. Cabe destacar que el grupo OB recibió la misma dieta que el grupo STZ-OB, sin embargo, presentó valores de actividad enzimática ligeramente menores del grupo STZ-OB (311.2 ± 31.4 contra 342.9 ± 40 respectivamente). Esto sugiere que la alimentación con elevado contenido de grasas por sí sola, es capaz de

disminuir la actividad de la PON1^{73,76} y que en etapas tempranas de diabetes esta disminución no sea tan marcada como en etapas avanzadas de esta misma.⁷²

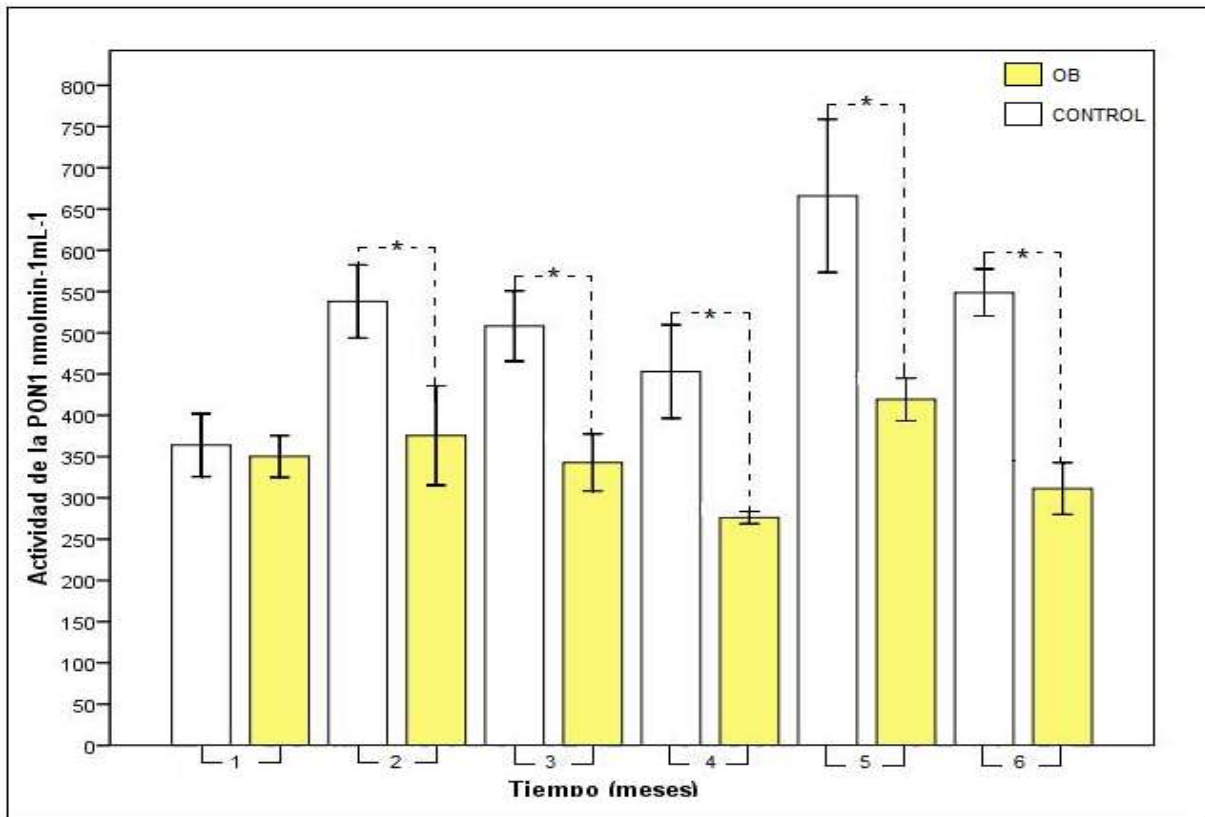


Figura 4. Actividad de la PON1 en grupos C y OB. Se observa diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos en todo el experimento (el promedio acumulado fue 311.2 ± 31.4 en comparación con el grupo C 548.7 ± 28.5). * Diferencias estadísticamente significativas $p < 0.05$.

8.2.4 Actividad de PON1 grupo C contra BP

El grupo BP resultó ser el grupo que menor actividad de la PON1 presentó en comparación con el resto y como se observa en el comparativo con el grupo control (Figura 5) a partir del segundo mes y en un acumulado de medias se presentó una reducción de la PON1 muy marcada y con diferencias estadísticamente significativas (512.9 ± 41.3 para el grupo C contra 316.7 ± 49.3 para el grupo BP, $p = 0.012$).

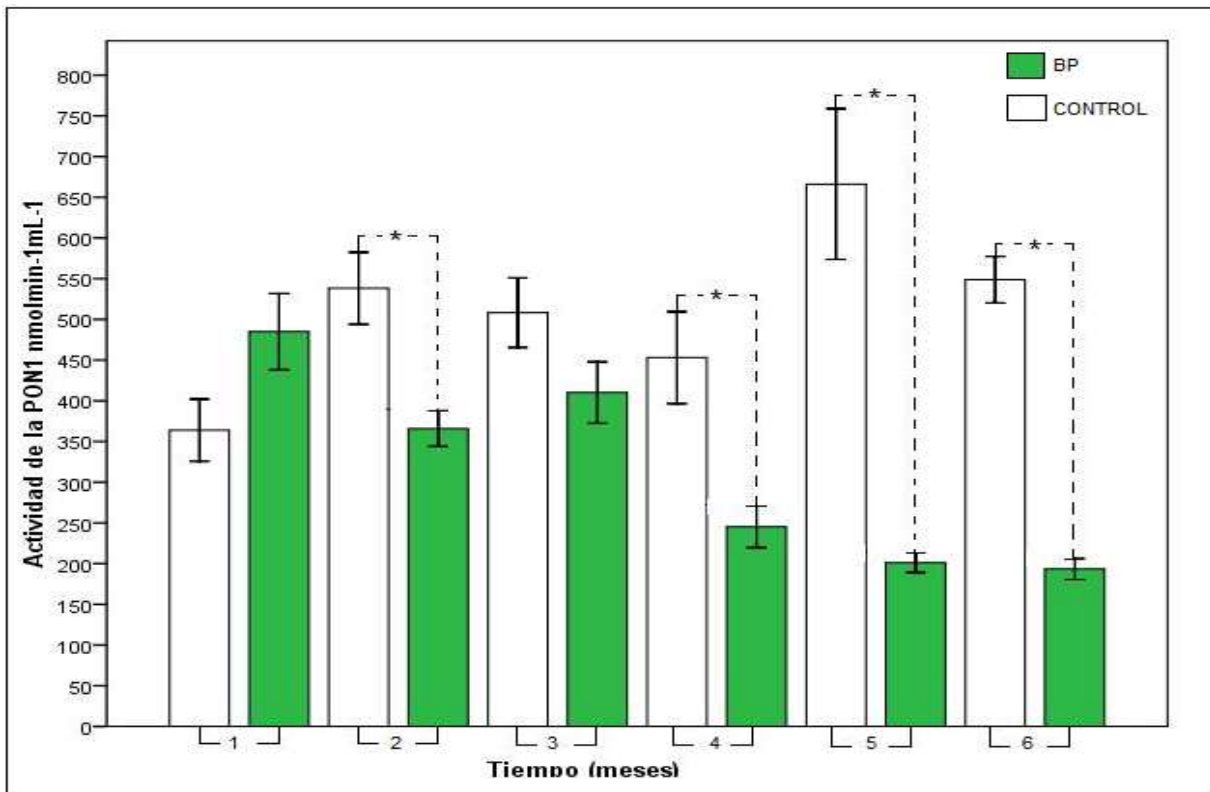


Figura 5. Actividad de la PON1 en el grupo C comparado contra el grupo BP. El grupo BP presentó los niveles más bajos de actividad de la PON1 en todo el estudio. (El promedio acumulado fue: 512.9 ± 41.3 para el grupo C contra 316.7 ± 49.3 para el grupo BP, $p = 0.012$). * Diferencias estadísticamente significativas $p < 0.05$.

Se incluyó el grupo BP en este estudio para contrastar de cierta forma a los grupos OB y STZOB, ya que tradicionalmente la PON1 se ha asociado con el metabolismo de grasas y así comparar los animales que recibieron dieta hipercalórica con alto contenido de grasas contra una dieta con déficit de un macronutriente esencial como lo son las proteínas. Contrario a la hipótesis planteada en este estudio el grupo BP resultó tener los valores más bajos de actividad de la PON1 comparado no solo con el grupo control sino con el resto de los demás grupos. La causa de presentar una actividad baja muy probablemente se haya debido a un retraso en el crecimiento celular por falta de proteínas, lo cual haya originado una baja en la síntesis de aminoácidos y algunos otros complejos como es el caso de las PON y tiene sentido mencionar que la PON1 es sintetizada en hígado y es el órgano en el cual se encuentran en mayor concentración. Se ha demostrado en modelos experimentales

que la desnutrición proteica ejerce mayor influencia sobre el crecimiento y el desarrollo celular que la malnutrición energética (por exceso o déficit de calorías)^{77,78}, como es el caso de los grupos OB y STZOB. Además la deficiencia de proteínas ocasiona retardo en el crecimiento y desarrollo de órganos que fisiológicamente son de gran importancia para el correcto funcionamiento metabólico como el timo e hígado^{79,80} este ultimo directamente relacionado con la PON1.

8.2.5 Actividad de PON1 acumulada

En la figura 6 se muestra una gráfica con valores acumulados de cada grupo para actividad de PON1 presentados en todo el experimento, siendo el grupo BP el que menor actividad presentó (figura 6) con respecto al resto.

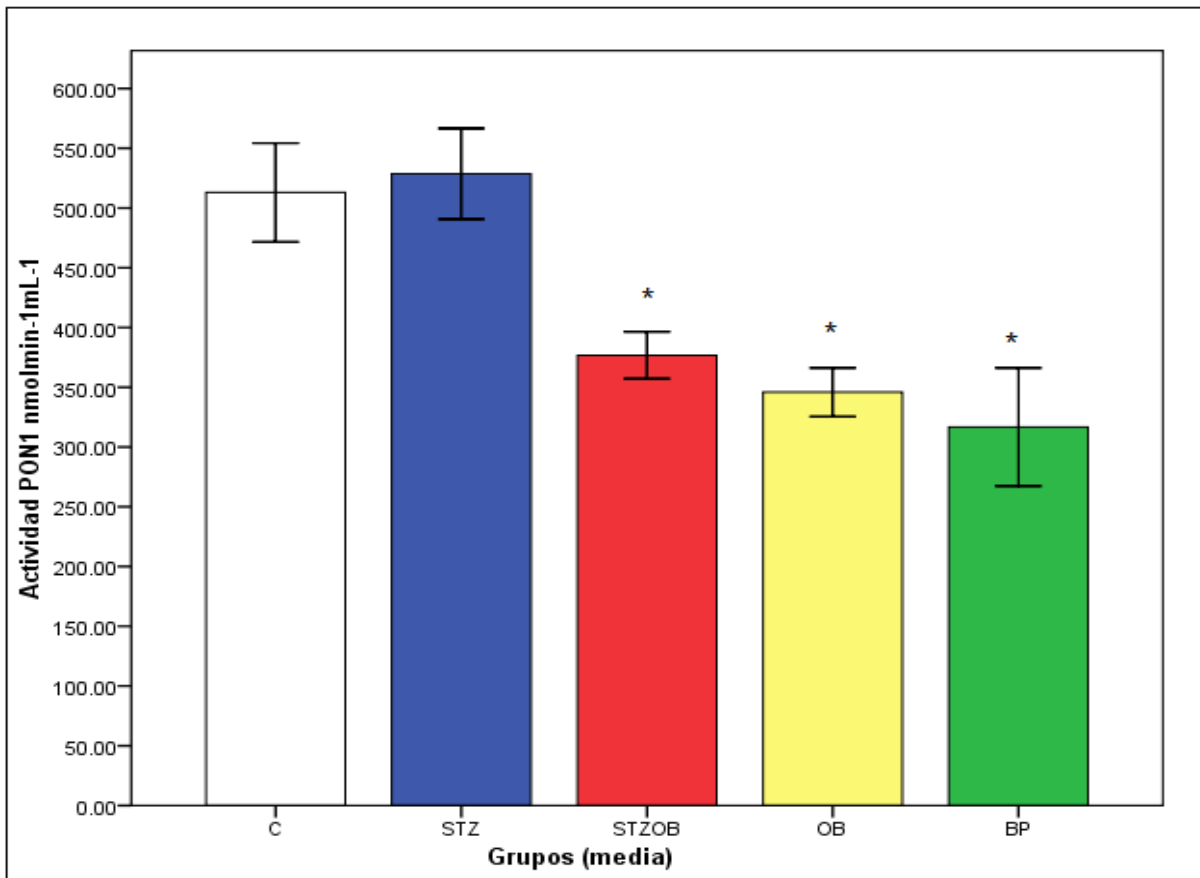


Figura 6. Promedio acumulado de actividad de la PON1 sérica en ratas Wistar macho. Se aprecia que los grupos STZ+OB, OB y BP presentan menor actividad enzimática con respecto al grupo control. * Diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo C ($p < 0.05$).

En comparación de los promedios acumulados la diferencia de los grupos STZ-OB, OB y BP fue estadísticamente significativa, presentando valores de p de 0.013, 0.004 y 0.012 respectivamente comparado contra el grupo control. Las variaciones de error estándar que se obtuvieron para todos los grupos en los promedios acumulados (Figura 6) fueron las siguientes: C \pm 45.2, STZ \pm 41.6, STZ-OB \pm 21.5, OB \pm 22.2 y BP \pm 54.1.

Por otra parte, el comparativo de promedio entre el grupo C contra STZ no tuvo diferencias significativas, presentando incluso un mayor promedio acumulado el grupo STZ que el C. Estos resultados sugieren que en los animales diabetizados probablemente, activen un mecanismo de que trata de mantener el funcionamiento de la enzima. Sin embargo, es posible que durante el progreso de la enfermedad o cronicidad de la misma, el funcionamiento de la enzima llegue a ser insostenible lo que produce una pérdida de la actividad de la PON1.

8.2.6 Actividad de PON1 inicial contra final

De igual forma se realizó un comparativo de la actividad de la PON1 tomando como referencia los valores obtenidos al tiempo cero por homogeneidad de resultados contra los finales con el objetivo de determinar diferencias significativas en cuanto al efecto de los distintos tratamientos del experimento e interesantemente en los grupos OB y STZ-OB no se presentó diferencia alguna. Sin embargo para el resto de los grupos si se presentaron diferencias (Tabla 4).

Tabla 4. Comparativo de valores medios de actividad de PON1 entre los resultados obtenidos al tiempo cero contra el final.

Grupo de Estudio	Resultados PON1 al tiempo cero (nmolmin ⁻¹ mL ⁻¹)	Resultados PON1 finales (nmolmin ⁻¹ mL ⁻¹)	Prueba t (p < 0.05)
C	363.8	584.7	0.037
STZ	372.2	488.7	0.048
STZ-OB	401.1	342.9	0.51
OB	300.2	311.2	0.36
BP	484.9	193.2	0.0003

Asimismo, también es claro notar que la dieta obesigénica por sí sola afecta la actividad en la PON1 de forma negativa aun cuando los animales estén diabetizados. Interesantemente el grupo BP mostró los niveles más bajo de actividad enzimática como se muestra en las figura 5,6 y la tabla 4 específicamente del tercero al último mes.

8.3 Indicadores bioquímicos

Se realizó un análisis comparativo para determinar diferencias significativas con prueba de *t de Student* al igual que se realizó para la actividad de la PON1 para glucosa, colesterol y triglicéridos. Estos análisis se realizaron comparando los indicadores bioquímicos en los grupos con tratamientos, comparados con el grupo control durante los 6 meses del experimento, de igual forma comparando el promedio acumulado de cada indicador bioquímico. Se consideraron datos con diferencias estadísticamente significativas, aquellos que en tal comparación resultaran con una “*p*” menor a 0.05 ($p < 0.05$).

8.3.1 Concentración de glucosa

Los resultados de glucosa en los diferentes periodos de sacrificio como era esperado solo tuvieron resultados con variaciones importantes en los grupos en donde se indujo diabetes (STZ y STZ-OB), estos grupos presentaron una diferencia de aumento en glucosa basal desde el inicio hasta el final del experimento, el resto de los grupos tan solo tuvieron ligeras variaciones (figura 7).

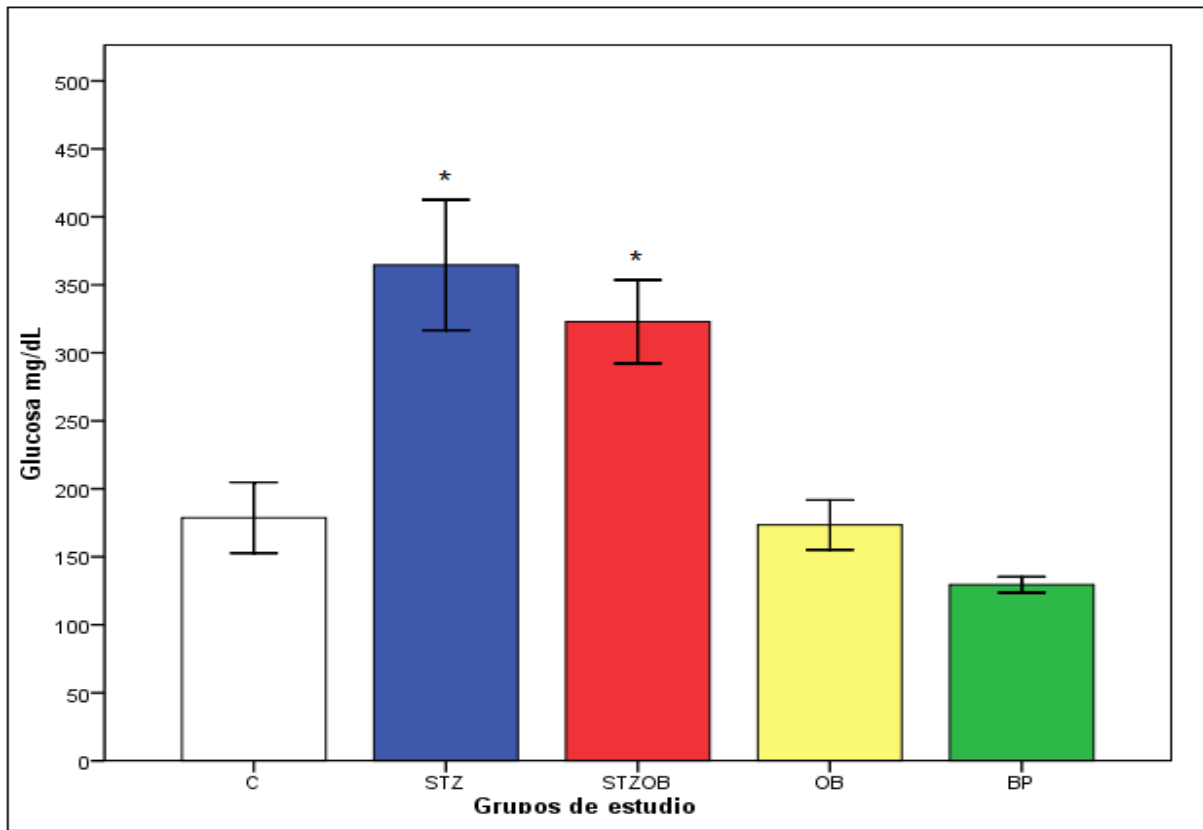


Figura 7. Promedio acumulado de glucosa basal (mg/dL) en ratas Wistar macho. Los grupos STZ y STZ-OB presentaron los cambios más notables de glucosa basal en comparación con el resto de los grupos. * Diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo C ($p < 0.05$).

Como se aprecia en la figura 7 de promedios acumulados de glucosa basal, los grupos STZ y STZ-OB presentaron incrementos considerables durante todo el experimento, y ambos grupos mostraron diferencias significativas con respecto al grupo C (364.5 ± 33.06 , 322.9 ± 33.6 contra 178.7 ± 28.5 , $p = 0.008$, 0.01 respectivamente). El resto de los grupos se comportó de manera similar. A pesar de presentar valores elevados de glucosa basal el grupo STZ no mostró una baja de actividad de PON1 baja en comparación con el grupo C.

8.3.2 Concentración de colesterol

Con respecto a colesterol se realizaron los cálculos estadísticos correspondientes para determinar diferencias importantes en los niveles basales. Sin embargo, contrario a lo esperado las concentraciones de colesterol se mantuvieron dentro niveles casi idénticos para todos los grupos en un rango medio de 160 mg/dL a 176 mg/dL (Figura 8). Sin embargo no fue así para la concentración de triglicéridos que se explica mejor adelante.

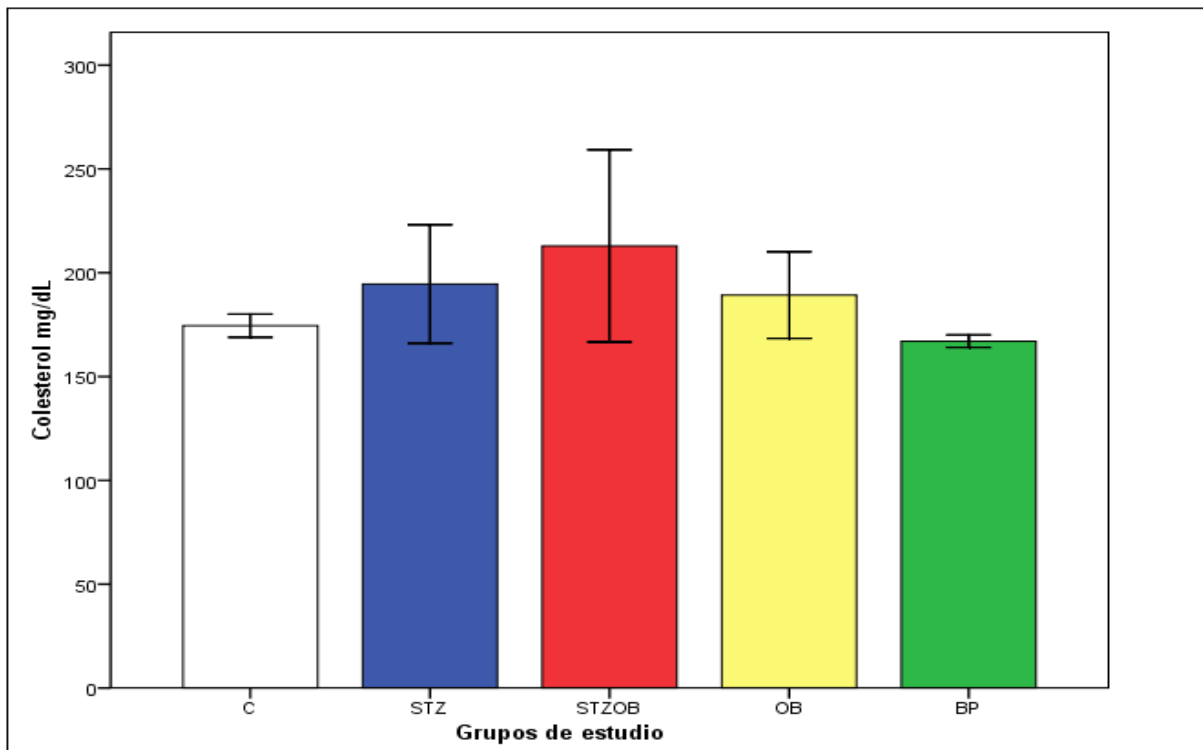


Figura 8. Promedio acumulado de colesterol basal (mg/dL) en ratas Wistar macho. El grupo STZOB presentó las concentraciones más altas, pero sin diferencia estadísticamente significativa en contraste con el resto.

Existe evidencia de tipo epidemiológico que en etapas tempranas de aterosclerosis y DT2 las moléculas de colesterol HDL son de bajo peso molecular teniendo efecto cardioprotector,^{81, 82} Esta última característica se ha explicado por la capacidad que tienen las HDL pequeñas para transportar PON1, la cual elimina los lipoperóxidos de las LDL.⁸³

8.3.3 Concentración de Triglicéridos

Los resultados relativos a la concentración de triglicéridos que se obtuvieron en los distintos periodos de sacrificio, indican que todos los grupos sufrieron ligeros aumentos en las concentraciones de triglicéridos a través del tiempo con respecto al grupo control, sin embargo realizando un acumulado de valores medios de triglicéridos únicamente los grupos STZ, OB y BP tuvieron concentraciones más altas que el grupo control sin tener diferencias estadísticamente significativas (Figura 9).

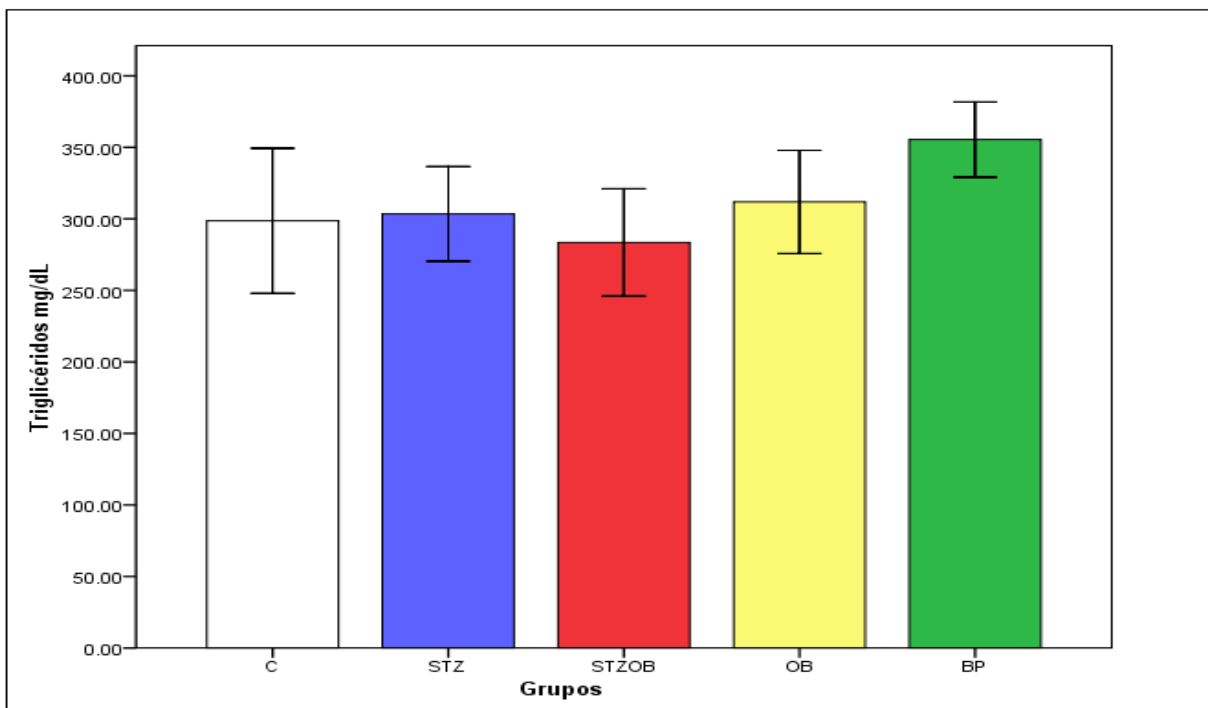


Figura 9. Promedio acumulado de concentración de triglicéridos (mg/dL) en ratas Wistar macho. Como se observa, no se presentó diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo C.

Sin embargo, se compararon los resultados obtenidos en el primer sacrificio, tomando en cuenta la homogeneidad de los datos obtenidos contra los datos obtenidos al final del experimento, con la finalidad de demostrar diferencias estadísticamente significativas en los diferentes tratamientos, siendo el grupo STZ el que presentó los valores más altos de triglicéridos hacia el final del experimento (Tabla 5).

Tabla 5. Comparativo de valores medios de triglicéridos entre los resultados obtenidos al tiempo cero contra el final y los valores t de cada grupo.

Grupo de estudio	Resultados de triglicéridos al tiempo cero mg/dL		Resultados de triglicéridos al final mg/dL		Prueba t (p < 0.05)
	Media	EE	Media	EE	
C	162.8	± 5.89	178	± 8.0	0.26
*STZ	172	± 2.54	279.2	± 28.6	0.003
STZ-OB	168.8	± 2.37	237.75	± 65.2	0.055
*OB	166.2	± 2.89	347	± 80	0.03
*BP	242.6	± 16.5	399.4	± 60.7	0.02

* Diferencias estadísticamente significativas de valores respecto al tiempo 0 de experimento en contra del final del estudio (p < 0.05).

Si se compara estos resultados con los de la actividad de la PON1 se puede observar que los grupos BP y OB los cuales, ambos con las mayores concentraciones de triglicéridos, fueron los que presentaron menor actividad de la PON1 en comparación con el grupo C. Probablemente el tipo de dieta elevada en grasas saturadas haya modificado la composición de las HDL, que son las encargadas del transporte de la PON1 formando HDL de alto peso molecular (HDL2, HDL3) las cuales tienen menor capacidad para captar colesterol⁸⁴ y carecen de propiedades antioxidantes en comparación con las HDL de bajo peso molecular,^{85,86} lo cual se reflejó en una menor actividad de la PON1. Respecto al grupo STZ-OB se presentaron diferencias tanto al inicio como al final del tratamiento sin embargo estadísticamente no fueron significativas.

8.4 Peso corporal

Los resultados obtenidos en cuanto a peso de los animales se graficaron con base en los promedios acumulados de todo el experimento (Figura 10) y se observó un aumento exponencial de este indicador en casi la mayoría de los grupos a excepción del grupo BP el cual se mantuvo con el mismo peso y en comparación con el grupo C

presentó diferencias significativas 247.7 ± 32.45 para C y 161.9 ± 9.24 para BP con un valor $p = 0.0004$.

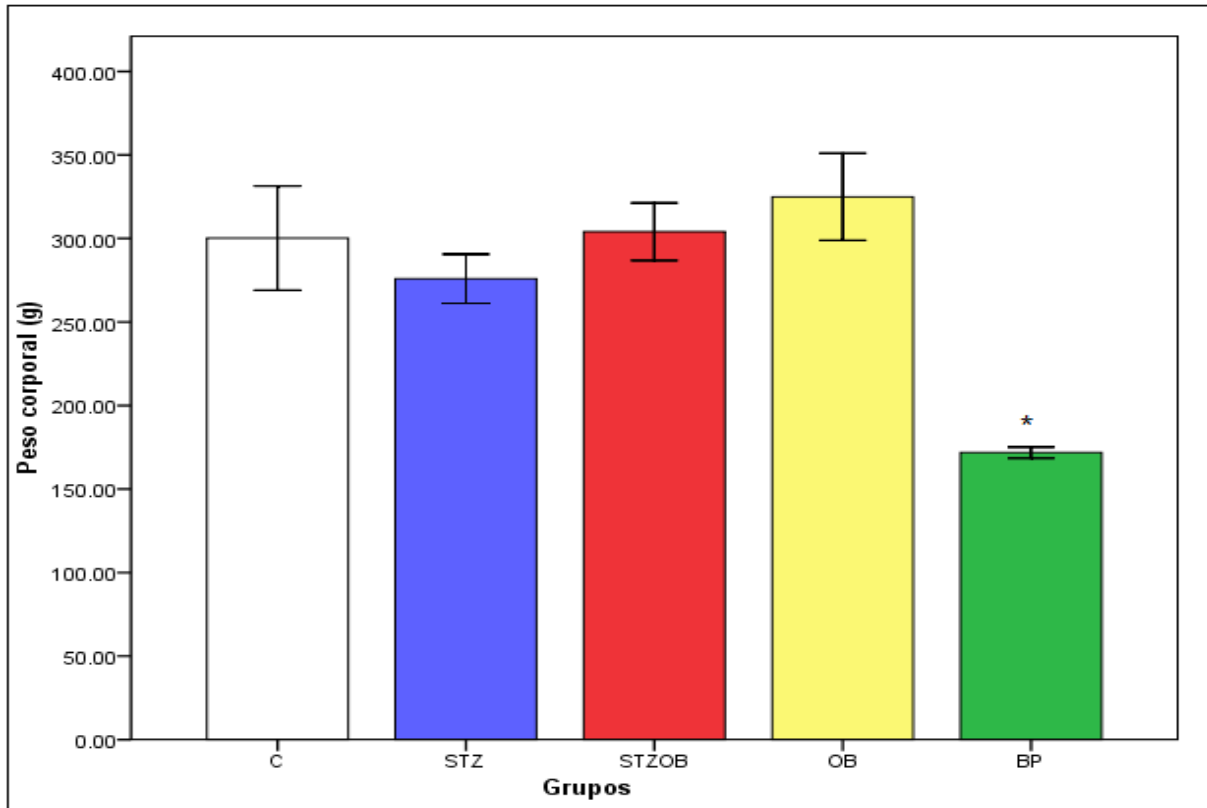


Figura 10. Peso promedio acumulado por grupo. El grupo BP presentó el peso más bajo en comparación con el resto de los demás grupos causado por el aporte insuficiente de proteínas lo cual provoca una disminución de tejido celular y retardo en el crecimiento. * Diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo C ($p < 0.05$).

Como se observa en la figura 10 el grupo OB fue el que promedio los pesos más altos en todo el experimento en contraste con el grupo BP el cual siempre mostró bajo peso corporal debido a la alimentación baja en proteínas, sin embargo ambos grupos presentaron los promedios de actividad de la PON1 más bajos. Cabe mencionar que el grupo BP se alimentó con un déficit de proteínas en comparación con el resto de los grupos, que aunque tenían modificaciones de nutrientes por exceso como es el caso de los grupos OB y STZ OB el aporte de proteínas fue suficiente. El bajo peso se debió al bajo aporte de proteínas, las cuales son esenciales para el desarrollo de tejido muscular estructural y de diversos órganos.

9. CONCLUSIONES

Con base en los resultados presentados en este estudio se puede concluir que:

- 1) Los 3 tipos de alimentación utilizados en los 5 modelos experimentales, modificaron en forma variable la actividad enzimática de la PON1.
- 2) A etapas tempranas de la diabetes en un modelo animal experimental alimentado con una dieta balanceada, no se presentaron diferencias estadísticamente significativas en la actividad de la PON1 respecto a un grupo control.
- 3) El estado de diabetes inducido por estreptozotocina no afecta la actividad de la PON1.
- 4) Tanto la dieta obesigénica a base de grasas saturadas como la de bajo aporte proteico disminuyeron la actividad de la PON1.
- 5) El grupo de animales alimentados con una dieta baja en proteínas, fue el que mostró la más baja actividad de la PON1 y el menor peso corporal.
- 6) La actividad de la enzima fue menor en presencia de grasas saturadas en la dieta independientemente de la presencia de diabetes.
- 7) No se encontró ninguna asociación con las concentraciones de colesterol total y triglicéridos y la actividad de la PON1 en los diferentes grupos de estudio.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. American Diabetes Association. 2010. Standards of Medical Care in Diabetes. *Diabetes Care* 33:S4-S108.
2. Norma Oficial Mexicana NOM-015-SSA2. 1994. Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes. *NOM-015-SSA2*.
3. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT2006). Instituto Nacional de Salud Pública. *ENSANUT2006*. México.
4. XII Censo de Población y Vivienda. 2000. INEGI. *Dirección General de Estadística, Informática y Evaluación*.
5. Zimmet P, Alberti KG, Shaw J. 2001. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*;4141:782-778.
6. R Engerman, M Bloodworth y S Nelson. 2001. Relationship of microvascular disease in diabetes to metabolic control. *Diabetes Care* 26:760-769; doi:10.2337/diabetes.26.8.760.
7. Franz MJ, Bantle JP, Beebe CA, Brunzell JD, Chiasson JL, Garg A, Holzmeister LA, Hoogwerf B, Mayer-Davis E, Mooradian AD, Purnell JQ, Wheeler M. 2002. Evidence-based nutrition principles and recommendations for the treatment and prevention of diabetes and related complications (Technical Review). *Diabetes Care* 25: 148–150.
8. Goldstein y Campbell SM. 2005. Test of glycemia in diabetes (Technical review). *Diabetes care*. 72:74.
9. Whitw NH y Henry DN. 2002. Special issues in diabetes management. In Haire-Joshu D (ed): Management of diabetes mellitus: *Perspectives of care across the life span*. St Louis MO, Mosby Year Book. 8:231.
10. Alberti KGMM, Zimmet PZ. 2005. For the WHO consultation. Definition, diagnosis, and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: Provisional report of a WHO consultation. *Diabetic Medicine*; 15: 539-53.

11. Kaufer-Horwitz M., Perez-Lizaur A.B. y Arroyo P. 2001. Diabetes. *Nutriología Médica*. 2º Edición. Ed Medica Panamericana Fundación Mexicana para la Salud. Mexico. 214-15.
12. American Diabetes Association (ADA). 2010. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes care*. 33(1):62-69.
13. Drash A. 2000. The child, the adolescent and the Diabetes Control and Complications Trial. *Diabetes care* 16:155.
14. American Diabetes Association. 2004. Diabetes Vital Statistics. Alexandria, VA, *American Diabetes Association*. 32:65.
15. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. 2004. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2010 and projections for 2030. *Diabetes Care*; 27:1047-1053.
16. Delahanty LM y Halford BN. 2003. The role of diet behaviours in achieving improved glycemic control in intensively treated patients in the diabetes control and complications trial. *Diabetes care* 16:1453.
17. Posadas-Romero C, Yamamoto-Kimura L, Lerman-Garber I, Zamora-González J, Fajardo-Gutiérrez A, Velázquez L. 2004 The prevalence of NIDDM and associated coronary risk factors in Mexico City. *Diabetes Care*;17(12):1441-1448.
18. Hollenbeck CB y Cronin B. 1999. The effects of variations in percent of natural occurring complex and simple carbohydrates on plasma glucose and insulin response in individuals with non insulin dependent diabetes mellitus. *Diabetes* ; 34:151.
19. Tuck M., Corry D. y Trujillo A. 1999. Atherosclerosis, blood pressure and exaggerated vascular activity in the hypertension on diabetes mellitus. *American Journal of Medicine*. Med 88:210.
20. Diabetes Care and Education dietetic Practice Group of The American Dietetic Association. 2005. Meal planning approaches for diabetes management. 2da ed. Chicago. *The American Dietetics Association*. 32:65.
21. Zimmet P, Alberti KG, Shaw J. 2005. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*: 414:782-7.

22. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006 (ENSANUT2006). Instituto Nacional de Salud Pública. *ENSANUT2006-SSA*. México.
23. Instituto Nacional de Salud Pública. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006. Resultados por entidad federativa, Hidalgo. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública-Secretaría de Salud.
24. Rivera JA, Barquera S, Campirano F, Campos I, Sadfie M, Tovar V. 2002. Epidemiological and Nutritional transition in Mexico: rapid increase of noncommunicable chronic diseases and obesity. *Public Health Nutrition*; 5: 113-122.
25. XII Censo de Población y Vivienda. 2000. INEGI. *Dirección General de Estadística, Informática y Evaluación*.
26. Encuesta Nacional de Salud. 2000. Instituto Nacional de Salud Pública. *INSP*. México.
27. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT2006). Instituto Nacional de Salud Pública. *ENSANUT2006-SSA*. México.
28. Barquera S, Tovar-Guzmán V, Campos-Nonato I, González-Villalpando C, Rivera-Dommarco J. 2003. Geography of diabetes mellitus mortality in Mexico: An epidemiologic transition analysis. *Arch Med Res*. S3:23-37.
29. Jorge Escobedo de la Peña et al. 2001. Incidencia y letalidad de las complicaciones agudas y crónicas de la diabetes en México. *INSP*. Vol. 38 No. 004. Cuernavaca México; 236-243.
30. Bray GA. 2005. Obesity: definition, diagnosis and disadvantages. Report Review. *Med J*. 1:142 (7) S2-8.
31. Casanueva E., Kaufer-Horwitz., Perez-Elizaur A.B. y Arroyo P., 2001. Obesidad. *Nutriología Médica*. 2º Edición. Ed. Medica Panamericana Fundación Mexicana para la Salud. México. 284-307.
32. Elliot DL y Brodsky IG. 2004. Obesity. pathophysiology and practical management. *J Gen Intern Med*. 72:188.
33. Bouchard C, Desprès JP, Mauriege P. 2003. Genetic and nongenetic determinants of regional fat distribution. *Endocr Rev*;14:72-93.

34. Villa R,A., Escobedo H,M. y Mendez N,A. 2004. Estimación y proyección de la prevalencia de obesidad en México a través de la mortalidad por enfermedades asociadas. *Gac Méd Méx.* 140(2):21-26.
35. Rosenbaum M, Nicholson M, Hirsch J, et al. 1999. Effects of weight change on plasma leptin concentrations and energy expenditure. *J. Clin. Endocrinol. Metab;* 82(11):3647-54.
36. Cummings DE, Schwartz MW. Genetics and pathophysiology of human obesity. *Annu Rev Med* 2003;54:453-71.
37. Goossens GH, Blaak EE, Van Baak MA. 2003. Possible involvement of the adipose tissue renin-angiotensin system in the pathophysiology of obesity and obesity-related disorders. *Obes Rev*;4:43-55.
38. Lee I. y Berger M. 2001. Body weight and mortality: A 27 year follow-up of middle aged population. *JAMA* 205:272.
39. Ross R, Dagnone D, Jones P. 2000. Reduction in obesity and related comorbid conditions after diet-induced weight loss or exercise-induced weight loss in men. *Ann Intern Med.* 103-133:92-103.
40. Sugerman HJ, Kellum JM, Engle KM, et al. 2002. Gastric bypass for treating severe obesity. *Am J Clin Nutr*, 55: 560S–566S.
41. Sánchez P., Pichardo E. y López R. 2004. Epidemiología de la obesidad. *Revista Gaceta Médica de México.* 140-(2) 3-17.
42. Monteiro, Carlos A.; Moura, Erly C.; Conde, Wolney L. and Popkin, Barry M. 2004. Socioeconomic status and obesity in adult populations of developing countries: a review. *Bull World Health Organ*; vol.82, n.12 940:946 .
43. Harel M, Aharoni A, Gaidukov L, Brum Harel M, Aharoni A, Gaidukov L, et al. 2004. Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes. *Nat Struct Mol Biol*;11:412-9.
44. Rosenblat M, Gaidukov L, Khersonsky O, Vaya J, Oren R, Tawfik DS, et al. 2006. The catalytic histidine dyad of high density lipoprotein-associated serum paraoxonase-1

- (PON1) is essential for PON1-mediated inhibition of low density lipoprotein oxidation and stimulation of macrophage cholesterol efflux. *J Biol Chem*; 281:7657-65.
45. Mackness MI. 1998. Possible medical significance of human serum paraoxonase. Reiner E, Aldridge WN, Hoskin FCG, (eds). *Enzymes Hydrolysing Organophosphorus Compounds*. Chichester, UK: Ellis-Horwood, pp:202-213.
 46. Beltowski, J., Wojcicka, G. y Jamroz, A. 2003. Leptin decreases plasma paraoxonase 1 (PON1) activity and induces oxidative stress: the possible novel mechanism for proatherogenic effect of chronic hyperleptinemia. *Atherosclerosis*. 170:21-9.
 47. Humbert, R., Adler, DA., Disteché, CM., Hassett, C., Omiecinski, C J. y Furlong CE. 1999. The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism. *Nature Genet*. 33:73-76.
 48. Davies, HG., Richter, RJ., Keifer, M., Broomfield, CA., Sowalla, J. y Furlong, CE. 2000. The effect of the human serum paraoxonase polymorphism is reversed with diazoxon, soman and sarin. *Nat Genet* . 14:334-6.
 49. Primo-Parmo, SL., Sorenson, RC., Teiber, L., La Du. y BN. 1997. The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of multigene family. *Genomics*;33:498-507.
 50. Sumegová, K., Nagyová, Z., Waczuliková, I., Žitňanová, I., y Ďuračková, Z. 2007. Activity of paraoxonase 1 and lipid profile in healthy children. *Physiol Res*. 56: 351-357.
 51. Blatter M-C., James RW. y Messmer S. 1993. 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*. 211:871– 879.
 52. Mackness MI., Arrol S. y Durrington PN. 1991. Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. *FEBS Lett*. 286: 152-154.
 53. Khersonsky, O., y D. S. Tawfik. 2005. Structure-reactivity studies of serum paraoxonase PON1 suggest that its native activity is lactonase. *Biochemistry*. 44: 6371–6382.

54. Orit Rozemberg, Diana M. Shih, Michale Aviram. Human Serum Paraonase 1 Decreases Macrophage Cholesterol Biosynthesis: Possible Role for Its Phospholipase-A₂-Like Activity and Lysophosphatidylcholine Formation Arterioscler Thromb Vasc Biol, Mar 2003; 23: 461 - 467.
55. Oda MN, Bielicki JK, Ho TT, Berger T, Rubin EM, Forte TM. 2002. Paraonase 1 overexpression in mice and its effect on high-density lipoproteins. *Biochem Biophys Res Commun*;290:921-7.
56. Van Himbergen TM, Roest M, de Graaf J, et al. 2005. Indications that paraonase-1 contributes to plasma high density lipoprotein levels in familial hypercholesterolemia. *J Lipid Res*;46:445-51.
57. Aaron Tward, Yu-Rong Xia, Xu-Ping Wang, Yi-Shou Shi, Christina Park, Lawrence W. Castellani, Aldons J. Lusis, and Diana M. Shih. 2002 Decreased Atherosclerotic Lesion Formation in Human Serum Paraonase Transgenic Mice Circulation; 106: 484:490.
58. Mackness MI., Arrol S. y Durrington PN. 1993. Protection of low-density lipoprotein against oxidative modification by high-density lipoprotein associated paraonase. *Atherosclerosis*. 104: 129-135.
59. Mackness, M.I. y Durrington, P.M. 1995. HDL, its enzymes and its potential to influence lipid peroxidation. *Atherosclerosis*. 115 (2): 243-253.
60. Charles M., Alexander., Pamela B., Landsman. y Steven M. 2003. Teutsch, Steven M. Haffner. Metabolic Syndrome, Diabetes, and Prevalence of Coronary Heart Disease Among NHANES III Participants Age 50 Years and Older. *American Diabetes Association*. 52(5):1210-1214.
61. Rodrigo, L., Mackness, B., Durrington, PN., Hernandez, A. y Mackness, MI. 2001. Hydrolysis of plateletactivating factor by human serum paraonase. *Biochem J*. 354:1-7.
62. Nishio W, Watanabe Y. Cigarette smoke extract inhibits plasma paraonase activity by modification of the enzyme's free thiols. 1997. *Biochem Biophys Res Commun* ; 236: 289-293.

-
- ⁶³. Dubravka Juretić et al. 2006. Paraoxonase/arylesterase in serum of patients with type II diabetes mellitus. *Acta Pharm.* 2006 March; 56(1): 59–68.
- ⁶⁴. Schiavon, R. 2007. PON1 activity and genotype in patients with arterial ischemic stroke and in healthy individuals. *Acta Neurologica Scandinavica.* 116(1):26-30.
- ⁶⁵. Aviram M, Dornfeld L, Rosenblat M, Volkova N, Kaplan M, Coleman R, et al. 2000. Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and platelet aggregation: studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. *Am J Clin Nutr*; 71: 1062-1076.
- ⁶⁶. Alejandro D. Bolzán and Martha S. Bianchi. 2002. Genotoxicity of Streptozotocin. *Revista de Citogenética y Mutagénesis del Instituto Multidisciplinario de Biología Celular IMBICE.* La Plata, Argentina. S8 Vol. 087. pp. 210:221.
- ⁶⁷. Charlton-Menys, Yifen, L. y Paul, ND. 2006. Semiautomated Method for Determination of Serum Paraoxonase Activity Using Paraoxon as Substra. *Clinical Chem*;52:3:453-457.
- ⁶⁸. Abbott CA, Mackness MI, Kumar S, Boulton AJ, Durrington PN 1995 Serum paraoxonase activity, concentration, and phenotype distribution in diabetes mellitus and its relationship to serum lipids and lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15:1812–1818.
- ⁶⁹. Mackness B, Mackness MI, Arrol S, Turkie W, Julier K, Abuasha B, Miller JE, Boulton AJM, Durrington PN 1998 Serum paraoxonase (PON1) 55 and 192 polymorphism and paraoxonase activity and concentration in non-insulin dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 139:341–349.
- ⁷⁰. Sakai T, Matsuura B, Onji M 1998 Serum paraoxonase activity and genotype distribution in Japanese patients with diabetes mellitus. *Intern Med* 37:581–584.
- ⁷¹. Mackness B, Durrington PN, Abuashia B, Boulton AJ, Mackness MI 2000 Low paraoxonase activity in type II diabetes mellitus complicated by retinopathy. *Clin Sci* 98:355–363.

72. Steffi Kopprasch, Jens Pietzsch, Eberhard Kuhlisch, and Juergen Graessler. 2003. Lack of Association between Serum Paraoxonase 1 Activities and Increased Oxidized Low-Density Lipoprotein Levels in Impaired Glucose Tolerance and Newly Diagnosed Diabetes Mellitus *J. Clin. Endocrinol. Metab*; 88: 1711 - 1716.
73. Thomas-Moya E, Gianotti M, Proenza AM, Llado I. 2007. Paraoxonase 1 response to a high-fat diet: Gender differences in the factors involved. *Mol. Med.* ;13:203-209.
74. Bhalchandra J. Kudchodkar³, Andras G. Lacko, Ladislav Dory and Thomas V. Fungwe. 2000. Dietary Fat Modulates Serum Paraoxonase 1 Activity in Rats. *Journal of Nutrition*;130:2427-2433.
75. Diana M. Shih, et al. 1996. Genetic-Dietary Regulation of Serum Paraoxonase Expression and Its Role in Atherogenesis in a Mouse Model. *J. Clin. Invest.* Volume 97, Number 7, 1630:1639.
76. Balchandra J. Kudchudkar y Andras G. Lacko. 2000 Dietary fats modulates serum paraoxonase 1 activity in rats. *The Journal of Nutrition.* 130; 2427-2433.
77. Widdowson E.M., Mc Cance R.A. 1996. The effect of finite periods of undernutrition at different ages on the composition and subsequent development of the rat. *Proc Roy Soc B*;158:329-33
78. Lau HC, Thyne FW, Ritchey SJ. 1997. Effects of protein and calorie restriction on growth, cell number and cell size in infant rats. *Nutr Rep Int* 1997; 10:249-53.
79. Vonder Decken A., Lund B., O'Toole C. Effect of a low protein diet on in vitro protein synthesis in thymus, spleen, liver and bone marrow in young adult rats. *J Nutr* 1998; 108: 1274-8.
80. Slobodianik NH, Río ME, López MC, Roux ME, Sanahuja JC. Different levels of protein depletion and its relationship with the recovery of growing rats thymus. *Nutr Rep Int* 1995; 32(6):1259-62.
81. Pérez-Méndez O, Torres-Tamayo M, Posadas-Romero C, Vidaure Garcés V, Carreón-Torres E, Mendoza-Pérez E, et al. 2001. Abnormal HDL subclasses

distribution in overweight children with insulin resistance or type 2 diabetes mellitus. *JAMA* 234(5):34:65

82. Morgan J, Carey C, Lincoff A, Capuzzi D. 2004. High-density lipoprotein subfractions and risk of coronary artery disease. *Curr Atheroscler Rep*; 6: 359–365.
83. Kuvin JT, Dave DM, Sliney KA, Mooney P, Patel AR, Kimmelstiel CD, 2006. Effects of extended-release niacin on lipoprotein particle size, distribution, and inflammatory markers in patients with coronary artery disease. *Am J Cardiol*; 98: 743-745.
84. Aviram M, Hardak E, Vaya J, Mahmood S, Milo S, Hoffman A. 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.
85. Deakin S, Leviev I, Gomaraschi M, Calabresi L, Franceschini G, James RW. 2002. Enzymatically active paraoxonase-1 is located at the external membrane of producing cells and released by a high affinity, saturable, desorption mechanism. *J Biol Chem*; 277: 4301–4308.
86. Kontush A, Chantepie S, Chapman MJ. 2003. Small, dense HDL particles exert potent protection of atherogenic LDL against oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vase Biol*; 23: 1881–1888.