



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD
ÁREA ACADÉMICA DE MEDICINA

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS Y DE LA SALUD.

**“Purificación de la paraoxonasa-1 de humano mediante FPLC y
evaluación de su actividad enzimática en presencia de jugo de
granada”**

Tesis que para obtener el grado de:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOMEDICAS Y DE LA SALUD

P R E S E N T A :

L N IVÁN FRANCISCO CELAYA CORREA

Bajo la Dirección de:
GABRIEL BETANZOS CABRERA.

San Agustín Tlaxiaca Hgo. a ___ de _____ de 2014



Durante el desarrollo de estos estudios, se contó con una beca de manutención otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), número de beca _____.

AGRADECIMIENTOS.

Primero que nada, agradezco a **Dios** por haberme permitido culminar una parte muy importante de mi vida académica, y que sin duda será de gran utilidad para mi vida diaria.

A mi padre, **Constantino Celaya** por estar conmigo en este largo proceso, por cuidarme, por creer en mí, por brindarme siempre la confianza y los recursos necesarios para que salga adelante sin importar lo que cueste, te amo papá...

A mis hermanos, **Gisel y Carlos**, que todos los días me demuestran que la vida, a pesar de ser difícil, nunca debe de dejarse vivir; Mi nena, gran amiga de intensas batallas, unas buenas y otras peores, sin embargo, siempre con una gran sonrisa me enseñas a enfrentarme a cualquier reto que se me presente, sin miedo y con mucho valor y dedicación, los amo.

A mi hermano **Marco Antonio, mi toto**, ese ángel que me ha enseñado día con día, que vivir es una gran aventura, y qué mejor que vivirla codo a codo, gracias carnalito, te amo hasta donde quiera que estés...

A mis abuelos, **Mamá Gloria y Papá Panchito**, que gracias a Dios están conmigo todavía, que me apoyan, que me aman y que creen en mí, dignos padres y mejores abuelos, sin duda un ejemplo a seguir, los amo...

A mi esposa, **Lupita**, mi gran compañera de vida, mi motivación, mis ganas de seguir adelante, tu apoyo y tu cariño han sido base para que esto pudiera salir adelante, cada triunfo o cada caída, quiero vivirla siempre contigo, te amo hermosa...

A mis sobrinos, **Samantha, Carlos, Sofía, Montse y Ariadna** (mi niña chica), ustedes me dan la pauta para querer ser un ejemplo en sus vidas, y me dan mucho amor, ese amor sincero y sin ataduras, gracias chaparros, los amo a todos...

Al **Doctor Gabriel Betanzos**, gracias por sus conocimientos, por su paciencia y por su deseo de que todos los alumnos que pasen por sus aulas vean la maravillosa valía que tiene la investigación, gracias por su amistad...

A mis compañeros de laboratorio, **Pelón, Jorge, Pedrito, Lalo, Chimal, Gaby**, porque me enseñaron que el trabajo en equipo se puede lograr y que hicieron la estancia en el lab un poco más soportable, gracias por su amistad...

A todos los asesores de esta tesis, **Dr. Tomas, Dra. Raquel, Dra. Mirandelli y Dra. Guadalupe**, porque gracias a sus correcciones y guía esta tesis se pudo concluir, aunque costo un poco de trabajo, gracias por todos sus conocimientos...

DEDICATORIA.

Esta tesis es para mi Madre, *María Elena Correa Rodríguez*, mi primer gran amor, la mujer que me dio la vida, que me cuida y me seguirá cuidando, que siempre me incluye en sus oraciones, que me impulsa con una confianza ciega a que salga adelante, que cree en mí, a veces más que yo mismo, que no me deja solo ni un instante, gracias por todos los besos, por todas las caricias, por todas las desveladas, por todo el apoyo, porque es por ti que he logrado tantas y tantas cosas, porque tu amor y tu cariño, han sido la base de todos mis triunfos, no podría pagarte nunca todo lo que haces por mí, **GRACIAS MAMÁ**, Dios te bendiga siempre, te amo...

ÍNDICE.

ABREVIATURAS	7
RESUMEN	8
ABSTRACT	9
INTRODUCCIÓN	10
1. Proteínas	10
1.1 Concepto	10
1.2 Estructura de las proteínas	10
1.3 Clasificación de las proteínas en base a su forma	13
2. Purificación de proteínas	14
2.1 Cromatografía	14
2.1.1 Cromatografía de interacción hidrofóbica	14
2.1.2 Cromatografía de exclusión molecular	15
2.1.3 Cromatografía de intercambio iónico	15
3. Enzimas	17
3.1 Definición	17
3.1.1 Radicales libres y Enzimas que intervienen en el estrés oxidativo	17
4. Paraoxonasa	18
4.1 Paraoxonasa-1	19
4.2 Papel antioxidante de la PON1	21
4.3 Polimorfismos de la paraoxonasa-1	22
5. Estrés oxidativo y antioxidantes	22
6. Granada	23
6.1 Propiedades de la granada	24
6.2 La granada y su relación con la paraoxonasa 1	25
7. JUSTIFICACIÓN	26
8. OBJETIVOS	27
8.1 Objetivo general	27
8.1.1 Objetivos Específicos	27

9. HIPOTESIS	27
10. MATERIAL Y METODOS	28
10.1.1 Obtención del jugo de granada	28
10.1.2 Cuantificación de compuestos fenólicos	28
10.1.3 Purificación de la enzima	28
10.1.4 Obtención del suero sanguíneo	28
<i>10.2 purificación de la hPON1</i>	29
10.2.1 Cromatografía de Interacción Hidrofóbica	29
10.2.2 Determinación de la concentración de proteína	30
10.2.3 Determinación de la pureza de la proteína	30
10.2.4 Tratamiento de la muestra	31
10.2.5 Medición de la actividad de la hPON1	31
10.2.6 Determinación de K_m Y V_{max} de la hPON1 purificada.	32
10.2.7 Cinética enzimática de la hPON1 purificada en presencia de jugo de granada	32
10.2.8 Inhibición de la actividad enzimática por EDTA	32
10.2.9 Análisis Estadístico	33
11. RESULTADOS	34
11.1.1 Purificación de la enzima hPON1	34
11.1.2 Determinación de la pureza de la proteína	36
11.1.3 Cuantificación de proteínas	37
11.1.4 Actividad enzimática de las fracciones en presencia de JG	38
11.1.5 Determinación de K_m Y V_{max} de la hPON1 purificada	39
11.1.6 Inhibición de la actividad enzimática por EDTA	40
12. DISCUSIÓN	42
13. CONCLUSIONES	46
14. PERSPECTIVAS	47
15. BIBLIOGRAFÍA	48

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxiribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
CIH	Cromatografía de Interacción hidrofóbica.
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FPLC	Cromatografía líquida rápida de proteínas, del inglés “Fast Protein Liquid Chromatography”
HDL	Lipoproteínas de alta densidad, del inglés “high density lipoprotein”
hPON1	Paraoxonasa 1 de humano
hPON2	Paraoxonasa 2 de humano
hPON3	paraoxonasa 3 de humano
JG	Jugo de granada
K_m	Constante de Michaelis-Menten.
LDL	Lipoproteínas de baja densidad, del inglés “low density lipoprotein”
M	concentración molar.
PAGE	Electroforesis en gel de acrilamida.
RL	Radicales libres
SDS	Dodecil sulfato de sodio.
V_{max}	Velocidad máxima

RESUMEN

La Paraoxonasa sérica humana 1 (hPON1) es una proteína glicosilada con un peso molecular aproximado de 43 kDa, está compuesta de 354 aminoácidos, es una esterasa dependiente de calcio. Tiene la capacidad de hidrolizar una amplia gama de compuestos organofosforados, se sintetiza principalmente en el hígado y es secretada en plasma sanguíneo. Se encuentra asociada principalmente a lipoproteínas de alta densidad (HDL), y previene de la oxidación a las lipoproteínas de baja densidad (LDL) las cuales están implicadas en el inicio y progreso de la aterosclerosis. La purificación de hPON1 ha sido un reto desde hace varios años. El tener una forma purificada de la hPON1 permitiría evaluar su importancia biológica con más detalle. Por otra parte, la granada es un fruto rico en compuestos antioxidantes, algunos de ellos como la quercitina han mostrado tener la capacidad de inducir la actividad de la PON1. Para la purificación de la enzima se utilizaron métodos de cromatografía de interacción hidrofóbica, utilizando una columna HiPrep Phenyl FF (high sub) 16/10 de interacción hidrofóbica, acoplada al sistema AKTA-FPLC. El objetivo general del presente trabajo es purificar la paroxonasa-1 de humano por FPLC y determinar el efecto del jugo de granada en su actividad enzimática. Se obtuvieron valores de V_{max} y K_m para la hPON1 en su forma natural de 19.62 nmoles/mL*min y 1.19 mM respectivamente. Mientras que para hPON1 en presencia de jugo de granada los valores obtenidos fueron para V_{max} y K_m de 34.54 nmoles/mL*min y 2.34 mM respectivamente. Estos resultados demuestran que el jugo de granada incrementó la actividad enzimática de manera que esto podría ser un mecanismo de acción cardioprotector del jugo al inducir la actividad de la PON1h, la cual se ha reportado en el desarrollo de la aterosclerosis.

Palabras clave: Paraoxonasa-1humna, actividad enzimática, cromatografía de interacción hidrofóbica, jugo de granada.

ABSTRACT

Human serum paraoxónase 1 (hPON1) is a glycosylated protein with an estimated molecular weight of 43 kDa, consists of 354 amino acids, it is a calcium-dependent esterase. It has the ability to hydrolyze a broad range of organophosphorus compounds, the enzyme is primarily synthesized in the liver and secreted in plasma. It is associated mainly with high-density lipoprotein (HDL), and prevents low-density lipoproteins (LDL) from oxidation, which are involved in the initiation and progression of atherosclerosis. hPON1 purification has been a challenge since years ago. Purified form of the hPON1 would be analyzed in detail its biological function. On the other hand the Pomegranate is a fruit rich in antioxidant compounds, some of them as quercetin have shown the ability to induce the activity of PON1. To purify the enzyme, a hydrophobic interaction chromatography was used, employing a column HiPrep Phenyl FF (high sub) 10/16, coupled to a AKTA-FPLC system. The main objective of the present work was to purify hPON1 and to determine the effect of the pomegranate juice on the enzymatic activity. 19.62 nmol/min/mL 1.19 mM values were obtained for V_{max} and K_m respectively whereas 34.54 nmol/min/mL and 2.34 mM values were obtained for hPON1 in presence of pomegranate juice respectively. These results demonstrated that pomegranate juice increased the enzymatic activity so that it might be a cardioprotective mechanism of action might from the juice by inducing PON1h activity, because PON1 has been reported as a enzyme involved in the prevention of the developing of atherosclerosis.

Keywords: human Paraoxónase-1, enzymatic activity, hydrophobic interaction chromatography, pomegranate juice

INTRODUCCIÓN.

1. PROTEÍNAS

1.1 CONCEPTO

Las proteínas son polímeros de aminoácidos que realizan la mayor parte de las funciones vitales de las células tales como: reconocimiento molecular, transporte de moléculas, protección, función estructural, interactúan como catalizadores en reacciones químicas entre otras¹. Las proteínas son biomoléculas formadas básicamente por carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno. Pueden además contener azufre y en algunos tipos de proteínas, fósforo, hierro, magnesio y cobre entre otros elementos².

1.2 LA ESTRUCTURA DE LAS PROTEÍNAS

Todas las proteínas poseen una misma estructura química central, que consiste en una cadena lineal de aminoácidos. Sin embargo, la secuencia lineal de aminoácidos puede adoptar múltiples conformaciones en el espacio que se forma mediante el plegamiento del polímero lineal. Tal plegamiento se desarrolla en parte espontáneamente, por la repulsión de los aminoácidos hidrófobos por el agua, la atracción de aminoácidos cargados y la formación de puentes disulfuro y también en parte es ayudado por otras proteínas¹.

Por tanto, podemos distinguir cuatro niveles de estructuración en las proteínas (figura 1)³.

- Estructura primaria
- Estructura secundaria
- Estructura terciaria
- Estructura cuaternaria

ESTRUCTURA PRIMARIA

La estructura primaria consiste en el número y la posición que ocupa cada aminoácido en la cadena polipeptídica, es decir la secuencia de aminoácidos. La importancia de este nivel

radica en que la posición que ocupa cada aminoácido dentro de la cadena va a condicionar el resto de los niveles estructurales, además de la función que desempeña la proteína³.

El esqueleto polipeptídico está unido por enlaces covalentes, conocido como enlaces peptídicos, enlazados mediante el carbono del grupo carboxilo de un aminoácido y el grupo amino del siguiente aminoácido⁴.

ESTRUCTURA SECUNDARIA

La estructura secundaria es el resultado de los enlaces de hidrógeno locales que se encuentran a lo largo de la cadena polipeptídica. Estos enlaces dan solidez y a la vez flexibilidad a la proteína. Gracias a la ordenación regular y periódica de la cadena polipeptídica en una dirección determinada, se pueden encontrar dos tipos de estructura secundaria: la hélice- α y la conformación- β ³.

En la hélice α , la cadena polipeptídica adopta una conformación helicoidal. Esta conformación se estabiliza por puentes de hidrógeno, mientras que los grupos -R de los aminoácidos se disponen hacia fuera de la hélice evitando las interacciones estéricas y estabilizando la conformación³.

En la conformación β , la cadena adopta una ordenación lineal en la que los grupos -R, de los aminoácidos, se van alternando por encima y por debajo del plano del enlace peptídico. Esta conformación se estabiliza con puentes de hidrógeno entre varias cadenas de proteínas con conformación- β . El resultado de estas interacciones es la hoja plegada β , que puede presentar un plegamiento paralelo, (en el que las cadenas vecinas se desarrollan en la misma dirección), o bien un plegamiento antiparalelo con cadenas vecinas en direcciones opuestas³.

ESTRUCTURA TERCIARIA

En esta estructura, la proteína adquiere su forma tridimensional gracias a la disposición de todos los átomos que componen a la proteína. Esta estructura terciaria es estabilizada por puentes de hidrógeno entre cadenas laterales, enlaces disulfuro, fuerzas de van der Waals, interacciones iónicas entre cadenas laterales⁴.

Las proteínas globulares se pliegan en dominios compactos que contienen entre 40 y 300 aminoácidos. La cadena atraviesa el glóbulo en sus dos formas principales: hélice- α o β . La conformación espacial de las proteínas depende lógicamente de su estructura primaria, así las cadenas laterales de los aminoácidos en las proteínas globulares se hallan distribuidas espacialmente de acuerdo con sus polaridades⁵.

Los aminoácidos no polares aparecen, casi siempre, en el interior de la proteína, para no entrar en contacto con el disolvente acuoso que la envuelve, creando un ambiente hidrofóbico. Por lo contrario los residuos polares con carga se hallan situados, normalmente en la zona externa, interactuando con el medio acuoso. A veces, se requiere de estos centros en la parte interna de la proteína y en estos casos también ocurre que están directamente implicados en alguna funcionalidad de la proteína, bien a nivel estructural o bien a nivel catalítico³.

ESTRUCTURA CUATERNARIA

Un gran número de proteínas, conocidas como oligoméricas, están formadas por la asociación no covalentes de dos o más moléculas. La estructura cuaternaria, está determinada por el número y orientación de las subunidades, existen dímeros formados por subunidades idénticas llamados homodímeros, o por subunidades diferentes llamados heterodímeros. Las interacciones que existen entre el contacto de las subunidades son muy similares a las que se presentan en los monómeros. Entre las cuales predominan las interacciones entre grupos no polares, puentes de hidrogeno, interacciones entre grupos cargados y puentes de disulfuro⁵.

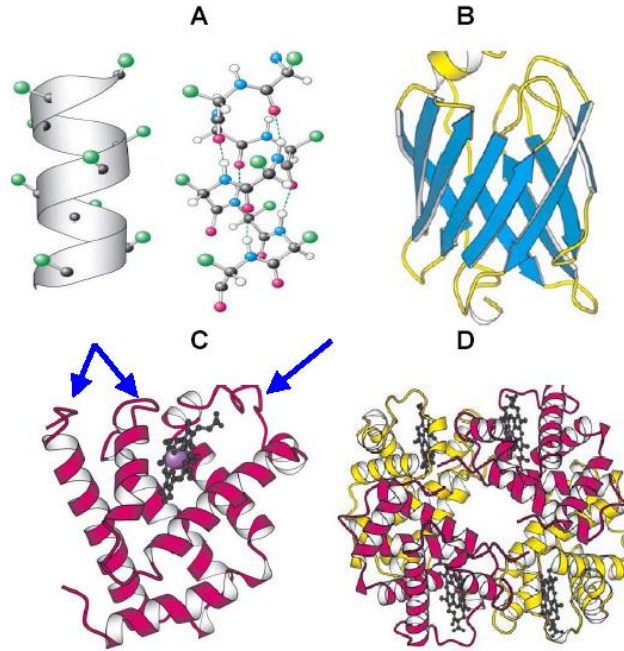


Figura 1. Representación de los diferentes niveles estructurales de las proteínas.

A: hélice- α . B: lamina- β . C: estructura terciaria D: estructura cuaternaria.

Fuente: González-Andrade (2005)¹.

1.3 CLASIFICACION DE PROTEÍNAS EN BASE A SU FORMA.

Las proteínas se dividen en dos grupos: fibrosas y globulares. Las proteínas fibrosas muestran en su estructura la repetición de elementos de estructura secundaria, como hélices α o hebras β , para formar fibras cilíndricas alargadas que son utilizadas como sostén estructural de células y tejidos⁶.

Por otra parte, las proteínas globulares contienen, además de las hélices α y hebras β , estructuras no repetitivas como asas y giros, gracias a las cuales adoptan estructuras compactas y globulares con una función particular. Las proteínas globulares tienen la capacidad de reconocer a otras moléculas, tan pequeñas como el O_2 o tan grandes como ellas mismas⁶.

2. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

La purificación de proteínas resulta esencial para el análisis detallado de las propiedades físicas y funcionales de una proteína; el aislamiento de una proteína específica requiere generalmente de múltiples técnicas de purificación como la cromatografía, donde es importante la solubilidad de la proteína en función del pH, polaridad o concentración de sales⁷.

2.1 CROMATOGRAFÍA

Existen varias técnicas de cromatografía que pueden emplearse para separar mezclas de proteínas de acuerdo con las propiedades moleculares, tales como el tamaño, la forma, el peso, o determinadas afinidades de unión⁸. En los diferentes métodos cromatográficos, la mezcla proteica se disuelve en un líquido (fase móvil). Al pasar las proteínas a través de la fase estacionaria (alguna matriz sólida), se separan unas de otras, debido a la interacción entre cada fase⁹.

2.1.1 CROMATOGRAFÍA DE INTERACCIÓN HIDROFÓBICA

La cromatografía de interacción hidrofóbica (CIH), se basa en la adsorción, que se produce cuando los grupos hidrofóbicos que están expuestos de una proteína interactúan con los grupos hidrofóbicos de la matriz de la fase estacionaria, haciendo que este proceso sea termodinámicamente favorable¹⁰. Esta interacción se debe a las fuerzas de atracción de Van der Waals y a la interacción hidrofóbica entre las proteínas y los ligandos inmovilizados¹¹.

La CIH se lleva a cabo en 2 etapas, la primera consiste en determinar el tipo de sal a utilizar (principalmente caotrópicas) y la segunda etapa en la elución de la proteína la cual dependerá fundamentalmente de la hidrofobicidad de la proteína y la matriz. Las proteínas cuentan con diferentes tipos de aminoácidos hidrofóbicos y por lo tanto se adhieren con diferente fuerza a los medios de la CIH. Es de gran importancia determinar las concentraciones de sal adecuadas a la proteína, ya que produce que los grupos más

hidrofóbicos se enlacen al medio, mientras que otras proteínas menos hidrofóbicas se mantendrán en solución¹¹.

2.1.2 CROMATOGRAFIA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR

La separación en cromatografía de partición y en cromatografía de intercambio iónico se logra de diferentes interacciones de solutos. En contraste, la separación en cromatografía de exclusión por tamaño se lleva a cabo por diferencias en tamaño molecular y la habilidad de diferentes moléculas para penetrar los poros de la fase estacionaria a diferentes tamaños o magnitudes.

La cromatografía de exclusión por tamaño se usa extensivamente para las separaciones preparativas de macromoléculas de origen biológico, así como para la purificación de polímeros sintéticos⁸.

Este tipo de cromatografía se realiza en columnas cilíndricas rellenas con algunos de los geles que se fabrican con este fin y que pueden ser de varios tipos: dextranos con enlaces cruzados, agarosa y poliacrilamida. Todos estos geles se hallan constituidos por partículas de un material esponjoso hidratado, que contiene poros con un tamaño de diámetro determinado⁹. Esta cromatografía, es también una herramienta analítica utilizada para determinar el peso molecular de las proteínas. A partir de proteínas con peso molecular conocido, se elabora una curva estándar, con la que se puede determinar el peso molecular de otras proteínas⁵.

2.1.3 CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO.

La cromatografía de intercambio iónico separa las proteínas de acuerdo con su carga⁹. La separación se produce por absorción reversible de las moléculas cargadas por los grupos inorgánicos, de carga opuesta inmovilizados dentro de la fase estacionaria⁸.

Un intercambiador iónico consiste de una matriz sólida insoluble a la cual se unen de forma covalente grupos cargados. La matriz puede tener carga positiva o negativa y los contraiones también. Los intercambiadores cargados positivamente tienen contraiones cargados negativamente (aniones) por lo que son llamados intercambiadores aniónicos. Intercambiadores cargados negativamente tienen contraiones cargados positivamente (cationes) y se les conoce como intercambiadores catiónicos. Los intercambiadores iónicos fuertes están completamente ionizados en un amplio rango de pH mientras que con los intercambiadores iónicos débiles, el grado de disociación y la capacidad de intercambio varían más marcadamente con el pH⁸.

La cromatografía de intercambio iónico se presenta en 4 etapas⁸.

1.- Equilibrado de la fase estacionaria.- en donde se deben favorecer las condiciones de pH y fuerza Iónica que permitan la unión de las proteínas deseadas.

2.- Aplicación y muestra del lavado.- las muestras se deben encontrar en la misma concentración de amortiguador, que se utiliza para el equilibrado de la fase estacionaria, con esto permitirá que las proteínas con la carga adecuada desplacen a los contraiones y se adsorban reversiblemente a la matriz.

3.-Elución de las proteínas.- en este paso, se intercambia el pH, o más frecuentemente, se incrementa la fuerza Iónica del amortiguador. Las proteínas eluyen en orden inverso a su fuerza de unión, que es determinado por el número de grupos cargados en la superficie.

4.- Regeneración.- en este último proceso, se asegura que las proteínas que no han eluido bajo las condiciones aplicadas en principio, sean eluidas, con el propósito de asegurar la capacidad total del intercambiador para una nueva proteína.

3. ENZIMAS

3.1 DEFINICIÓN

Las enzimas son catalizadores generalmente de origen proteico que aceleran la velocidad de una reacción disminuyendo la energía de activación, pero no se consumen en la misma. Otra propiedad de las enzimas, es su alto grado de especificidad, esto es, que solamente se cataliza la reacción en la que participan un sustrato o un grupo de sustratos con ciertas características químicas y geométricas comunes¹².

3.1.1 RADICALES LIBRES Y ENZIMAS QUE INTERVIENEN EN EL ESTRÉS OXIDATIVO

El organismo forma continuamente moléculas o átomos que presentan electrones no apareados en su última capa u orbital electrónico, dando lugar a la formación de radicales libres (RL) provocando a su vez daño celular¹³. En el organismo la producción de RL es permanente y se encuentra asociada con el metabolismo celular del oxígeno y las reacciones de óxido-reducción¹⁴.

Los RL son responsables en gran parte del daño oxidativo de macromoléculas biológicas, tales como el ácido desoxiribonucleico (ADN), lípidos, carbohidratos y proteínas. En el organismo existen sistemas adecuados para producir defensas contra los agentes antioxidantes, además se puede producir la reparación del daño oxidativo¹⁵.

Por otra parte los antioxidantes se definen como “cualquier sustancia que, cuando se presenta en bajas concentraciones comparado con las de un sustrato oxidable, retrasa o inhibe la oxidación de ese sustrato significativamente”, es por ello que uno de los sistemas más importantes para evitar la oxidación es el de las enzimas¹⁶.

Las enzimas antioxidantes constituyen un grupo formado por la superóxido dismutasa dependiente de Cu y Zn (CuZn SOD) superóxido dismutasa dependiente de Mn (Mn SOD),

glutación peroxidasa (GPx), glutación reductasa (GR), glutación S-Transferrasa (GST), y glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PD). Estas enzimas protegen a la célula contra los radicales de oxígeno producidos durante el metabolismo normal o que se puedan producir por moléculas del medio externo, lo que ocasiona el daño oxidativo. La SOD, CAT Y GPx se consideran antioxidantes primarios, ya que intervienen en la eliminación directa de especies activas de oxígeno. La GST, GR y G6PD, son antioxidantes secundarios que intervienen en la detoxificación de especies reactivas de oxígeno disminuyendo los niveles de peróxido⁵.

4. PARAOXONASAS

Las paraoxonasas son un grupo de enzimas pertenecientes a una familia génica, que están presentes en los mamíferos en tres diferentes formas codificadas por los genes PON1, PON2 y PON3¹⁷. Esta familia de genes deriva posiblemente de la replicación de un gen común, puesto que son similares en el 70% de la secuencia de nucleótidos y el 60% de aminoácidos, y están ubicados en posiciones adyacentes en el cromosoma 7 humano¹⁸.

La paraoxonasa 1 humana (hPON1) se expresa principalmente en el hígado, facilita la hidrólisis de compuestos organofosforados, ésteres carboxílicos aromáticos, carbamatos y ésteres alifáticos insaturados¹⁹. Se encuentra asociada principalmente con las lipoproteínas de alta densidad (HDL), y es así como circula en el torrente sanguíneo²⁰.

La hPON2, se encuentra expresada principalmente en el hígado, riñón y cerebro, se ha encontrado que su principal función fisiológica es la protección de la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad, además también es capaz de hidrolizar lactonas aromáticas y lipoperóxidos²¹.

La hPON3, se expresa en hígado, placenta, pulmón y testículos, esta enzima se ve asociada en la protección de la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad mostrando mayor

capacidad que la hPON1, pero teniendo como limitante su menor expresión, por tanto su importancia resulta menor¹⁸.

4.1 PAROXONASA-1

4.1.1 Características

En 1946, Abraham Mazur fue el primero en reportar la presencia de una enzima en el tejido animal que era capaz de hidrolizar compuestos organofosforados²². Esto llevó a la identificación inicial de la enzima paraoxonasa sérica humana en la década de 1950²³.

La hPON1 (EC 3.1.8.1) se identificó inicialmente en el campo de la toxicología puesto que era capaz de hidrolizar organofosforados sintéticos como pesticidas (paraoxón, metabolitos oxones de clorpirifós y de diazinón) o gases nerviosos (sarín y somán)²⁴.

La enzima hPON1 es una proteína que se ha identificado en los mamíferos y que no se encuentra en peces e invertebrados²⁵. De hecho, hay una gran similitud en la organización estructural de los genes hPON1 de humanos y de ratones, de lo que se deduce su importancia metabólica en los mamíferos²⁶.

Mackness y cols. (1991) demostraron que la hPON1 podría evitar la acumulación de lipoperóxidos en la lipoproteína de baja densidad (LDL) vinculando así a la hPON1 con la prevención de enfermedades cardiovasculares²⁷.

Recientemente, se determinó la estructura cristalina de una variante recombinante de la PON, haciendo de la hPON1 la primera proteína asociada a las HDL descubierta en la estructura tridimensional de las lipoproteínas²⁸.

4.1.2 Clasificación bioquímica

La hPON1 es una proteína glicosilada, con un peso molecular aproximado de 43-kDa, y compuesta de 354 aminoácidos²⁹, contiene 3 cadenas de carbohidratos, lo que representa el

15.8% de su peso³⁰, el gen que la codifica se encuentra localizado en el cromosoma 7 región q21.3³¹.

Esta enzima se sintetiza por el hígado, y es liberada mediante un proceso que involucra a las HDL. Las HDL se unen a la membrana de los hepatocitos, removiendo a la PON de la membrana³², a través de extremo NH₂ terminal, donde existe una región hidrofóbica³³.

La hPON1 presenta en su estructura seis hojas β plegadas y cada hoja contiene cuatro hebras (figura 2)³⁴. Contiene dos iones de calcio, que se encuentran en el túnel central de la hélice, uno en la parte superior (Ca1) y el otro en la sección central (Ca2).

El Ca2 tiene una función estructural cuya disociación conduce a la irreversible desnaturalización en tanto que el Ca1 es considerado como el “calcio catalítico”, ya que forma parte del sitio activo de la enzima³⁵.

El Ca2 interactúa con cinco residuos de aminoácidos (uniéndose a los oxígenos de la cadena lateral de Asn224, Asn270, Asn168, Asp269 y Glu53). Otros ligandos potenciales son una molécula de agua y uno de los oxígenos de un ion fosfato.

El sitio de unión del Ca1 es más amplio que la del Ca2. Sin embargo, dos de los residuos de unión de Ca1 (Asn224 y Asp269) presentan ángulos diedros distorsionados. Esto aunado a la mayor accesibilidad disolvente del Ca1 indica una mayor afinidad³⁶.

La hPON1 expresada en células animales está glicosilada. Esta glicosilación no es esencial para las actividades hidrolíticas de la enzima, pero puede ser importante en el aumento de su solubilidad y estabilidad, o en la prevención inespecífica de unión a las membranas celulares³⁷.

Se han descrito 4 posibles sitios potenciales de N-glicosilación en la hPON1, dos de ellos (Asn227 y Asn270) están en el túnel central de la hélice y son en gran parte inaccesibles a disolventes. Asn253 y Asn324 se encuentran en los bucles de superficie, y se cree que sean los sitios de glicosilación de la enzima³⁸.

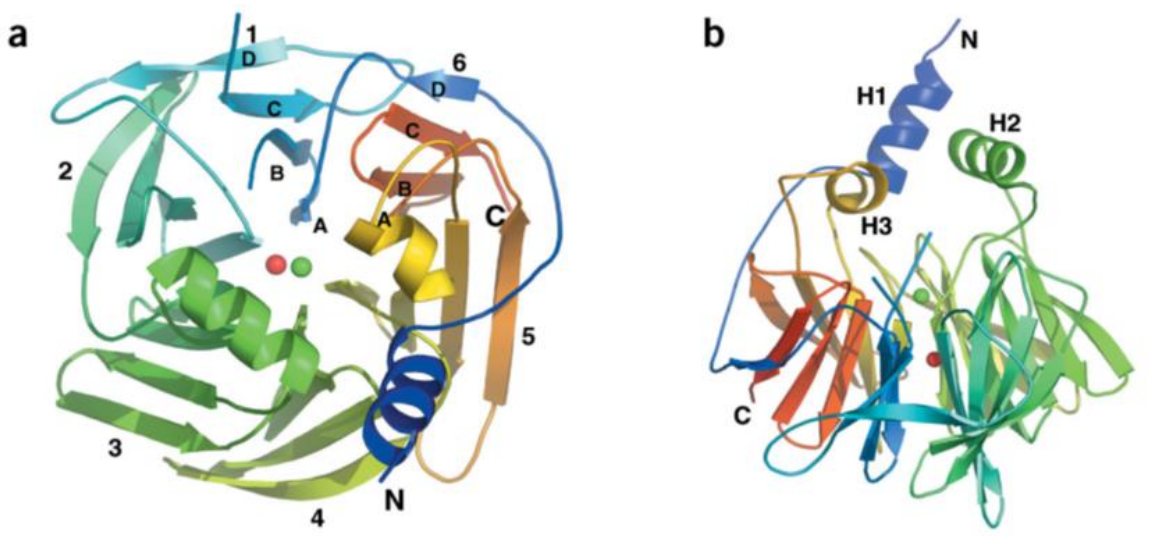


Figura 2.- Estructura general de la hPON1. (a) Vista de las seis hojas β -plegadas. La parte superior de la hélice es, por convención, la cara que lleva los lazos que unen el exterior de cada hoja (hebra D) con la hebra interna (A) de la hoja siguiente. Se muestra el N y C terminales, y los dos átomos de calcio en el túnel central de la hélice (Ca1, verde, Ca2, rojo). (b) Una vista lateral, incluyendo las tres hélices en la parte superior (H1-H3) ²⁸.

4.2 PAPEL ANTIOXIDANTE DE LA hPON1

Debido a que la hPON1 viaja anclada a las HDL, aparentemente juega un papel importante en el desarrollo de aterosclerosis^{39, 40}, esta idea se apoya por estudios realizados con un grupo de ratones *knockout* PON1 y ratones normales, ambos fueron alimentados con una dieta aterogénica, los ratones *knockout* desarrollaron de forma más susceptible la aterosclerosis⁴².

Aunque se siguen desconociendo el papel fisiológico de esta enzima, numerosos estudios han demostrado el papel antioxidante y por tanto protector de la hPON1 en el desarrollo de aterosclerosis, teniendo como principales funciones:

1. La protección de las moléculas LDL, HDL y macrófagos frente al estrés oxidativo^{40,43-45}.
2. La inhibición de la síntesis de moléculas que facilitan la adhesión de monocitos a la pared de los vasos sanguíneos⁴⁶⁻⁴⁸.

3. La disminución de la captación de LDL-ox por los macrófagos impidiendo la formación de las células espumosas⁴⁹.
4. Inhibición de la biosíntesis del colesterol por los macrófagos⁵⁰.

4.3 POLIMORFISMOS DE LA PARAOXONASA-1

Se conocen 4 tipos diferentes de polimorfismos que modifican la expresión y la concentración sérica de la enzima, los polimorfismos encontrados son: hPON1_{C107T}, hPON1_{A162G}, hPON1_{G824A} y hPON1_{G907C}⁵¹⁻⁵³.

Otro polimorfismo actualmente conocido es el hPON1_{L55M}⁵³, la isoforma tiene un papel importante en la unión de la enzima con el HDL, ya que se ubica en la porción N-terminal de la hPON1, en consecuencia, esto brinda mayor estabilidad en el complejo de la enzima con las lipoproteínas de alta densidad⁵⁴.

Por otro lado, el polimorfismo hPON1_{Q192R}, se caracteriza principalmente por la diferenciación del sustrato que es utilizado para determinar la actividad hidrolítica de la enzima^{24,55}. Así, el paraoxón es más eficiente cuando el polimorfismo está ubicado en la posición 192R en tanto que el diazoxón, soman y sarín son más eficientes para hidrolizar a la enzima cuando presenta el polimorfismo 192Q^{55,56}.

5. ESTRÉS OXIDATIVO Y ANTIOXIDANTES

El término de antioxidantes naturales, es definido como aquellas sustancias que presentan estructuras químicas y mecanismos de acción variados. Estos tienen la función de inhibir o retardar la oxidación de 2 formas: captando radicales libres, son principalmente compuestos fenólicos (AH) que pueden donar un átomo de hidrogeno o un electrón a un radical libre convirtiéndolo en un producto estable, denominándose antioxidantes primarios; y los antioxidantes secundarios, que son compuestos que actúan impidiendo o disminuyendo la cantidad de radicales libres⁵⁷.

El ser humano está protegido del estrés oxidativo gracias a la acción de los agentes antioxidantes que poseen diferentes funciones⁵⁸. Los mecanismos de acción de los antioxidantes presentes en el cuerpo, se presentan cuando la molécula del antioxidante, al colisionar con un radical libre de oxígeno, le cede un electrón, que se oxida a su vez y se transforma en un radical libre de oxígeno débil menos reactivo⁵⁹.

Los antioxidantes polifenólicos están presentes en vegetales, frutas, granos y semillas⁶⁰. Los polifenoles imparten estabilidad oxidativa y microbiológica, además algunos flavonoides se ven asociados con el reforzamiento del sistema inmunológico y ayudan a inhibir procesos carcinógenos y mutágenos⁶¹, también interactúan en la generación de especies reactivas de oxígeno y reducen la oxidación de LDL, ADN y ARN⁶².

6. GRANADA

La granada roja (*Punica granatum L.*) es un fruto con alta capacidad antioxidante, en comparación con otros jugos comúnmente consumidos como el de uva, arándano, toronja o naranja⁶³; la granada es rica en fibra, pectinas, azúcares y taninos, y en su composición se encuentran los principales antioxidantes polifenólicos incluyendo a los elagitaninos y antocianinas concentrados en la piel, membranas y la corteza blanca⁶⁴ (ver tabla 1).

La granada está compuesta principalmente por agua y azúcares, y en menor contenido de grasas y proteínas, lo que le confiere un bajo valor calórico (aprox. 75 kcal/100 g). Presenta también una pequeña proporción de fibra alimentaria, localizada fundamentalmente en el pericarpio (3,1g/100 g), es rica en potasio y aporta cantidades considerables de calcio, magnesio, fósforo y hierro. Contiene, además, vitaminas del grupo B, C y niacina, en concentraciones similares a otras frutas de alto consumo como ciruelas o manzanas⁶⁴.

Tabla 1.-Componentes y constituyentes de la granada.

Componentes de la planta	Constituyentes
Jugo de granada	Antocianinas, glucosa, ácido ascórbico, ácido elálgico, ácido gálico, ácido cafeico, catequina, quercetina, numerosos minerales, hierro, y aminoácidos.
Aceite de semilla de granada	95% de ácido punicico, otros constituyentes, ácido elálgico, otros ácidos grasos, esterole.
Corteza de granada	Pulicanaginas fenólicas, ácido gálico y otros ácidos grasos, catequinas, flavonoides, antocianidinas.

Modificado de: Jurenka, 2008⁶⁵.

Gran parte de su importancia organoléptica y su papel benéfico para la salud, se debe a la presencia de sus compuestos fenólicos, las antocianinas son los responsables del color rojo y los taninos de su sabor astringente⁶⁶.

Las propiedades potenciales terapéuticas de los componentes del jugo de granada han sido estudiadas en diversas patologías, incluyendo el tratamiento y prevención del cáncer⁶⁷, en diabetes⁶⁸ y en enfermedades cardiovasculares⁶⁹. También se ha descrito actividad antimicrobiana contra diferentes microorganismos como: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi* entre otros más⁷⁰.

5.1 PROPIEDADES DE LA GRANADA

En modelos murinos y en humanos la granada ha demostrado tener propiedades medicinales. Propiedades de tipo anticancerígeno, se ha demostrado que inhibe potencialmente la invasión de células cancerígenas prostáticas, induce a la apoptosis, causa ruptura en el ciclo celular e inhibe el crecimiento tumoral^{71, 72}. Propiedades antiinflamatorias, inhibe las enzimas lipo-oxigenasa y ciclo-oxigenasa, que son mediadores proinflamatorios^{73, 74}. También se ha asociado en la prevención y tratamiento de enfermedades cardiovasculares; disminuyendo la absorción de colesterol en sangre, lo que reduce significativamente colesterol total y colesterol HDL^{71, 72, 74, 75}.

Otras propiedades asociadas con el consumo del fruto de la granada son: hipoglucemiante en pacientes con diabetes tipo 2^{72, 74, 76}. Propiedades antihipertensivas, disminuyendo la presión sistólica en pacientes con hipertensión, inhibiendo la enzima que convierte angiotensina en suero⁷². Además ha sido utilizado como remedio en casos de heridas, bronquitis, diarrea e infecciones dérmicas⁷⁷, actividad antifúngica, antiviral y antibacteriana^{71, 72, 74, 77}.

6. GRANADA Y SU RELACION CON LA PARAOXONASA 1

Mientras que la dieta y el aumento de la actividad física constituyen el enfoque preventivo de la salud primaria, los compuestos bioactivos o fitoquímicos de las plantas ha atraído mucho la atención debido a su papel cardioprotector⁷⁸. Estudios epidemiológicos sugieren que los patrones dietéticos caracterizados por un alto consumo de frutas y verduras se ven significativamente asociados con un menor riesgo de presentar enfermedad cardiaca coronaria (CHD) y accidentes cerebrovasculares⁷⁹.

Estudios realizados en ratones CD-1 demostraron que los flavonoides presentes en el jugo de granada protegen a la hPON1 de la oxidación inducida por Cu^{2+} ⁸⁰. Otros estudios realizados en un grupo de pacientes con estenosis de arteria carótida, demostraron que al consumir jugo de granada se incrementó significativamente la actividad de la PON1 (83%) además de una reducción de la oxidación de LDL, tanto basal como inducida por Cu^{2+} ⁸¹.

Otro estudio reciente realizado en ratones CD-1 alimentados con una dieta aterogénica han demostrado que la administración de jugo de granada induce significativamente la expresión y actividad del gen PON1 en comparación con los ratones que no fueron suplementados con el jugo. Asimismo, los animales que recibieron el jugo presentaron una disminución en el peso corporal. También, la suplementación con jugo redujo de manera significativa la glucosa en sangre y los niveles de colesterol, lo que demuestra que el jugo de granada tiene un efecto hipoglucémico⁸².

7. JUSTIFICACIÓN

Si bien la PON1 es una enzima, la cual tiene principalmente propiedades detoxificantes y antioxidantes, a la fecha, su papel fisiológico en el humano es desconocido. Para conocer más a detalle las propiedades de la hPON1, es necesario tener la enzima purificada; sin embargo, en la literatura existen varios reportes que involucran varios pasos de purificación con rendimiento variable; y la mayoría emplea volúmenes grandes de suero o plasma sanguíneo. Cabe mencionar que ninguno de ellos utiliza el sistema FPLC en la purificación, el cual es un equipo útil para la purificación rápida de proteínas.

Por otra parte la granada roja (*Punica granatum L.*) es un fruto que se cultiva en diferentes países del mundo, sin embargo en México la producción y el consumo son bajas; interesantemente, el estado de Hidalgo es uno de los principales productores en el país. Estudios de capacidad antioxidante, demuestran que tiene una actividad antioxidante mayor que el vino rojo, té verde y té negro⁶³. Algunos estudios sugieren que el jugo de granada tiene propiedades antioxidantes, antiaterogénicos⁸³, antihipertensivo⁸⁴ y antiinflamatorios⁸⁵. En un estudio previo en nuestro laboratorio, se sugirió que el mecanismo de acción del jugo de granada es el inducir la expresión del gen de la *PON1*, la cual, como se mencionó puede jugar un papel protector en la prevención del desarrollo de la aterosclerosis al prevenir a las LDL de la oxidación. Por tal motivo, al probar que el jugo es capaz de inducir la actividad de la enzima pura, se podrá contribuir a dilucidar un mecanismo de acción del jugo de granada como cardioprotector, ya que se ha demostrado que la hPON1 juega un papel importante en el desarrollo de la aterosclerosis, y si ésta aumenta su actividad por lo tanto aumentará su acción protectora.

8. OBJETIVOS

8.1 OBJETIVO GENERAL

Purificar la hPON1 mediante FPLC y evaluación de su actividad enzimática en presencia de jugo de granada.

8.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Purificar la hPON1 por cromatografía de interacción hidrofóbica empleando un sistema FPLC.
2. Caracterizar los parámetros cinéticos de la hPON1 purificada.
3. Determinar cómo influye la presencia de jugo de granada en la actividad de la hPON1.

9. HIPOTESIS

El jugo de granada tiene compuestos tal que aumenta significativamente la actividad enzimática de la paraoxonasa 1 humana purificada hPON1 a partir de suero sanguíneo.

10. MATERIAL Y METODOS

10.1.1 Obtención del jugo de granada

La granada roja a empleada en este proyecto fue obtenida de una huerta ubicada en el Municipio de Ixmiquilpan de la región del Valle de Mezquital en Hidalgo. Una vez cosechada, fue lavada, y se utilizó un exprimidor casero de jugos convencional para la obtención del jugo.

10.1.2 Cuantificación de compuestos fenólicos

El contenido de fenoles totales fue determinado por el método de Folin-Ciocalteu. Brevemente, 100 μ L de la muestra fueron mezclados con 100 μ L de reactivo de Folin-Ciocalteu. Después de 3 min, 2 mL de solución de carbonato de sodio (75 g/L) fueron adicionados y mezclados. Se adicionó agua destilada (2.8 mL) y se mezcló vigorosamente invirtiendo los tubos varias veces. Después de 1h, se realizó la lectura de la absorbencia a 750 nm empleando un lector de microplacas (Power Wave XS UV-Biotek, software KC Junior, USA). Los resultados fueron expresados como mg equivalentes de ácido gálico por 100 g de base seca (mg GAE/100g).

10.1.3 Purificación de la enzima

La purificación de la enzima hPON1 se llevó a cabo por cromatografía de interacción hidrofóbica empleando un sistema FPLC.

10.1.4 Obtención de suero sanguíneo

Se colectaron 100 mL de sangre periférica de un donante sano en tubos BD Vacutainer sin anticoagulante, se dejó coagular a temperatura ambiente; una vez coagulada la sangre, se retiró el coágulo con un aplicador de madera estéril, el remanente fue centrifugada a 3200

rpm empleando una centrífuga Hamilton Bell VanGuard V6500, se separó el suero en tubos Eppendorf de 1.5 mL.

El suero fue clarificado, mediante centrifugación a 12000 rpm, por 10 minutos a 4°C en una microcentrifuga refrigerada Mikro 22 R.

Se hicieron alícuotas de 250 uL, y se guardaron a una temperatura de -20°C, hasta su uso posterior.

10.2 PURIFICACIÓN DE LA HPON1

10.2.1 Cromatografía de Interacción Hidrofóbica

La purificación de la hPON1 se llevó a cabo combinando métodos de cromatografía de interacción hidrofóbica.

Se utilizó una columna de interacción hidrofóbica HiPrep Phenyl FF (high sub) 16/10 Healthcare, compatible con el sistema AKTA-FPLC controlado con el software Unicorn 5.1 equipado con colector de fracciones.

La columna fue lavada previamente a su uso con agua desionizada, desgasificada y filtrada con una membrana de 0.45 µ de tamaño de poro, después la columna fue equilibrada con 100 mL de amortiguador A (regulador de fosfatos 50mM y sulfato de amonio 1 mM, pH de 8.0) previamente filtrado y desgasificado.

Se inyectaron 2 ml de suero al sistema, después la corrida se realizó utilizando 40 mL del amortiguador A, la elución de la proteína se hizo con 100 mL del amortiguador B (regulador de fosfatos 5 mM y 0.1 mM cloruro de calcio, pH 7.0) aplicando un gradiente lineal de 0-100 mM para la elución.

Se colectaron fracciones de 1mL en tubos Eppendorf estériles.

Para monitorear la actividad de paraoxonasa, a 50uL de las fracciones colectadas se adicionaron 200 uL de regulador con paraoxón, el desarrollo de color amarillo indicó la actividad de paraoxonasa.

10.2.2 Determinación de concentración de proteínas

Una vez obtenidas las fracciones de mayor actividad, se determinó la concentración de proteína de cada muestra, utilizando el kit para la determinación de proteínas (BIO-RAD DC protein Assay); las muestras se mezclaron con los reactivos del kit durante 20 minutos antes de proceder a la lectura.

Se construyó una curva estándar con de albúmina sérica (0-2 mg/mL), se realizaron lecturas de absorbancia a 750 nm empleando un lector de microplacas Biotek (Power Wave XS UV-Biotek, software KC Junior, USA) colocando en cada pozo: 5 µL de muestra, 25 µL de reactivo A y 200 µL de reactivo B.

10.2.3 Determinación de la pureza de la proteína

El grado de pureza se determinó por electroforesis en gel desnaturalizante poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE por sus siglas en inglés).

Para el gel separador se preparó un gel al 12% en un volumen de 10 mL, conteniendo: 3.3 mL de H₂O desionizada, 4 mL de solución de monómeros de acrilamida al 30%, 2.5 mL de Tris 1.5 M, pH 8.8, 0.1 mL de SDS al 10%, 0.1 mL de persulfato de amonio al 10% y 19 µL de N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina (TEMED).

Para el gel concentrador se prepararon 3 mL al 5%, conteniendo: 2.1 mL de H₂O desionizada, 0.5 mL de acrilamida al 30%, 0.38 mL de Tris 1.0M pH 6.8, 0.03 mL de SDS al 10% y 6µL de TEMED.

10.2.4 Tratamiento de la muestra

Las muestras se ebulleron durante 5 min y fueron mezcladas volumen a volumen con regulador de corrimiento de proteína 2X antes de ser cargadas en el gel.

Se cargaron 30 μg de proteína en cada carril. Se incluyó marcador de peso molecular, posteriormente, la cámara de electroforesis se llenó con regulador de corrimiento. La cámara de electroforesis se conectó a una fuente de poder y se llevó a cabo la electroforesis a 125mV. Una vez corrida la electroforesis, se sacó el gel de la cámara y se colocó en una charola con una solución de azul brillante de Coomassie, se dejó el gel por 24 h, después el gel fue decolorado.

10.2.5 Medición de la actividad de la hPONI

Con la finalidad de observar correlación expresión con actividad, la medición de la actividad de las hPONI se realizó mediante un método semi-automatizado Charlton-Menys, et al, 2006⁸⁶, 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 m, intervalo de tiempo 0.5 m, 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 para el suero 10 μL y para las fracciones purificadas 20 μL de la muestra en una columna de la microplaca (8 pozos), se agregaron 0.2 mL del substrato de paraoxón (3.3 mM) ajustándose a un volumen de 210 μL con el regulador de sustrato, mismo que fue preparado en el momento de su uso, el cual consistió en agregar paraoxón a un regulador conteniendo 2 mM de CaCl_2 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 agregan 0.210 mL del substrato de paraoxón en otra columna de pozos. Una vez preparadas las mezclas, la microplaca fue colocada en lector Bio-Tek y la medición fue efectuada. Los valores de absorbancia a 405 nm fueron grabados y procesados (incluyendo el factor de corrección de paso de luz) por el mismo lector para tener valores expresados en $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$.

10.2.6 Determinación de Km Y Vmax de la hPON1 purificada.

Se realizaron cinéticas enzimáticas de las fracciones colectadas y con la presencia de jugo de granada empleando como sustrato al paraoxón en diferentes concentraciones oscilando de 0.1-4.0 mM. Para los cálculos de los parámetros cinéticos se empleó el software GraphPad Prisma versión 5.01 2007.

10.2.7 Cinética enzimática de la hPON1 purificada en presencia de jugo de granada

La actividad enzimática en presencia de jugo de granada se siguió espectrofotométricamente utilizando un lector de microplacas a una absorbencia de 405 nm, determinada a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ en amortiguador C (Tris 100 mM y CaCl 2mM pH 8.0) utilizando al paraoxón (3.3 mM) como sustrato, la cinética se llevó a cabo por 30 minutos.

Los ensayos de actividad catalítica se realizaron utilizando la fracción H10 empleando 15 μL de hPON1 con una concentración de 1.46 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0.71 μL de paraoxón, 199.29 μL de amortiguador C, pH 7.4, se adicionó jugo de granada a diferentes equivalentes de ácido gálico oscilando entre los 150-900 mg EAG/L a cada pozo para determinar en forma aproximada cual cantidad de equivalentes aumentaba la actividad de la paraoxonasa 1 en un volumen final de 220 μL para cada pozo.

Para la realización de las curvas de cinética enzimática y determinación de parámetros cinéticos se elaboró una curva aumentando la concentración de sustrato paraoxón (0.1-4.0 mM), en presencia de jugo de granada equivalente a 500 mg EAG/L.

10.2.8 Inhibición de la actividad enzimática por EDTA

Para determinar la inhibición de la hPON1 purificada por EDTA en presencia de jugo de granada se realizaron cinéticas enzimáticas a diferentes concentraciones de EDTA

oscilando entre 0-1000 mM y en presencia de jugo de granada equivalente a 500 mg EAG/L

10.2.9 Análisis estadístico

Pruebas de t de Student fueron usadas para la comparación de medias, y pruebas de ANOVA se utilizaron cuando más de 2 grupos fueron comparados. Los resultados fueron expresados como la desviación estándar de la distribución de la muestra media. Las diferencias fueron consideradas significantes si $P \leq 0.05$.

11.RESULTADOS

11.1.1 Purificación de la enzima hPON1

Empleando una columna HiPrep Phenyl FF (high sub) 16/10 de interacción hidrofóbica, acoplada al sistema AKTA-FPLC, se inyectaron 2 mL de suero, a una velocidad de flujo del 1mL/min, a pH 8.0, con un presión de 0.10 Mpa. Se recolectaron fracciones de 1 mL, estas fracciones fueron eluidas utilizando un gradiente lineal de agua baja en sales (Figura 3), posteriormente a las fracciones que mostraron grandes picos de absorbencia se monitorearon, agregando regulador con paraoxón.

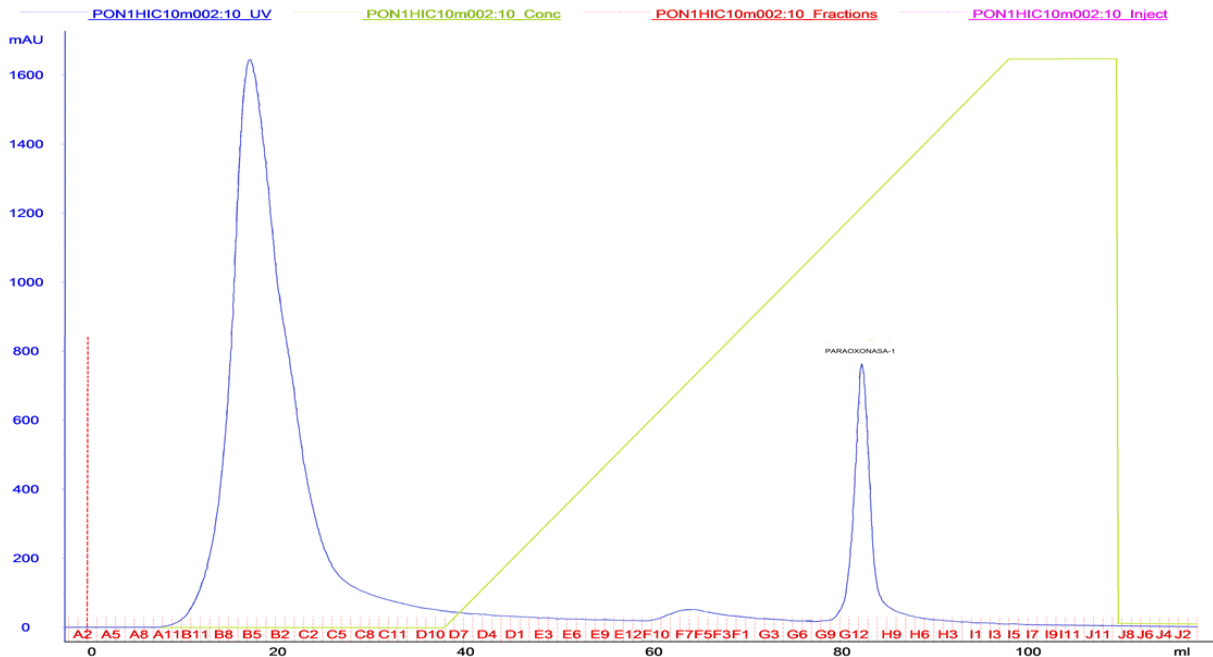


Figura 3.- Cromatograma de la purificación de la hPON1 empleando la columna HiPrep (high sub) 16/10 de interacción hidrofóbica. Se obtuvieron 3 picos, se monitoreo la actividad a cada una de las fracciones que conformaron los picos y se determinó la presencia de la paraoxonasa 1.

De las fracciones obtenidas en el tercer pico de absorbancia, se determinó la presencia de la paraoxonasa en los tubos G12, H12, H11, H10, H9, H8 Y H7, de estas fracciones las que mostraron actividad fueron H12, H11, H10 y H9. Estas fracciones fueron colectadas en tubos Ependorff , en total se obtuvieron 12 tubos y fueron utilizadas para los posteriores

experimentos. Se midió la actividad de otros picos resultantes en la cromatografía, sin embargo, sólo se encontró actividad en las fracciones H.

En la figura 4 se presenta tanto la actividad enzimática de las muestras como sus respectivas absorbancias, en donde los picos más altos de actividad se encuentran en las fracciones H11, H10 y H9, siendo la fracción H10 la que mostró la mayor actividad aunque no fue con la mayor cantidad de proteína.

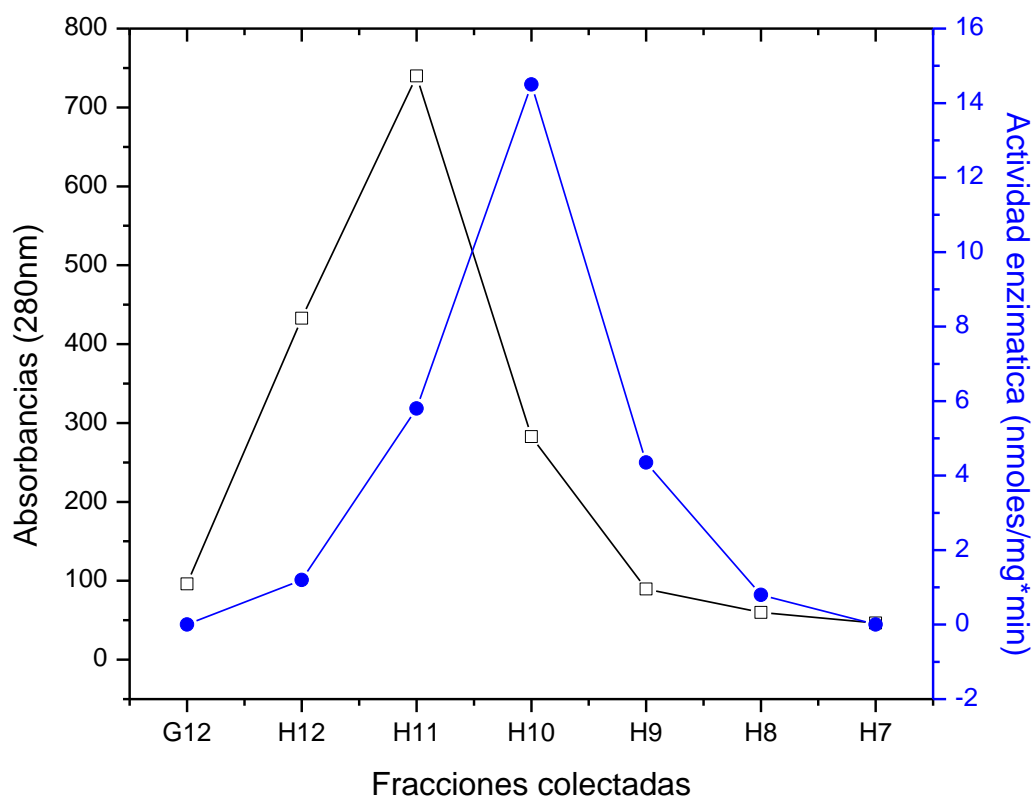


Figura 4.- Cromatografía de interacción hidrofóbica. Absorbancias (-□-) y actividad específica (-●-) de muestras obtenidas en el tercer pico de absorbancia. Las muestras de mayor absorbancia y actividad específica se presentaron en las fracciones H12, H11, H10, H9.

11.1.2 Determinación de la pureza de la proteína

Para verificar la pureza de la enzima obtenida, se realizó un gel de poliacrilamida (Figura 5), se tomó una muestra de los tubos que presentaron mayor actividad y absorbencia, después de este procedimiento se comprobó que las enzimas más puras se encontraban en las fracciones H9, H10, H11, la fracción H12 presentó poca concentración de proteína.

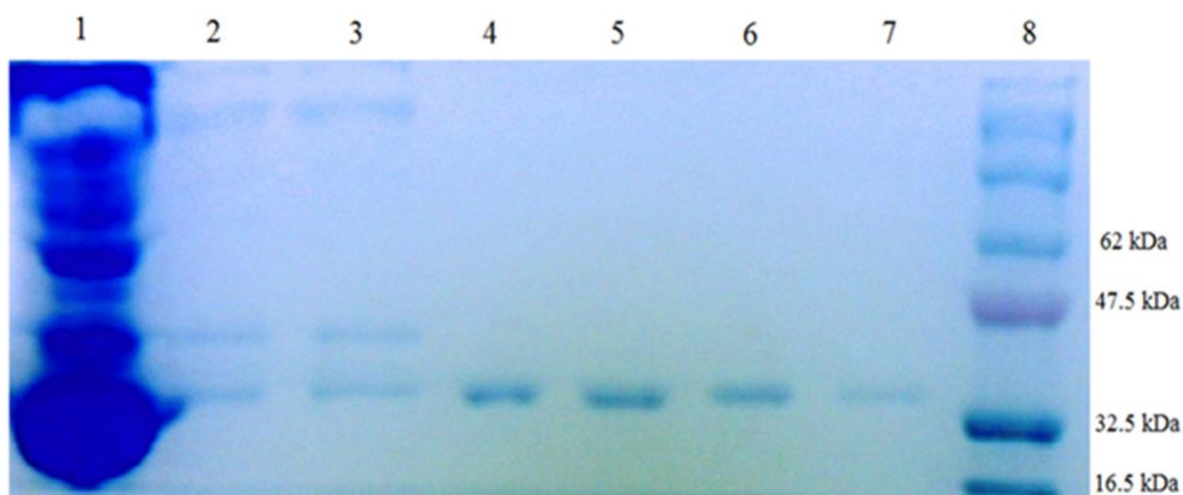


Figura 5. Analisis SDS-PAGE de la paraoxonasa 1 purificada. El carril 1, corresponde al suero obtenido después de la centrifugación de la sangre, y los carriles 2 y 3 corresponden a las fracciones obtenidas después de la inyección del suero al sistema AKTA-FPLC, los carriles 4, 5, 6 y 7 corresponden a las fracciones con mayor actividad H9, H10, H11 y H12 en donde se puede observar que todos los carriles llegan a una distancia entre los 35-47.5 kDa, y no presentan impurezas, en el carril 8 se colocó en marcador de peso molecular.

11.1.3 Cuantificación de proteínas

Al cuantificar a las proteínas, en las fracciones H9, H10 y H11 se obtuvieron concentraciones de 0.428 mg/mL, 1.487 mg/mL y 1.943 mg/mL respectivamente, para el suero centrifugado se obtuvo una concentración total de 60 mg/mL.

Si bien la fracción que más concentración total de proteínas mostro fue la H11, las otras fracciones obtenidas tuvieron más actividad enzimática, lo que indica mayor actividad específica.

El proceso de purificación de la paraoxonasa sérica humana para este trabajo consistió únicamente en un solo paso a través de una cromatografía de interacción hidrofóbica.

De acuerdo con los datos anteriores se calculó la actividad específica así como el rendimiento de la purificación, tal y como se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 2. Resumen del proceso de purificación de la paraoxonasa sérica humana 1

PASOS	Volumen (mL)	Proteína total (mg)	Actividad T. (U)	Actividad Esp. (U/mg prot.)	Rendimiento (%)
Suero	2	120	22.5	0.18	100
Interacción Hidrofóbica					
Fracción H9	1	0.43	0.29	0.67	1.2
Fracción H10	1	1.49	0.96	0.64	4.2
Fracción H11	1	1.94	0.38	0.19	1.6

Si bien se obtuvo poca concentración de proteína total y actividad total después del proceso de interacción hidrofóbica, para cada una de las fracciones, la actividad específica de las fracciones H9 y H10 fue mayor con respecto a la del suero, lo que indica que hubo una mayor concentración de paraoxonasa en estas dos fracciones, para la fracción H11 la concentración de proteína fue elevada así como su actividad total, sin embargo la actividad específica fue muy baja con respecto a las otras fracciones.

Por otra parte el rendimiento de purificación se nota muy bajo con respecto al suero, sin embargo esto podría ser considerable dado que se utilizó poco suero; dado los anteriores

resultados se determinó que la fracción H10 fue la que mejores condiciones mostraba con respecto a las otras dos fracciones, por tal motivo esta fracción fue utilizada para la determinación de parámetros cinéticos en forma nativa y en presencia de jugo de granada.

11.1.4 Actividad enzimática de las fracciones en presencia de jugo de granada

Para la medición de la actividad enzimática en presencia de jugo de granada todas las fracciones que fueron determinadas como puras después del gel de poliacrilamida y la determinación de concentración total de proteína, fueron analizadas con diferentes concentraciones de jugo de granada a fin de determinar aumentos en la actividad de la enzima.

Se realizó un comparativo de la actividad de las tres fracciones a fin de determinar cuál era la fracción más óptima para los experimentos de cinética y cuál era la concentración de jugo de granada para evitar la inhibición de la enzima (figura 6); todas las fracciones fueron medidas en las mismas condiciones, se utilizó jugo de granada fresco para el mayor aprovechamiento de sus compuestos. Los experimentos se realizaron por triplicado para tener reproducibilidad en los resultados.

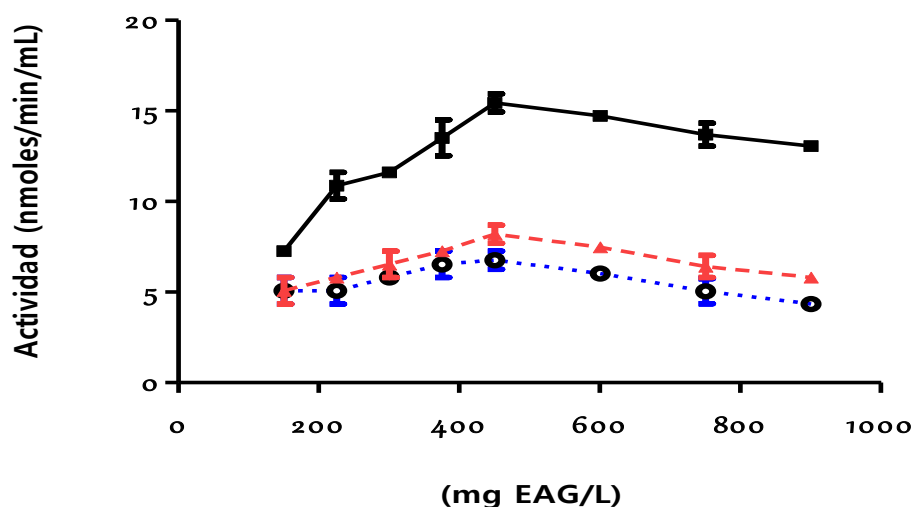


Figura 6. Actividad de todas las fracciones en presencia de JG. Cinética de las fracciones H9 (○), fracción H10 (■) y fracción H11 (▲).

Todas las fracciones mostraron un aumento en la actividad enzimática en presencia del jugo de granada, con respecto a la actividad reportada en su forma natural; de igual manera el comportamiento de las fracciones fue similar, ya que conforme se aumentó la cantidad de jugo de granada, la actividad se incrementó, la actividad máxima para las 3 fracciones se presentó en una concentración de 450 mg EAG/L; sin embargo al aumentar la concentración de JG, primermente se alcanzó la velocidad máxima y posteriormente hubo un decremento en la actividad, con lo cual se determinó utilizar la concentración de 450 mg EAG/L de jugo para los posteriores experimentos.

El mayor aumento de actividad se presentó en la fracción H10, presentando una actividad de 16 nmoles/min/mL, en comparación con la fracción H9 y H10 que tuvieron su actividad mayor de 7.25 y 8.70 nmoles/min/mL respectivamente, con una diferencia significativa para dichos valores ($P=0.001$); dado que la fracción H10 tuvo una buena concentración de proteína y buena actividad tanto en su forma natural como en presencia de jugo de granada se determinó que esta muestra sería utilizada para los experimentos de cinética enzimática.

11.1.5 Determinación de K_m Y V_{max} de la hPON1 purificada

Los parámetros cinéticos para la enzima hPON1 purificada, se obtuvieron aumentando la concentración de paraoxón para determinar la velocidad máxima (V_{max}) y la K_m . De este experimento se realizó la comparación de los comportamientos entre la enzima en su forma natural y la enzima en presencia de jugo de granada. El valor de la V_{max} y K_m para la hPON1 en su forma natural fueron de 19.62 nmoles/min/mL y 1.19 mM respectivamente. Mientras que para hPON1 en presencia de jugo de granada los valores obtenidos fueron para V_{max} y K_m de 34.54 nmoles/min/mL y 2.34 mM respectivamente (figura 7).

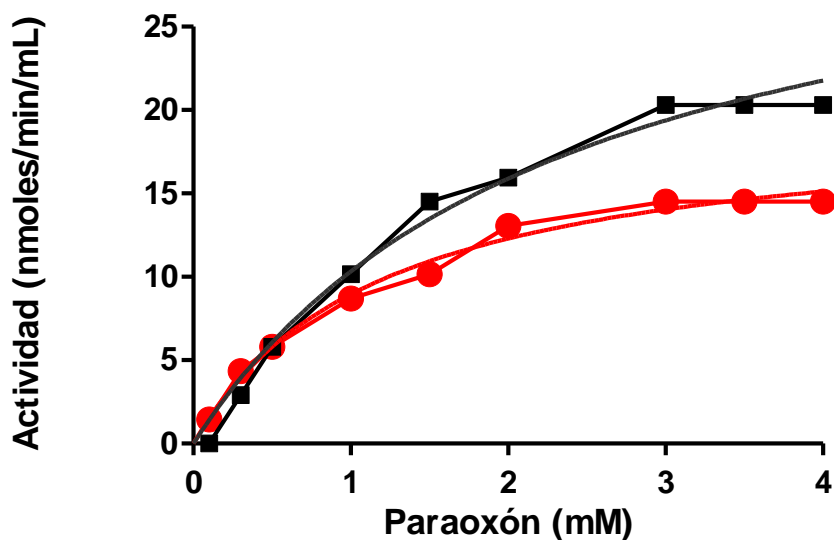


Figura 7. Determinación de los parámetros cinéticos para la hPON1 purificada. Determinación de la K_m y V_{max} de la hPON1 purificada, para la enzima en su forma natural (-●-) y la enzima en presencia de jugo de granada (-■-).

Los valores obtenidos muestran una diferencia significativa en los parámetros cinéticos ($P=0.0001$); la K_m de la enzima en su forma natural es más pequeña que la que se obtuvo con la enzima en presencia de jugo de granada, haciendo más afín a la enzima en su forma natural a su sustrato, sin presentar diferencias significativas entre ambas condiciones.

Por otra parte los valores correspondientes a la V_{max} mostraron una diferencia significativa notable, esto sugiere que componentes del jugo interactúan con la enzima haciendo a esta más activa, evitando su rápida saturación.

11.1.6 Inhibición de la actividad enzimática con EDTA

Debido a que la hPON1 es una enzima dependiente de calcio para su actividad catalítica³⁴⁻³⁶, se realizaron cinéticas con EDTA a fin de tener más evidencia de que las fracciones obtenidas se trataban de paraoxonasas; se realizaron cinéticas con diferentes concentraciones de EDTA (0, 200, 400, 600, 800 y 1000 mM) para determinar la inhibición

de la enzima, así mismo se realizaron cinéticas en presencia de jugo de granada, los resultados se muestran en la figura 8.

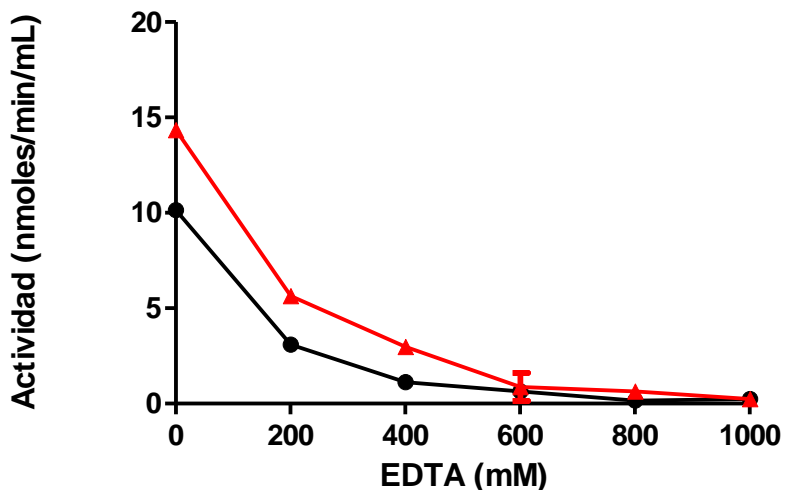


Figura 8. Inhibición con EDTA. Inhibición con EDTA para la proteína en su forma natural (■) y en presencia de jugo de granada (▲).

Los resultados obtenidos demuestran que la enzima se inhibe en la presencia de EDTA, se encontró que a una concentración de 600 mM de EDTA la actividad de la hPON1, prácticamente se perdió, incluso en la presencia del jugo de granada; sin embargo se puede ver que a concentraciones menores, se observa una actividad mayor aunque no fue estadísticamente significativo.

12.DISCUSIÓN

El procedimiento de la purificación de la hPON1 para este trabajo presentó en un inicio varias complicaciones, se modificaron varias veces las concentraciones de los amortiguadores que fueron utilizados para equilibrar la columna y para eluir a la enzima; se realizaron 16 repeticiones del experimento en los cuales debido al cambio de concentraciones, la enzima no se obtenía dentro del gradiente, por tanto no sería útil para los posteriores experimentos.

Después de varios intentos, se determinó que para la elución de la enzima únicamente se necesitaría agua con una mínima cantidad de sales, debido muy probablemente al carácter hidrofóbico que presenta la hPON1.

Aunque la PON1 se ha purificado mediante diferentes procedimientos, su obtención sigue constando de muchos pasos: en 1993 Furlong y colaboradores⁸⁷ demostraron que la purificación de la paraoxonasa de humano se podría realizar en 4 pasos, utilizando geles de azul de agarosa, y columnas de exclusión molecular (sephadex G 200 y sephadex G 75), y de intercambio iónico (DEAE Trisacril); en 1997 Rodrigo y colaboradores⁸⁸ purificaron la paraoxonasa en 5 procedimientos utilizando adsorción de hidroxapatita, cromatografías diversas con columnas DEAE Sheparose CL-6B (intercambio iónico), cromatografía de actividad no específica, columna de intercambio iónico Cibacron Blue 3 GA y la columna Mono Q HR 5/5 de intercambio aniónico.

Golmanesh y colaboradores²⁹, crearon en el 2007 un procedimiento simple para la purificación de la enzima, este trabajo incluye el uso de tres diferentes columnas, la DEAE-Shephadex A-50 de intercambio iónico, una columna de filtración en gel Shephadex G-200, y una segunda cromatografía con la columna de intercambio iónico, además de la adición de sales y otros compuestos para la estabilización de la enzima.

Erzengin y colaboradores⁹⁰ en 2012, realizaron la purificación de la enzima utilizando solo 2 procedimientos, primero precipitando las proteínas del suero con una gran cantidad de sulfato de Amonio y después utilizando una columna de interacción hidrofóbica (Sheparose 4B-L-Tyrosine-1-napthylamine) lo que acorta de manera importante la obtención de la enzima.

El procedimiento que se usó en este trabajo consistió en una etapa, empleando sólo una columna de cromatografía de interacción hidrofóbica (HiPrep Phenyl FF (high sub) 16/10.), , haciendo más rápida la obtención de la enzima pura.

La actividad específica obtenida en muchos estudios de purificación de la enzima ha sido elevada debido al uso de gran cantidad de suero para la purificación; Rodrigo y colaboradores reportaron en 2001⁹¹ una actividad específica de 266. 74 U/mg utilizando 50 mL de suero y 4 diferentes pasos de cromatografía; Golmanesh y colaboradores en el 2007²⁹ reportaron una actividad específica para la enzima purificada de 406. 70 U/mg utilizando 50 mL de suero, además de 4 procedimientos de purificación.

En 2012 Erzengin y colaboradores⁹⁰ reportaron una actividad específica de 11.76 U/mg utilizando 50 mL de suero en 2 procesos de purificación. En el presente estudio se obtuvo una actividad específica para la fracción H10 que fue la que mayor actividad presento fue de 0.64 U/mg, con la diferencia de que solo fueron utilizados 2 mL de suero y solo un paso de purificación, con lo que se puede inferir que el proceso puede ser utilizado en la purificación a gran escala de la enzima.

En contraste con la baja actividad específica reportada en este trabajo los parámetros cinéticos de la enzima son muy similares a los reportados en otros estudios: En 2001 se reportó una V_{max} y K_m de 0.032 U/ml y 1.18 mM respectivamente; en 2006⁹² se reportaron valores de K_m para la enzima purificada de 4.16 mM; Reiner y colaboradores⁹³ reportaron valores de K_m para la enzima de 2.5 mM.

Brushia y colaboradores⁹⁴ reportaron un K_m de 1.4 mM para la enzima purificada: en 2007²⁹ se reportó una K_m de 1.20 mM y una V_{max} de 158 U/L; en 2001 Bayrak y colaboradores⁹⁵ reportaron valores de K_m para las isoenzimas de la paraoxonasa de 0.96 mM para el alelo Q192 y de 0.56 para el alelo R192.

En 2012 Erzengin y colaboradores⁹⁰ reportaron una V_{max} de 1.5 U y una K_m de 0.66 mM utilizando al paraoxón como sustrato, utilizando solo 2 pasos específicos para la purificación de la enzima.

Por otra parte, existen varios estudios que demuestran que el jugo de granada tiene una capacidad antioxidante muy elevada^{63,68} debido a sus componentes principales (antocianinas y elangitaninos); se cree que algunos polifenoles ejercen un efecto antioxidante directo en el suero, lo que podría ser benéfico para el aumento en la actividad de la PON1⁹⁶; otros estudios han revelado que existe una relación entre el jugo de granada y la actividad y expresión de la paraoxonasa 1 en modelos humanos y en modelos animales; Gouédard y colaboradores⁹⁷ demostraron que algunos compuestos polifenólicos presentes en la granada aumentaban la expresión de la paraoxonasa 1 en hepatocitos HuH7 de humano.

Rosenblat y colaboradores⁶⁸ demostraron que el consumo de jugo de granada o de componentes de la granada aumentó la concentración de HDL asociado con la PON1 en suero, y la disminución de la PON1 deficiente; Rock y colaboradores⁹⁸ demostraron en 2008 que el consumo de jugo de granada en pacientes diabéticos aumento las concentraciones en plasma de las lipoproteínas de alta densidad asociadas con la PON1, lo que estimulo su actividad catalítica.

Khateeb y colaboradores⁹⁹ demostraron que los polifenoles presentes en el jugo de granada tienen un papel transcripcional específico en la regulación de la expresión de la PON1 en hepatocitos; otros estudios realizados en modelos animales reportaron un aumento en la actividad específica de la PON1 en ratones alimentados con una dieta alta en grasas, suplementados con jugo de granada⁸².

En estudios con humanos se determinó que el consumo de jugo de granada incrementó la actividad específica de la PON1 en un 18% después de consumirlo por 2 semanas⁸¹. En pacientes con estenosis de la arteria carótida, la actividad arilesterasa de la PON1 aumentó significativamente en un 11%, 42%, 49%, y 83% después de 3, 6, 9, y 12 meses de consumo de JG, respectivamente⁸⁴.

Aunque existen muchos estudios que determinan el incremento de la actividad de la paraoxonasa después del consumo de jugo de granada, todos fueron realizados *in vivo*; en este estudio se realizó la medición de la actividad de la paraoxonasa 1 en presencia de jugo de granada en su forma purificada para determinar si el jugo actuaba directamente con la enzima, los resultados obtenidos demostraron que el jugo si aumenta significativamente la actividad de la PON1. Estos resultados sugieren que el jugo de granada puede tener un papel cardioprotector al inducir la actividad de la hPON1, la cual existen reportes que sugieren que puede prevenir el desarrollo de la aterosclerosis.

13.CONCLUSIONES

1. Se purificó la hPON1 a partir de 2 mL de suero sanguíneo, y a través cromatografía de interacción hidrofóbica y utilizando un sistema AKTA FPLC.
2. Se obtuvo relativamente una baja actividad y rendimiento en la purificación de la enzima, sin embargo los parámetros cinéticos fueron muy similares a los reportados por otros autores.
3. La proteína fue eluida prácticamente con agua, con muy poca cantidad de sales lo que facilitó la purificación y caracterización cinética de la enzima
4. La enzima se inhibió en presencia del EDTA, con lo que se determinó que muy probablemente se trata de la hPON1.
5. La actividad enzimática de la proteína en presencia de jugo de granada aumentó significativamente con respecto a la actividad sin jugo de granada. Se determinó utilizar la concentración de 450 mg EAG/L de jugo de granada.
6. El proceso de purificación de la enzima permitió que la enzima fuera colectada en tres diferentes fracciones, en donde se presentó la mayor actividad fue en las fracciones H9, H10 y H10, sin embargo, se utilizó la fracción H10, ya que esta fue la que presentó la mayor actividad y mayor contenido de la enzima.

14.PERSPECTIVAS

Para conocer más acerca del comportamiento de la enzima hPON1 y su interacción con el jugo de granada, es necesario realizar otros estudios específicos que permitan determinar cuáles componentes del jugo son los principales responsables de tal efecto.

Se propone realizar experimentos de actividad enzimática con compuestos aislados y caracterizados del jugo, además de la purificación a mayor escala de la enzima.

15. BIBLIOGRAFÍA:

1. González-Andrade, M., Silva, D., Hernández, H., Vázquez, E., y Sosa, P. (2005) La estructura y visualización molecular de las proteínas. *Mensaje bioquímico*. **29**:157-180.
2. Griffiths, A.J.F., J.H. Miller, D.T. Suzuki, R.C. Lewontin y W.M. Gelbart. (1996) the nature of the gene. En: *An Introduction to Genetic Analysis* (6a. ed.). W.H. Freeman., NY. 345-358.
3. Nelson D. L. y Cox M. M. (2005). Structure and Catalysis. En: *Lehninger. Principles of Biochemistry*. 4ta edición. Ed. Worth Publishers, New York, USA. 216.
4. Jaenicke, R. (1987). Folding and Association of Proteins. *Prg. Biophys. Molec. Biol.* **49**: 117-327.
5. Fernández-Velasco D. A. (2002). Estructura y propiedades de las proteínas. En: *Bioquímica de laguna*. (5a Ed) El Manual Moderno S.A. de C.V. México D.F. 109-151.
6. Chánez-Cárdenas, M. E., Cisneros, D., Yauner, L., Becerril, B., y Fernández-Velasco, D. A. (2002) Enfermedades relacionadas al plegamiento anómalo de las proteínas. *Mensaje bioquímico*. **26**:73-97.
7. Kennelly P. y Rodwell V. (2009). Proteínas: determinación de la estructura primaria. En: Harper bioquímica ilustrada. Murray R., Bender D., Botham K., Kennelly P., Rodwell V. y Weil P. 28ª edición. Ed Mc Graw Hill Mexico DF. 21.
8. HAPB. Handbooks of Amersham Pharmacia Biotech. (2002). *Ion Exchange Chromatography, Affinity Chromatography, Hydrophobic Interaction Chromatography, Reversed Phase Chromatography*, Sweden.
9. Mckee, T. y Mckee, J. (2003). *Bioquímica*. En: La base molecular de la vida. 3ra edición. Ed Mc Graw Hill interamericana, Madrid, 672.
10. Eriksson K. (1998) "Hydrophobic Interaction Chromatography" En: "*Protein Purification: Principles, High-Resolution Methods, and Applications*", Editado por J-C Janson and L. Ryden, 2 Edition, Wiley-Liss, New York. 283-309.
11. Marshak, D.R., Kadonaga, J.T., Burgess, R.R., Knuth, M.W., Brennan, W.A. & Lin,S.-H. (1996). Hydrophobic interactions chromatography. Strategies for protein

- purification and characterization. A laboratory course manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, United States of America. 396.
12. Peña-Díaz, A., Arroyo-Bogovich, A., Gómez-Puyou, A. y Tapia, R. (2002). Las enzimas: aceleradores de reacciones. En: *Bioquímica* (4^a Ed) Limusa editores. México D.F. pp: 194-202.
 13. Halliwell B, Gutteridge JM y Cross CE. (1992) Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med* **119**:598-620.
 14. Hicks G. (2007) *Bioquímica*. 2a. ed. McGraw-Hill Interamericana. 689-708.
 15. Garrison, Stadtman E. R. and Levine R. L. (2003). Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Free Radic Biol Med.* **25**: 207-218.
 16. Diplock AT.(1998). Defense against reactive oxygen species. *Free Radic Res.* **29**:463-467.
 17. Primo-Parmo, SL., Sorenson RC., Teiber J., y La Du BN. (1996). The human paraoxónase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family. *Genomics.* **33**:498-507.
 18. Draganov DI., Stetson PL., Watson CE., Billecke SS. y La Du BA. (2000). Rabbit serum paraoxónase 3 (PON3) is a high-density lipoprotein associated lactonase and protects low density lipoprotein against oxidation. *J Biol Chem.* **275**: 33435-33442.
 19. La Du, BN. (1992). Human serum paraoxónase/arylesterase. En: Kalow, ed. *Pharmacogenetics of drug metabolism*. Nueva York. 51-91.
 20. Ferre N., Camps J. y Joven J. (2004). Paraoxonasa, acción antioxidante de las HDL y respuesta inflamatoria. *Clin Chem.* **13**: 106-114.
 21. Ng Cj., Waldeigh Dj., Gangopadhyay A., Hama S., Grijalva VR., Navab M., Fogelman AM. (2001). Paraoxónase-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.* **276**: 44444-44449.
 22. Mazur A. (1946). An enzyme in animal tissues capable of hydrolyzing the phosphorus-fluorine bond of alkyl fluorophosphates. *J Biol Chem.* **164**:271-89.

23. Aldridge WN. (1953). Serum esterases. II. An enzyme hydrolysing diethyl pnitrophenyl phosphate (E600) and its identity with the A-esterase of mammalian sera. *Biochem J* **53**:11 7-24.
24. Davies HG., Richter RJ., Keifer M., Broomfield CA., Sowalla J, y Furlong CE. (1996). The effect of the human serum paraoxónase polymorphism is reversed with diazoxon, soman and sarin. *Nat Genet.* **14**:33 4-6.
25. Durrington PN, Mackness B, Mackness MI. (2001). Paraoxónase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **21**:473-80.
26. Clendenning JB, Humbert R, Green ED, Word C, Traver D, Furlong CE. (1996). Structural organization of the human PON 1 gene. *Genomics* **35**:586-9.
27. Mackness MI, Arrol S, Durrington PN. (1991). Paraoxónase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. *FEBS Lett* **286**:152-4.
28. Harel M, Aharoni A, Gaidukov L, et al. (2004). Structure and evolution of the serum paraoxónase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes. *Nat Struct Mol Biol* **11** :412-9.
29. Golmanesh L., Mehrani H., Mohammad T. (2007). Simple procedures for purification and stabilization of human serum paraoxónase-1. *J Biochem Biophys Methods.* 10-16.
30. Gan KN, Smolen A, Eckerson HW and La Du BN. (1991) Purification of human serum paraoxónase/arylesterase. *Drug Metab Dispos.* **19**:100-116.
31. Sorenson RC., Primo-Parmo SL., Kuo CL., Adkins S., Lockridge O. y La Du BN. (1995) Reconsideration of the catalytic center and mechanism of mammalian paraoxónase/arylesterase. *Proc Natl Acd Sci.* **92**:7187-7191.
32. Deakin S, Leviev I, Gomaschi M, Calabresi L, Franceschini G, James RW. (2002). Enzymatically active paraoxónase-1 is located as the external menbrane of producing cells and released by a high-affinity, saturable, desorption mechanism. *J Biol Chem.* **277**(6):4301-4308.
33. Sorenson RC., Bisgaier CL., Aviram M., Hsu C., Billecke S., y La Du BN. (1999) Human Serum paraoxónase/arylesterase's retained hydrophobic N-terminal leader sequence associates with HDLs by binding phospholipids: apolipoprotein A-1 stabilizes activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **19**:2214-25.

34. Jawad, Z. & Paoli, M. Novel. (2002). sequences propel familiar folds. *Structure* **10**, 447–454.
35. Kuo, C.L. y La Du, B.N. (1998). Calcium binding by human and rabbit serum paraoxónases. Structural stability and enzymatic activity. *Drug Metab. Dispos.* **26**, 653–60.
36. Kuo, C.L. y La Du, B.N. (1995). Comparison of purified human and rabbit serum paraoxónases. *Drug Metab. Dispos.* **23**, 935–944.
37. Jonas, A. (2000). Lecithin cholesterol acyltransferase. *Biochim. Biophys. Acta* **1529**, 245–256.
38. Josse, D. *et al.* (1999). Identification of residues essential for human paraoxónase (PON1) arylesterase/organophosphatase activities. *Biochemistry* **38**, 2816–2825.
39. Oda MN., Bielicki JK., Ho TT., Berger T., Rubin EM., y Forte TM. (2002). Paraoxónase1 overexpression in mice and its effect on high-density lipoproteins. *Biochem Biophys Res Commun.* **290**:921-7.
40. Aviram M., Rosenblat M., Bisgaier CL., Newton RS., Primo-Parmo SL. y La Du BN. (1998). Paraoxónase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxónase. *J Clin Invest.* **101**:1581-1590.
41. Senti M, Tomas M, Elosua R. and Marrugat J.(2000). Interrelationship of serum paraoxónase genetic variants on atherosclerosis risk. *Contributions to Science* **1(3)**:323-329.
42. Tward A, Xia YR, Wang XP, Shi YS, Park C, Castellani LW, et al. (2002). Decreased Atherosclerotic Lesion Formation in Human Serum Paraoxónase Transgenic Mice. *Circulation* **106**:484-490.
43. Aviram M, Rosenblat M, Billecke S, Eroglu J, Sorenson R, Bisgaier CL, Newton RS y La Du B. (1999). Human serum paraoxónase (PON1) is inactivated by oxidized low density lipoprotein and preserved by antioxidants. *Free Rad Biol Med.* **26**:892-904.
44. Mackness MI, Mackness B, Durrington PN, Fogelman AM, Berliner J, Lusis AJ, Navab M, Shih D y Fonarow GC. (1998). Paraoxónase and coronary heart disease. *Curr Opin Lipidol.* **9**:319-324.

45. Shih DM, Xia YR, Miller E, Castellani LW, Subbanagounder G, Cheroutre H, Faull KF, Wilztum JL y Lusic AJ. (2000). Combined serum paraoxónase Knockout/apolipoprotein E knockout mice increased lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *J Biol Chem.* **275**:17527-17535.
46. Rozenberg O, Rosenblat M, Coelman R, Shih DM y Aviram M. (2003). Paraoxónase (PON1) deficiency is associated with increased macrophage oxidative stress: studies in PON1-knockout mice. *Free Rad Biol Med.* **34**:774-784.
47. Rozenberg O, Shih SD y Aviram M. (2005). Paraoxónase 1 (PON1) attenuates macrophage oxidative status: studies in PON1 transfected cells and in PON1 transgenic mice. *Atherosclerosis.* **101**:1581-1590.
48. Mackness MI, Arrol S, Abbot CA y Durrington PN. (1993). Protection of low-density lipoprotein against oxidative modification by high-density lipoprotein associated paraoxónase. *Atherosclerosis.* **104**:129-135.
49. Aviram M y Rosenblat M. (2004). Paraoxónases 1, 2 and 3, oxidative stress, and macrophage foam cell formation during atherosclerosis development. *Free Rad Biol Med.* **37**:1304-1316.
50. Aviram M, Billecke S, Sorenson R, Bisgaier CL, Newton RS, Rosenblat M, Eroglu J, Dunlop C y La Du BN. (1998). Paraoxónase active site required for protection against LDL oxidation involves its free sulfhydryl group and is different than that required for its arylesterase/paraoxónase activities: selective action of human paraoxónase allozymes Q and R. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **18**:1617-1624.
51. Deakin S, Leviev I, Brulhart-Meynet MC, James RW. (2003). Paraoxónase-1 promoter haplotypes and serum paraoxónase: a predominant role for polymorphic position - 107, implicating the Sp1 transcription factor. *Biochem J.* **372**:643-649.
52. Leviev I. y James RW. (2002). Promoter polymorphisms of human paraoxónase PON1 gene and serum paraoxónase activities and concentrations. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **20**:516-21.
53. Brophy VH., Jampsa RL., Clendenning JB., McKinstry LA., Jarvik GP., y Furlong CE. (2001). Effects of 5' regulatory-region polymorphisms on paraoxónase-gene (PON1) expression. *Am J Hum Genet.* **68**:1428-1436.

54. Leviev I., Deakin S. y James RW. (2001). Decreased stability of the M54 isoform of paraoxónase as a contributory factor to variations in human serum paraoxónase concentrations. *J Lipid Res.* **42**:528-535.
55. Humbert R., Adler DA., Disteché CM., Hassett C., Omiecinski CJ. y Furlong CE. (1993). The molecular basis of the human serum paraoxónase activity polymorphism. *Nat Genet.* **3**:73-76.
56. Adkins S., Gan KN., Mody M. y La Du BN. (1993). Molecular basis for the polymorphic forms of human serum paraoxónase/arylesterase: glutamine or arginine at position 191, for the respective A or B allozymes. *Am J Hum Genet.* **52**:598-608.
57. Yanishlieva-Maslarova N.V. (2001). Inhibición de la oxidación. En: Pokorny, J., Yanishlieva, N., Gordon, M. *Antioxidantes de los alimentos*. Aplicaciones prácticas. Zaragoza. 23-68.
58. Shi H., Noguchi N. y Niki E. (2001). Introducción a los antioxidantes naturales. En: Pokorny, J., Yanishlieva, N. y Gordon, M. *Antioxidantes de los alimentos*. Aplicaciones prácticas. Zaragoza. 141-151.
59. Perez gastell P.L. y Pérez de alejo J.L. (2000). Métodos para medir el daño oxidativo. *Med Milit.* **29**:192-198.
60. Shahidi F. y Naczki M. (1995). *Food Phenolics*. Technomic Publishing AG. 9-42.
61. Niki E., Noguchi N. e Iwatsuki, M. (1989). Antioxidant activities of phenolic compounds in solution, membranes and lipoproteins, En: Ong A. S. H. et al., *Nutrition, lipids, health and disease*. 1-7.
62. Dwyer, J. H., Paul-Labrador, M. J., Fan, J., Shircore, A. M., Bairey, C. N., y Dwyer, M. (2004). Progression of carotid intima-media thickness and plasma antioxidants: the Los Angeles atherosclerosis study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **24**: 313-319.
63. Azadzoi, K. M., Schulman, R. N., Aviram, M., & Siroky, M. B. (2005). Oxidative stress in arteriogenic erectile dysfunction: prophylactic role of antioxidants *World J Urol.* **174**, 386–393.
64. Gil, M I., Tomás-Barberán, F A., Hess-Pierce B., Holcroft, D M. y Kader, A A. (2000). Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *J Agric Food Chem*, **48**: 4581–4589.

65. Jurenka, M.T. (2008). Therapeutic applications of pomegranate (*Punica granatum* L.): a review. *Alternative Medicine Review*. **13**: 131-144.
66. Singh RP, Chidambara MKN, Jayaprakasha GK. (2002). Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using in vitro models. *J Agric Food Chem* **50**: 81-86.
67. Lansky, E. P. y Newman R. A. (2007). *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *J Ethnopharmacol*, **109**: 177–206.
68. Rosenblat, M., Hayek, T., & Aviram, M. (2006). Anti-oxidative effects of pomegranate juice (PJ) consumption by diabetic patients on serum and on macrophages. *Atherosclerosis*. **187**: 363–371.
69. Aviram M., Dornfeld L., Kaplan M., Coleman R., Gaitini D., Nitecki S., et al. (2002). Pomegranate juice flavonoids inhibit LDL oxidation and cardiovascular disease: studies in atherosclerotic mice and in humans. *Drugs Exp Clin Res*. **28**: 49–62.
70. De MK de A, Banerjee AB. (1999). Antimicrobial screening of some Indian spices. *Phytother. Res*. **13**: 616-8.
71. Bell, C y Hawthorne, S. 2008. Ellagic acid, pomegranate and prostate cancer a mini review. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. **60**:139-144.
72. Gonera, T, Sepulveda, E y Sáenz, C. 2010. Compuestos bioactivos y actividad antioxidante de frutos de granado (*Punica granatum* l.). *La Alimentación Latinoamérica*. **41**:48-52.
73. Jurenka, MT J. 2008. Therapeutic Applications of Pomegranate (*Punica granatum* L.): a review. *Alternative Medicine Review*. **13**:128-144.
74. Arun, N y Singh, DP. 2012. *Punica granatum*: a review on pharmacological and therapeutic properties. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. **3**:1240-1245.
75. Miguel, MG, Neves, MA y Antunes, MD. 2010. Pomegranate (*Punica granatum* L.): a medicinal plant with myriad biological properties a short review. *Journal of Medicinal Plants Research*. **4**:2836-2847.

76. Betanzos-Cabrera, G, Montes-Rubio, PY, Fabela-Illescas HE, Belefant-Miller, H y Cancino-Diaz, JC. 2013. Anti-Staphylococcus epidermidis activity of fresh pomegranate juice on clinic strains from ocular infections. *Life Sci J* En revisión.
77. Dipak, G, Axay, P y Manodeep, C. 2012. Phytochemical and pharmacological profile of Punica granatum: an overview. *International Research Journal of Pharmacy*. **3**:65-68.
78. Tijburg LBM, Mattern T, Folts JD, Weisgerber UM, Katan MB. (1997). Tea flavonoids and cardiovascular diseases: a review. *Crit. Rev. Food Sci Nutr*. **37**: 771-785.
79. Tapiero H, Tew KD, Nguyen BG, Mathé G. (2002). Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies? *Biomed. Pharmacother* **56**: 200-2077.
80. Deakin SP, James RW. (2004). Genetic and environmental factors modulating serum concentrations and activities of the antioxidant enzyme paraoxónase-1. *Clin Sci* **107**: 435-447.
81. Aviram M, Dornfeld L, Rosenblat M, et al. (2000). Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modification of LDL, and platelet aggregation: studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. *Am J Clin Nutr*. **71**: 1062-1076.
82. Betanzos-Cabrera, G., et al. (2011). Pomegranate juice increases levels of paraoxónase1 (PON1) expression and enzyme activity in streptozotocin-induced diabetic mice. *Food Research International*. **44**: 381-385.
83. Seeram NP, Aviram M, Zhang Y, et al. (2008). Comparison of antioxidant potency of commonly consumed polyphenol-rich beverages in the United States. *J Agric Food Chem*. **56**: 1415–1422.
84. Aviram M, Rosenblat M, Gaitini D, et al. (2004). Pomegranate juice consumption for 3 years by patients with carotid artery stenosis reduces common carotid intima-media thickness, blood pressure and LDL oxidation. *Clin Nutr*. **23**: 423–433.
85. de Nigris F, Balestrieri ML, Williams-Ignarro S, et al. (2007). The influence of pomegranate fruit extract in comparison to regular pomegranate juice and seed oil on nitric oxide and arterial function in obese Zucker rats. *Nitric Oxide*. **17**:50–54.

86. Charlton-Menys, V., Liu, Y. y Durrington, P.N. 2006. Semiautomated Method for Determination of Serum Paraoxónase Activity Using Paraoxón as Substra. *Clinical Chem.* 52(3):453-457.
87. Shägger H. y von Jagow G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of protein and peptides whit molecular masses 100,000-1000, and their detection whit picomolar sensitivity. *Electrophoresis.* 12 (5):352-366.
88. Furlong, C. E., Costa, L.G., Hasett, C., Richter, R. J., Sundstrom, J.A., Adler, D.A., Disteché, C.M., Omiecinski, C.J., Crabb, J.W. y Humbert, R. (1993). Human and rabbit paraoxónases: purification, cloning, sequencing, mapping and role of polymorphism in organophosphate detoxification, *Chem. Biol. Interact.* **87**: 35–48.
89. Rodrigo, L., Gil, F., Hernandez, A.F., Marina, Vazquez, A.J., y Pla, A. (1997). Purification and characterization of paraoxón hydrolyse from Rat Liver, *Biochem.J.* **321**: 595–601.
90. Erzengin, M., Basaran, I., Cakir, U., AyBey, A. y Sinan, S. (2012). In Vitro Inhibition Effect of Some Dihydroxy Coumarin Compounds on Purified Human Serum Paraoxónase 1(PON1). *Appl Biochem Biotechnol*, **168**:1540–1548.
91. Rodrigo, L., Mackness, B., Durrington, P.N., Hernandez, A. y Mackness, M. I. (2001). Hidrolysis of platelet-activating factor by human serum paraoxónase. *Biochem. J.* **354**: 1-7.
92. Sinan, S., Kockar, F. y Arslan, O. (2006). Novel purification strategy for human PON1 and inhibition of the activity by cephalosporin and aminoglicozide derived antibiotics. *Biochimie.* **88**: 565-574.
93. Reiner, E., Simeon-Rudolf, V. y Skrinjaric-Spoljar, M. (1995). Catalytic properties and distribution profiles of paraoxónase and cholinesterase phenotypes in human sera, *Toxicol. Lett.* **83**:447–452.
94. Brushia R.J., Forte T.M., Oda M.N., LaDu N.B. y Bielicki J.K. (2001) Baculovirus-mediated expression and purification of human serum paraoxónase 1A. *J Lipid Res* **42**:951–8.
95. Bayrak, T., Bayrak, A., Demirpence, E. y Kilinc, K. (2010). Purification and kinetic properties of rabbit liver paraoxónase 1. *Journal of Chromatography B.* **878**: 1791-1795.

96. Aviram, M. y Fuhrman, B. (2002). Wine flavonoids protect against LDL oxidation and atherosclerosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **957**:146–161.
97. Gouédard, C., Barouki, R. y Morel, Y. (2004). Dietary polyphenols increase paraoxónase 1 gene expression by an aryl hydrocarbon receptor-dependent mechanism. *Molecular and Cellular Biology*, **24**: 5209–5222.
98. Rock, W., Rosenblat, M., Miller-Lotan, R., Levy, A. P., Elias, M. y Aviram, M. (2008). Consumption of wonderful variety pomegranate juice and extract by diabetic patients increases paraoxónase 1 association with high-density lipoprotein and stimulates its catalytic activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**: 8704–8713.
99. Khateeb, J., Gantman, A., Kreitenberg, A. J., Aviram, M., y Fuhrman, B. (2010). Paraoxónase 1 (PON1) expression in hepatocytes is upregulated by pomegranate polyphenols: a role for PPAR-gamma pathway. *Atherosclerosis*, **208**: 119–125.